

Mesas Redondas / Round Tables

Estudo sobre a atividade protetora da proteína de choque térmico HSP65 nas infecções micobacterianas / *Heat Shock Protein (HSP) in micobateria disease*

Célio Lopes Silva. Professor Titular do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A tuberculose volta a ser um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos. O *Mycobacterium tuberculosis*, que é o agente etiológico dessa doença, infecta atualmente mais de 1 bilhão de pessoas e é responsável pela morte de aproximadamente 3 milhões de pessoas por ano (WHO). O controle da tuberculose é feito preventivamente em diversas partes do mundo pela utilização da vacina BCG. O BCG foi obtido entre 1906 e 1919 pela atenuação de um isolado de *M. bovis* por passagens sucessivas em meios de cultura. Os bacilos atenuados nunca foram clonados, mas foram distribuídos pelo mundo inteiro e propagados sob diferentes condições de cultura para serem usados como vacina. Contudo, depois de vários estudos, verificou-se que a eficácia desta vacina variava de zero a 80% entre as diferentes populações do mundo submetidas ao teste (1). Várias razões tem sido propostas para explicar e entender estas diferenças observadas (1). Elas poderiam estar relacionadas com: as diferenças nas preparações de BCG testadas; com a virulência do bacilo da tuberculose em diversas regiões; com diferenças genéticas e nutricionais dessas populações infectadas; e possivelmente com o emprego de diversas metodologias para coleta dos dados e análise dos resultados. Dados atuais e relevantes mostram ainda que: (i) o BCG já foi detectado em pacientes infectados pelo vírus da AIDS (2); (ii) o uso desta vacina impede o emprego

subseqüente de testes de sensibilidade cutânea para detectar a tuberculose-infecção (3); (iii) não se sabe ao certo ainda, porque em contraste com o BCG viável, o BCG morto ou os antígenos purificados conferem pouca proteção imunológica mesmo quando inoculados em altas concentrações e ou juntamente com adjuvantes (4). Por esses motivos tem-se evitado em diversas partes do mundo a utilização do BCG como vacina, sendo que uma série de pesquisas estão em desenvolvimento para se encontrar uma vacina substituta.

Estes fatos reveladores sobre a ineficácia do BCG, ocorreram justamente quando há uma revolução nas propostas de desenvolvimento de vacinas, todas elas baseadas na tecnologia do DNA recombinante. Certamente, nos próximos anos haverá uma nova geração de vacinas destinadas a combater a maioria das doenças infecciosas, incluindo a tuberculose. Utilizando abordagens e metodologias recentes, estas vacinas utilizarão genes ou partes de genes dos microorganismos que causam as doenças, e os seus produtos serão expressos de maneira apropriada nos organismos vacinados. Sob este ponto de vista, o desenvolvimento de uma vacina contra estas infecções só terá êxito após se resolver alguns paradigmas, como: (i) identificação do mecanismo imune efetor que leva a uma proteção efetiva contra a infecção por micobactérias; (ii) escolha de antígenos apropriados que possam induzir uma resposta efetiva em todos os indivíduos; (iii) escolha da maneira adequada de administração da vacina, de modo a se obter a melhor resposta nos indivíduos vacinados.

Como mencionado acima, na tentativa de se obter uma nova vacina contra a tuberculose, que apresentasse melhor eficácia que o BCG.

uma série de trabalhos desenvolvidos nos últimos anos por diferentes autores, mostraram que as abordagens clássicas de imunização com diferentes componentes micobacterianos purificados foram desapontadores quanto à capacidade de conferir proteção. Desta forma, pode-se concluir que ou o BCG intracelular secreta antígenos especiais que conferem melhor proteção, ou que a origem intracelular dos antígenos, resulta em meios mais efetivos de processamento e apresentação antigênica para células efetoras específicas. Desta forma, a melhor maneira para testar a hipótese de que antígenos liberados intracelularmente são mais efetivos para conferir proteção imunológica contra a tuberculose, seria a realização de vários experimentos de vacinação com a utilização de genes micobacterianos, que promovem a expressão dos respectivos produtos gênicos diretamente no citoplasma de células apresentadoras de antígenos (APC).

