



O que há de novo em vacinas contra tuberculose?

What's new about tuberculosis vaccines?

Lina Andrea Gómez¹, Antonio Condino Neto²

Resumo

Objetivo: Revisar a informação publicada nos últimos 15 anos sobre a vacina BCG, a resposta imunológica ao *M. tuberculosis* e as vacinas que estão sendo desenvolvidas para combater a doença.

Métodos: Foi realizada revisão sistemática em livros e na literatura publicada no Medline, a partir do ano de 1990. Foram selecionados artigos que abordassem o tema, "Vacinas contra TB" nos aspectos: resposta imune humoral e celular, novas vacinas, e proteção.

Resultados: Foram selecionados artigos originais ou capítulos de livros que abordaram este tema. Observou-se efetividade da vacina BCG contra TB em muitas populações, mas não em outras. Devido às diversas limitações da BCG, o desenvolvimento de uma vacina mais efetiva é considerada uma prioridade em saúde pública no mundo. As vacinas e as estratégias em desenvolvimento incluem células vivas totais, células totais inativadas, subunidades e vacinas de DNA.

Conclusões: A maioria dos humanos infectados com *M. tuberculosis* consegue gerar uma resposta imune que evita o desenvolvimento da doença. Algumas vacinas previnem a TB, indicando que uma vacina mais efetiva contra TB é uma realidade possível. Ao se propor a substituição da vacina da BCG, será necessário demonstrar que a nova vacina pode ao menos igualar a eficácia da BCG na proteção da tuberculose.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2006; 29(1):09-13 BCG, Vacinas, Tuberculose.

Abstract

Aim: To review published data and information about BCG, the immune response against *M. tuberculosis*, and vaccines that had been used to prevent the disease during the last 15 years.

Methods: A systemic review of the literature was accomplished based on Medline data bank starting from 1990. Original articles about "TB vaccines", discussing humoral and cellular responses to Tuberculosis, and new vaccines were selected.

Results: Original articles or book chapters were selected. We could observe the efficacy of BCG vaccine in several populations. Because of the limitations of BCG vaccine, the development of a better vaccine against tuberculosis is considered a public healthy priority in the world. Strategies under current investigation include the synthesis of whole cell live attenuated mycobacterial vaccines, DNA vaccines, as well as the use of individual antigens delivered by a variety of subunit vaccination procedures.

Conclusion: The natural immune response to *M. tuberculosis* results in a good level of protection, some vaccines against tuberculosis had been shown to prevent the disease, suggesting that a more effectiveness vaccine is a possible reality. Before the substitution of BCG vaccine it will be necessary to demonstrate that the new vaccine has at least the same efficacy of the BCG vaccine.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2006; 29(1): 09-13 BCG vaccine, vaccines, tuberculosis

Introdução

A tuberculose (TB) é a infecção bacteriana mais importante no mundo. Segundo a OMS, estima-se que um terço da população mundial já tenha se infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis*: anualmente nove milhões de casos novos, três milhões de mortes e 95% dos casos em países do terceiro mundo.

A partir de 1952 observou-se redução no número de casos devido às melhorias socioeconômicas e ao tratamento com antibióticos. Durante os anos 90, mantém-se numa situação endêmica estável. A imunização com *Mycobacterium bovis*, BGC (bacilo de Calmette-Guerin), diminuiu o impacto da doença em algumas áreas. Contudo a BCG tem numerosas limitações e o desenvolvimento de uma vacina mais eficaz contra a TB é considerada uma prioridade de saúde pública internacional.

As principais vacinas em desenvolvimento incluem vacinas com células vivas, inativadas, vacinas de subunidades,

e DNA, sendo esta última uma das mais promissoras. O presente trabalho revisa os esforços feitos na última década no desenvolvimento de uma vacina mais efetiva do que a BCG.