Segundo a hipótese levantada pelo nosso grupo de pesquisa, antígenos micobacterianos originados intracelularmente em células APC seriam mais eficientemente processados e apresentados para linfócitos T específicos e conseqüentemente induziria melhor resposta imune efetora contra infecção por *M. tuberculosis*. Assim, vários modelos experimentais foram desenvolvidos em nosso Laboratório de Vacinas Genéticas e utilizados com a finalidade tanto de induzir a expressão de proteínas micobacterianas endogenamente em células APC como estudar o efeito protetor nos animais imunizados, contra posterior infecção por *M. tuberculosis*. O primeiro modelo utilizado para expressão endógena desses antígenos, foi a transfecção de células macrofágicas murina J774 com o gene da proteína hsp65 clonado no vetor retroviral pZIPNeoSV(X). Os retrovirus recombinantes (pZIPNeoHSP65) foram usados para transfectar células fibroblásticas psi-CRE que são apropriadas para a produção em larga escala dos retrovirus em forma infectante. Os retrovirus recombinantes e infectantes liberados no sobrenadante dessas células fibroblásticas, foram titulados em células 3T3, e utilizados em seguida para infectar células macrofágicas murina da linhagem J774 (8). As células macrofágicas transfectadas foram selecionadas na presença de neomicina (G418), e aquelas expressando endogena

mente hsp65 (J774-hsp65) foram clonadas e usadas para estudar o processamento e o reconhecimento do antígeno endógeno por diferentes subpopulações de linfócitos. As análises sobre o RNA mensageiro por Northern blot, mapeamento com enzima nuclease S1, bem como análises sobre a expressão da proteína hsp65 através de Western blot e análise por FACScan, mostraram que tanto o RNAm como a proteína estavam sendo expressos de forma estável nos macrófagos transfectados (5).

Os primeiros estudos realizados pelo grupo sobre apresentação antigênica mostraram que a proteína micobacteriana recombinante expressada endogenamente na célula J774-hsp65 utilizava-se tanto da via exógena, quanto da endógena da APC para ser processada, e os fragmentos antigênicos associados respectivamente à moléculas de classe II ou classe I do MHC, foram reconhecidos respectivamente por linfócitos T CD4 ou T CD8 hsp65-específicos (5,6). Houve proliferação e secreção de IL-2 e IL-3 por esses linfócitos, que tinham também a capacidade de causar lise celular específica em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*. Estes resultados permitiram dar continuidade às investigações visando entender os possíveis mecanismos efetores que levam a uma proteção eficaz contra estas infecções.

Como a célula macrofágica J774-hsp65 transfectada tinha a capacidade de apresentar o antígeno micobacteriano em sua superfície tanto em associação com moléculas de classe I como de classe II do MHC, e ser reconhecido respectivamente por linfócitos T CD8 e T CD4 hsp65-específicos, realizamos uma série de experimentos com o intuito de induzir imunidade específica em camundongos pela inoculação dessas células transfectadas (7). Foram utilizados diferentes protocolos para imunização e o melhor esquema foi aquele constituído de 4 inoculações (uma a cada semana) de 1×10^5 células J774-hsp65 transfectadas, por via ip ou iv, em camundongos BALB/c. Este esquema de imunização induziu potente resposta imune celular contra a proteína hsp65, sem desenvolvimento de tumores e morte dos animais vacinados (7). O ponto mais importante desses experimentos foi a demonstração de que nesses animais imunizados ocorria proteção altamente

significativa contra posterior infecção por *M. tuberculosis* ou BCG. Estes resultados foram os primeiros da literatura demonstrando que a imunização de animais com uma única espécie de molécula antigênica era capaz de conferir alto grau de proteção imunológica específica contra infecção por micobactérias (8-11). Estudos realizados em paralelo com a imunização de animais pela inoculação do antígeno hsp65 recombinante em adjuvante incompleto de Freund, mostraram que esse sistema ao longo da infecção micobacteriana era capaz de induzir somente uma bacteriostase, enquanto a imunização com as células J774-hsp65 transfectadas induzia uma redução do número de micobactérias nesses animais em torno de 90%, 30 dias após infecção por *M. tuberculosis* (10). Interessante mencionar que camundongos C57BU6 imunizados com os macrófagos J774-hsp65 não foram protegidos pela infecção por *M. tuberculosis*, demonstrando que a imunização era restringida pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC), uma vez que as células J774 são H-2Kd e os camundongos C57BU6 são H-2Kb (11). Além disso, camundongos BALB/c não foram protegidos contra infecção por *Listeria monocytogenes*, mostrando também a especificidade da imunização (11).

Uma vez demonstrado que a imunização dos animais com as células J774-hsp65 conferia proteção contra posterior infecção por micobactérias, passamos a estudar se a transferência adotiva de linfócitos T hsp65-específicos obtidos dos animais vacinados também induzia proteção contra infecção por *M. tuberculosis* em animais irradiados e não vacinados. Os linfócitos T CD4, T CD8 e Ty/S dos animais imunizados foram separados por seleção negativa com anticorpos específicos, seguido de lise por componentes do sistema complemento. As diversas subpopulações de linfócitos T obtidas foram incubadas na presença da célula J774-hsp65 irradiada, as quais serviram como fonte de antígeno hsp65 e ao mesmo tempo como células apresentadoras para permitir a multiplicação dos linfócitos hsp65-específicos *in vitro*. Em seguida, após a multiplicação desses linfócitos, as células foram transferidas adotivamente para outros animais irradiados e não imunizados, e concomitantemente infectados com *M. tuberculosis* ou

Listeria. Os resultados demonstraram que as subpopulações dos três fenótipos de células T tinham a capacidade de induzir especificamente proteção aos animais contra a infecção micobacteriana (redução em 18% do número de micobactérias pela transferência de células CD4; 38% para CD8; e 16% para I); os efeitos observados eram aditivos quando eram feitas transferências simultâneas de dois ou três tipos celulares (53% para CD4 + CD8; 25% para CD4 + γ/δ ; 48% para CD8 + γ/δ ; 60% para a transferência concomitante dos três tipos celulares) (11). A célula que mostrou isoladamente ser a mais eficiente foi a do fenótipo T CD8, que também tinha a capacidade de lisar especificamente células macrofágicas infectadas com micobactérias, de maneira específica e restrita pelo MHC (9-11).

Após demonstrarmos que a proteção efetiva contra infecção por *M. tuberculosis* ocorria principalmente com a transferência adotiva de linfócitos T CD8 citotóxicos, procuramos determinar comparativamente com outros modelos de imunização, a frequência com que os linfócitos T CD4 e T CD8 hsp65-específicos estão presentes nos animais imunizados. A frequência de células T CD8 específicas para hsp65 foi significativamente mais alta nos animais imunizados com células J774-hsp65 estando em torno de 1:100. Nos animais vacinados com BCG ou com hsp65 recombinante na presença de adjuvante, o aparecimento das células T CD8 específicas ficou respectivamente em torno de 1:2960 e 1:25950 (8, 12). Estes experimentos deixaram claro que a disponibilidade do antígeno endógeno em células APC mimetizando a infecção por micobactérias, permite uma melhor interação desses antígenos com as moléculas de classe I do MHC e, conseqüentemente, estimulação de células T CD8 e proteção efetiva contra infecção por *M. tuberculosis*. Estes resultados permitem ainda especular que, a liberação dos bacilos do ambiente intracelular após a fagocitose dos mesmos, para o meio extracelular pela ação das células T CD8 citotóxicas específicas, seria de extrema importância para a ação antibactericida de macrófagos recém-migrados, os quais seriam estimulados por interleucinas resultantes da ativação das células T CD4, ou mesmo T CD8, como mostrado em nossos trabalhos (8-14).