Desenvolvimento e eficácia da vacina BCG

Estima-se que atualmente 60 milhões de pessoas apresentem infecção ativa da TB¹⁻². No período de 2000-20 outro bilhão de pessoas desenvolverá TB e 35 milhões poderão morrer pela doença. A cada minuto mais de dez indivíduos desenvolvem a doença, colocando a TB na desfavorável lista das piores doenças, junto com a AIDS e a malária. A situação se agrava com o aumento da incidência de cepas multi-resistentes às drogas e a perigosa combinação de TB com AIDS, a incidência da TB tem aumentado pela pandemia HIV/AIDS. A co-infecção com HIV é um grande fator de risco para progressão de infecção com *M. tuberculosis* para infecção ativa³.

1. Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), lgoomez@fcm.unicamp.br

2. Professor Associado e Livre-Docente do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Pesquisador do Centro de Investigação em Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

A primeira vacina registrada contra TB foi derivada de uma cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada através dos anos por diferentes repiques de cultura por Calmette e Guérin no instituto Pasteur na França, sendo administrada pela primeira vez em humanos em 1921⁴. A BCG é uma vacina bem estudada, mas a maioria dos estudos mostra resultados contraditórios sobre sua eficácia, variando de 0% a 80% de proteção⁵, acirrando o debate sobre a eficácia atual da vacina⁶.

A meta-análise feita com 14 estudos prospectivos e doze estudos caso-controle sobre da eficiência da BCG indicou que a vacinação com BCG reduz o risco de TB em 50%. Esse nível de proteção persiste através de subgrupos de estudos definidos por idade de vacinação e desenho do estudo. A idade de vacinação não foi um fator preditivo significativo da eficácia da BCG. A vacinação com BCG foi significativamente associada à redução de TB pulmonar e extra pulmonar. Em geral, o resultado da meta-análise conclui a favor do uso da vacina BCG⁷. Mais devido às diversas limitações da BCG, o desenvolvimento de uma vaci-

na mais efetiva é considerado uma prioridade em saúde pública no mundo⁸. A tabela 1 ilustra as principais características da BCG.

A resposta imunológica contra o *M. tuberculosis*

Existe uma série de problemas no desenvolvimento de vacinas contra a TB, o primeiro deles é que a infecção por *M. tuberculosis* não induz imunidade capaz de eliminar o antígeno e proteger o organismo contra a re-infecção. O pulmão é geralmente a porta de entrada da *M. tuberculosis*, provendo vantagens para a replicação lenta do patógeno. A infecção se estabelece nos macrófagos alveolares, embora linfócitos específicos sejam eventualmente ativadas nos linfonodos e recrutados até o sítio da infecção, eles não conseguem erradicar a infecção, e isto é devido em parte à inibição dos macrófagos e à resposta inflamatória no pulmão, e também aos vários mecanismos de evasão imunológica que a micobactéria adquiriu para sobreviver durante a infecção crônica no hospedeiro⁹.

Tabela 1 - Características da BCG

Características positivas	<ul style="list-style-type: none"> • Em recém nascidos a imunização é eficaz contra a doença e morte devido à tuberculose infantil • A imunização é efetiva contra as formas bacterêmicas da tuberculose como tuberculose miliar e meningea. • Baixo custo
Características negativas	<ul style="list-style-type: none"> • Variação entre as vacinas • Não tem proteção contra TB pulmonar em adultos • Ausência de marcadores de proteção • BCG adenite ou osteomielite em receptores sadios • BCG disseminada em receptores infetados com HIV • Ausência de efeito duradouro • Requerimento de imunização parenteral
Desconhecidas	<ul style="list-style-type: none"> • Duração da eficácia • Eficiência contra TB pulmonar e bacterêmica em pacientes com infecção pelo HIV

Um terceiro fator é a complexidade da resposta imune do hospedeiro a *M. tuberculosis*. Ao entrar nos macrófagos, os antígenos são processados pela maquinária codificada pelo complexo de histocompatibilidade de classe II, ativando as células T CD4+ específicas para *M. tuberculosis*¹⁰. Têm-se evidências da participação adicional das células T CD8+ restritas ao MHC I, embora as células CD4+ têm papel decisivo na resposta imune protetora contra TB, as células T CD8+ são também necessárias. Adicionalmente, células T não convencionais, chamadas células T $\gamma\delta$ e células T $\alpha\beta$ restritas ao CD1 participam, conferindo maior proteção. Em contraste com *M. tuberculosis*, a BCG falha ao estimular adequadamente as células T CD8+, provavelmente por ter perdido citolisinas essenciais¹¹.