Para um melhor entendimento do mecanismo imune efetor envolvido na proteção contra infecção micobacteriana, um total de doze clones de cada uma das subpopulações de células T CD4 e CD8 obtidos dos experimentos acima realizados foram caracterizados pormenorizadamente quanto: (i) à especificidade antigênica; (ii) restrição pelo MHC; (iii) apresentação antigênica via moléculas de classe I ou classe II; (iv) padrão de secreção de interleucinas; (v) atividade citotóxica; e (vi) transferência adotiva de imunidade específica para animais não imunizados. O principal objetivo era estabelecer quais desses parâmetros melhor se correlacionariam com a efetiva proteção contra infecção por *M. tuberculosis* (12). Inicialmente, os doze clones CD4 hsp65-específicos foram estudados comparativamente quanto às suas habilidades de proliferarem na presença ou ausência de hsp65 ou PPD, e quanto aos efeitos de inibidores do processamento e apresentação antigênica. Os clones não proliferaram na presença de células apresentadoras sem a proteína hsp65. A adição de BSA ou PPD também não induziu proliferação. A alta proliferação na presença de células J774-hsp65 como apresentadoras de antígenos foi inibida por cloroquina, que bloqueia o processamento do antígeno para apresentação via moléculas de classe II do MHC, e também por anticorpos monoclonais contra moléculas de classe II do haplotipo I-Ad ou contra CD4. Anticorpos irrelevantes ou contra moléculas de classe I, CD8 ou contra I-Ak, não inibiram a proliferação. Por outro lado, os clones CD8 foram caracterizados quanto à citotoxicidade (13). Dez dos doze clones apresentaram citotoxicidade para células J774-hsp65 que têm capacidade de apresentarem antígenos via moléculas de classe I. A citotoxicidade foi inibida por brefeldin A que bloqueia a apresentação de antígenos via classe I, e não por cloroquina que bloqueia a apresentação de antígenos via moléculas de classe II. Além disso, a citotoxicidade foi inibida por anticorpos anti-CD8 e anti-H-2Kd e não por anti-CD4 e anti-H-2Kk. Cinco dos 12 clones CD4 também apresentaram toxicidade para células J774-hsp65 ou para células J774 não transfectadas mas acrescidas de hsp65 exógena (12). Estes resultados demonstraram

que tanto os clones CD4 quanto os CD8 reconhecem antígenos de maneira clássica, via moléculas de classe II ou classe I, respectivamente, e de maneira restrita às moléculas do MHC.

Devido ao fato da produção de IFN- γ pelos linfócitos T estar associada com boa resposta imune celular contra patógenos (padrão de resposta imune tipo Th1) e a produção de IL-4 estar associada com resposta imune humoral (padrão de resposta imune tipo Th2) nós estudamos o padrão de secreção dessas interleucinas nos doze clones CD4 ou CD8 quando submetidos a estimulação com antígeno específico ou sob estimulação com anti-CD3 ou PMA (13). Quanto à produção de citocinas, três dos doze clones CD4 não produziam IFN- γ mas produziam IL-4. Um outro clone produzia IFN- γ e pequena quantidade de IL-4. Todos os outros oito clones produziram somente IFN- γ . Quanto aos clones CD8, dez entre doze deles produziram IFN- γ em grandes quantidades. Quatro clones produziam IL-4 e dois deles produziam IFN- γ em pequena quantidade. Uma vez determinadas as características de citotoxicidade, especificidades antigênicas, frequências de reatividade e o padrão de secreção de interleucinas pelos clones CD4 e CD8, passamos a estudar a atividade antimicobacteriana dessas células hsp65-específicas. O objetivo era estabelecer correlações entre subpopulações de linfócitos, produção de interleucinas e citotoxicidade, com proteção efetiva contra infecção por *M. tuberculosis* (12,14). Todos os clones CD8 e sete dos clones CD4 citotóxicos foram testados, e tiveram a habilidade de lisar macrófagos peritoneais infectados com *M. tuberculosis*, mas não aqueles infectados com *Listeria*. Lise celular específica ocorreu em macrófagos provenientes de camundongos BALB/c e não naqueles obtidos da linhagem C57BV6, denotando lise celular restrita pelo MHC. Em seguida, alguns clones CD4 e CD8 com atividades citotóxicas e produção de interleucinas variáveis, foram analisados quanto à contribuição que as interleucinas e a citotoxicidade podem desempenhar na proteção contra infecção por *M. tuberculosis*. Inicialmente foram verificadas as ações dos sobrenadantes das culturas dos clones de células T (ou seja, a composição de citocinas

desses sobrenadantes) sobre a estimulação de cultura de macrófagos de medula óssea para eliminação da infecção micobacteriana. Sobrenadantes de quatro dos clones testados, os quais eram produtores de IFN- γ , foram efetivos em diminuir em torno de 30 a 40%, o número de micobactérias intracelulares, quando comparados com macrófagos controles não tratados ou com aqueles tratados com sobrenadantes de clones produtores de IL-4. A capacidade dos sobrenadantes provenientes de clones produtores de IFN- γ de induzir ação micobactericida foi suprimida pela adição de anticorpo anti-IFN- γ . Estes resultados indicaram que o IFN- γ têm contribuição modesta na proteção contra infecção por *M. tuberculosis*. Em outra série de experimentos, clones CD4 e CD8 com atividade citotóxica foram incubados diretamente com os macrófagos infectados, sendo que houve redução entre 22 a 80% do número de micobactérias intracelulares, mesmo na ausência de estimuladores como o IFN- γ (quando comparados com macrófagos expostos a clones CD4 ou CD8 inespecíficos).

Os resultados demonstraram que a atividade citotóxica direta dos linfócitos T sobre os macrófagos infectados têm papel preponderante na proteção contra infecção por *M. tuberculosis*, sendo os clones mais efetivos aqueles de fenótipo CD8 (13,14).

Além da demonstração da atividade antimicobacteriana dos sobrenadantes e da ação direta dos clones de linfócitos T sobre macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, os diversos clones de linfócitos T CD4 e CD8 com reatividade específica para hsp65, também foram utilizados em experimentos de transferência adotiva para animais não imunizados.

A finalidade deste ensaio foi verificar quais dos clones realmente transferem proteção imunológica efetiva contra infecção por *M. tuberculosis* (12,14). Camundongos BALB/c foram inoculados iv com 5×10^6 células T seguido de inoculação de 1×10^8 UFC de *M. tuberculosis*. Outro grupo de camundongos também recebeu tratamento iv com anticorpos anti-IFN- γ 2 dias e imediatamente antes da transferência adotiva, seguido de inoculações do anticorpo a cada 4 dias de intervalo. O clone que apresentou maior proteção (CD8.4) reduziu o crescimento bacteriano em 99%, tinha fenótipo CD8 e apresentava citotoxicidade e

produzia IFN- γ . Nos animais tratados com anti-IFN- γ , o clone CD8.4 teve ação protetora pouco reduzida. Um outro clone (CD8.5) que também apresentou alta atividade protetora (94%) não produzia IFN- γ mas sim IL-4, e não teve atividade protetora reduzida naqueles animais tratados com anti-IFN- γ . Já o clone CD8.8 que tinha alta produção de IFN- γ e baixa atividade citotóxica, apresentou ação protetora moderada, uma vez que reduziu somente em torno de 30% o número de bacilos nos órgãos dos animais infectados. Este efeito foi neutralizado nos animais infectados e tratados com anti-IFN- γ . O mesmo padrão de proteção imunológica foi obtido com a transferência adotiva dos clones CD4, embora com magnitude menor que a demonstrada pelos clones CD8. Clones CD4 não citotóxicos e produtores de IFN- γ tiveram baixa ação protetora (34%) e seus efeitos foram bloqueados pelo tratamento dos animais infectados com anti-IFN- γ . Clones CD4 que não eram citotóxicos nem produziam IFN- γ não tinham nenhum efeito protetor. Comparando-se os resultados obtidos com esses clones representativos, ficou evidente que a proteção contra infecção micobacteriana está associado com duas propriedades: (i) um efeito modesto devido a produção de IFN- γ e que pode ser neutralizado por anti-IFN- γ ; (ii) e um efeito altamente protetor associado com a citotoxicidade, principalmente de linfócitos T CD8. Portanto, o efeito protetor contra infecção por *M. tuberculosis* depende de imunidade celular específica resultante da estimulação de células T CD8 produtoras de IFN- γ , sendo que este estado de ativação depende fundamentalmente da disponibilidade de antígenos endógenos complexados à moléculas de classe I do MHC em células apresentadoras de antígenos.

Apesar de termos obtido bons índices de proteção efetiva contra infecta., por *M. tuberculosis* usando macrófagos transfectados para imunização, em termos práticos a metodologia de transfecção celular é onerosa e de difícil manipulação. Assim, em continuidade às nossas investigações utilizamos outros métodos de imunização, visando a praticidade e a manutenção da eficiência. Dois novos métodos foram testados com essa finalidade. Um deles utilizava injeção intramuscular de ácidos nucleicos (imunização com DNA) que

codificam antígenos micobacterianos e o outro a inoculação de vesículas lipossomais contendo antígenos encapsulados.

A utilização de DNA para imunizações está sendo considerada atualmente como a vacina de terceira geração (15). Nas vacinas de primeira geração foram utilizados microrganismos totais, atenuados ou mortos, como o da poliomielite e da varíola, que induzem estimulação tanto de células T CD8 citotóxicas quanto de T CD4 auxiliares, além da imunidade humoral. Embora remoto, o maior risco dessas vacinas é a possibilidade de reversão desses agentes para a forma patogênica (15). As vacinas utilizando microrganismos mortos não correm este risco, mas elas somente são capazes de gerar resposta imune celular com linfócitos T CD4 e imunidade humoral, sem induzirem especificamente linfócitos T CD8 citotóxicos (15). De forma semelhante, vacinação com componentes proteicos definidos (vacinas de segunda geração) como a toxina tetânica ou diftérica, ou mesmo antígenos recombinantes como o da hepatite B, também não induzem linfócitos T CD8 citotóxicos. As vacinas utilizando ácidos nucleicos são capazes de induzir ambos os tipos de resposta imune protetora, inclusive a estimulação de linfócitos T CD8 citotóxicos (15), sem o risco associado às vacinas de organismos vivos. A tecnologia é relativamente simples, pois o DNA ou RNA apropriadamente preparado é levado diretamente às células do organismo a ser imunizado, onde eles são incorporados, ocorrendo posteriormente a expressão dos produtos desses genes. A expressão endógena dos produtos gênicos induz subsequentemente resposta imune protetora no hospedeiro. Embora, as vacinas de DNA estejam sendo testadas predominantemente quanto à proteção nas infecções virais, essas vacinas podem ter um efeito protetor significativo contra infecções bacterianas, fúngicas e mesmo parasitárias (15).

Para os estudos iniciais de vacinação com DNA nós introduzimos o gene da proteína hsp65 nos plasmídeos pCDNA3 (com promotor do citomegalovírus) e pHMG (com promotor da hidróxi-metil-glutaril-CoA-redutase) (8,9,14). Ambos promotores efetivamente dirigem a expressão de genes micobacterianos em células de mamíferos. Utilizando um protocolo padrão de imunização, diferentes DNAs foram

inoculados por via intramuscular (quadriceps) em camundongos (50 µg na perna esquerda e 50 µg na perna direita, por 4 vezes em intervalos de 3 semanas cada uma). Animais controles receberam somente plasmídeos (controle negativo), proteína hsp65 em salina ou em adjuvante incompleto de Freund, ou uma simples inoculação de BCG intradérmico (controle positivo). Nos camundongos imunizados com o DNA hsp65, a resposta da produção de anticorpos específicos foi observada 2 semanas após a terceira dose de DNA, além de intensa resposta linfoproliferativa dos esplenócitos na presença de hsp65. Nos sobrenadantes dos ensaios de linfoproliferação dos animais imunizados, empregando ELISA, foi detectada a presença de IFN-γ e não de IL-4, indicando estimulação preferencial de células T do tipo Th1. Em outra análise mais pormenorizada, utilizando-se de linfócitos T de nódulos linfáticos, foi observado por RT-PCR a presença de IFN-γ e IL-12 e não foram detectadas as interleucinas IL-4, IL-10 ou IL-13 (14).

Este protocolo padrão de imunização com DNA hsp65 foi altamente efetivo para proteger os animais imunizados contra posterior infecção com *M. tuberculosis*, sendo o efeito protetor muito semelhante aquele apresentado pelos animais imunizados com BCG viável (14).

Com base nestes dados, foram clonados outros antígenos micobacterianos (hsp70, hsp10, 36 kDa e 6 kDa) nos plasmídeos pCDNA3 e pHMG e posteriormente testadas as suas atividades protetoras. Os DNAs que codificam os antígenos hsp70 e 6 kDa induziram proteção significativa, porém menor que aquela mostrada por hsp65. Por outro lado, imunização com DNA de hsp10 e 36 kDa não mostraram atividade protetora contra infecção por *M. tuberculosis*. Em resumo, estes estudos demonstraram que as inoculações dos DNAs que codificam os genes das proteínas imunogênicas hsp65, hsp70 e 6 kDa por via intramuscular, associado aos promotores do citomegalovírus e da hidróxi-metil-glutaril-CoA redutase, conferem proteção significativa contra infecção por *M. tuberculosis* em camundongos (8,9,14).

Baseado nos dados acima obtidos e com o intuito de que os conhecimentos provenientes de nossos trabalhos possam num futuro próximo, serem utilizados no delineamento de

uma vacina a ser empregada em humanos, realizamos outra série de experimentos com o objetivo de estabelecer correlações fundamentais entre diferentes sistemas de imunizações. Assim, foram inoculadas em camundongos preparações de: (i) antígenos micobacterianos emulsionados em adjuvantes; (ii) antígenos encapsulados em lipossomos (16); (iii) DNAs que codificam antígenos proteicos; (iv) macrófagos transfectados com os genes desses antígenos; e (v) BCG viável intra-dérmico. Após as devidas imunizações foi observado que a vacina mais efetiva era aquela constituída pela inoculação com moléculas de DNA que codificam antígenos micobacterianos.

Essa vacina teve a propriedade de estimular resposta imune humoral e celular, principalmente pela estimulação de células T CD8 com padrão de secreção de interleucinas tipo Th1; e mesmo após 8 meses do término da vacinação, ainda ocorria proteção efetiva (54%) contra infecção por *M. tuberculosis* e com alta porcentagem de células de memória com fenótipo CD44hi e L-selectinlow detectadas por FACScan.

Os resultados obtidos em nossos trabalhos prévios podem ser considerados de grande relevância uma vez que estão proporcionando uma mudança conceitual profunda sobre proteção contra infecção micobacteriana. Com a utilização de uma única espécie de molécula antigênica conseguiu-se proteção altamente efetiva contra *M. tubercu-*

losis virulenta. Para se conseguir este grau de proteção não foi necessária a utilização de uma coleção de antígenos, como aquela observada na imunização com o BCG viável. Também foi estabelecido neste trabalho um excelente modelo experimental para identificar outros antígenos que conferem proteção realmente efetiva, desde que apropriadamente administrados. Além disso, os genes de um grande número de antígenos micobacterianos podem ser transfectados ou clonados e testados individualmente ou em combinação quanto às atividades protetoras. Este fato apresenta grande importância uma vez que as proteínas empregadas na execução deste trabalho possam não ser os melhores antígenos imunogênicos. Assim, talvez tenhamos que ampliar nossos estudos e incluir vários outros fragmentos antigênicos para produção de uma vacina que seja capaz de sensibilizar uma população altamente polimórfica a nível de FILA, posto que nem todos os indivíduos respondem da mesma maneira para um simples determinante antigênico. Os modelos desenvolvidos neste trabalho também permitem identificar quais as características essenciais do sistema imune que estão envolvidas na proteção contra infecção por *M. tuberculosis*, e aquelas que poderiam ser induzidas de modo a se obter uma efetiva proteção em modelo experimental e em humanos contra a tuberculose.

BIBLIOGRAFIA

- 1- SILVA CL, Palacios A., Colston M.J. and Lowrie D.B. *Mycobacterium leprae* 65hsp antigen expressed from a retroviral vector in a macrophage cell line Is presented to T cells in association with MHC class II in addition to MHC class I. **Microbial Pathogenesis**, 12: 27-38, 1992.
- 2- SILVA C.L., Lukacs K., Lowrie D.B. Major histocompatibility complex non-restricted presentation to CD4+ T-lymphocytes of *Mycobacterium leprae* heat-shock protein 65 antigen by macrophages transfected with the mycobacterial gene. **Immunology**, 78: 35-42, 1993.
- 3- LOWRIE D.B., Tascon R.E., Colston M.J., Silva C.L. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. **Vaccine**, 12: 1537-1540, 1994.
- 4- SILVA C.L., Lowrie D.B. A single mycobacterial protein (hsp65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. **Immunology**, 82: 244-248, 1994.
- 5- SILVA C.L., Silva M.F., Pietro R.C.L.R., Lowrie D.B. Protection against tuberculosis by passive transfer with T cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. **Immunology**, 83: 341-346, 1994.
- 6- SILVA C.L., Pietro R.C.L.R., Januário A., Bonato V.L.D., Lima V.M.F., Silva M.F., Lowrie D.B. Protection against tuberculosis by bone marrow cells expressing mycobacterial hsp65. **Immunology**, 86: 519-524, 1995.
- 7- SILVA C.L. New vaccines against tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 28: 843-851, 1995.

- 8- LOWRIE D.B., Tascon R.E., Silva C.L. Vaccination against Tuberculosis. **International Archives of Allergy and Immunology**, 108: 309-312, 1995.
- 9- SILVA C.L., Silva M.F., Pietro R.C.L.R., Lowrie D.B. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. **Infection and Immunity**, 64: 2400-2407 1996.
- 10- LOWRIE D.B., C.L. Silva, Colston M.J., Ragno S., Tascon R.E. Protection against tuberculosis by plasmid DNA. **Vaccine**, 15: 834-838, 1997.
- 11- LOWRIE D.B., Silva C.L., Colston M.J., Tascon R.E.. DNA encoding individual mycobacterial antigens protects mice against tuberculosis. **Vaccine**, 1997, in press.
- 12- BONATO V.L.D., Lima V.M.F., Tascon R.E., Lowrie D.B., Silva C.L.. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. **Infection and Immunity**, 1997, in press.
- 13- SILVA C.L., Lowrie D.B., Tascon R.E., Lima V.M.F., Bonato V.L.D. T cell phenotypic changes associated with persistent protection against tuberculosis after DNA immunization. **Infection and Immunity**, 1997, in press.