A resposta protetora das células T CD4+ em TB ativa em humanos é do tipo Th1, com a secreção característica

de citocinas como INF- γ , IL-12, IL-2 e INF- α , ativando macrófagos que matam as micobactérias durante a fagocitose. As bactérias que não são destruídas por esse processo têm sua multiplicação inibida dentro de macrófagos ativados por INF- γ . Uma função que subsidia esse fato é feita pelos linfócitos T CD8+ que libertam bactérias intracelulares de células infectadas, podendo ser destruídas durante a fagocitose por macrófagos ativados¹¹⁻¹⁰.

Sabe-se que o INF- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e que células T reativas para micobactérias lisam macrófagos infectados, isso poderia promover a libertação de micobactérias de macrófagos incapacitados para monócitos melhor capacitados. Embora as células T CD4+ tenham o maior papel na construção de uma ótima resposta imune contra tuberculose, as células T CD8+ também são necessárias¹².

Um último fator que poderia explicar a variabilidade da resposta a BCG é a variação genética herdada na resposta imune a micobactéria. Existe um número de genes que influenciam a função dos macrófagos como os genes para o nRAMP e o receptor da vitamina D3, assim como o HLA e outros loci².

O que se sabe sobre a BCG

Desde o começo do século tem-se reconhecido que a imunização com micobactérias vivas em modelos animais oferece maior proteção que as formulações com a mesma bactéria morta. Isto pode ser devido ao fato que o repertório de antígenos expressos pelos microorganismos vivos dentro do hospedeiro é diferente dos antígenos expressos pelas micobactérias mortas¹³. Os antígenos secretados pelas micobactérias vivas estão geralmente ausentes em preparações de bactérias mortas podendo demonstrar que têm um importante papel como alvos na resposta imune durante o começo da infecção¹⁴.

A efetividade da vacina BCG contra TB em algumas populações indica que clinicamente pode alcançar proteção significativa. O entendimento das grandes diferenças na proteção entre populações pode contribuir para o conhecimento de como futuras vacinas deveriam ser usadas¹⁵. Dado que as células T são a proteção central contra a TB, o desenho de futuras vacinas deve focar-se a população de linfócitos T, mas é importante lembrar que a maioria das vacinas de sucesso usadas até agora trabalham através de anticorpos ao invés de células T. A maioria das vacinas permite o estabelecimento do patógeno no hospedeiro, mas previnem seus efeitos danosos¹¹.

Vacinas antituberculose têm gerado grandes avanços nos últimos cinco anos, o genoma da *M. tuberculosis* e de outras micobactérias tem sido sequenciado. As deleções genéticas da sequência da *M. bovis* feitas durante sua inicial e subsequente atenuação até BCG, tem sido identificadas¹⁶. Esses e outros avanços têm permitido o estabelecimento de quais são as características que uma vacina contra TB deveria ter. (Tabela 2)

Tabela 2 - Características desejáveis de uma vacina para prevenção de Tuberculose.

-
- Indução de resposta humoral e celular
 - Imunogenicidade tanto em recém nascido quanto em adultos
 - Eficiência contra infecção primária, incluindo a doença pulmonar e bacteremia (meningeal, disseminada)
 - Eficiência contra reativação da doença
 - Duração prolongada da imunidade
 - Segurança em recém-nascidos, adultos e pessoas imunossuprimidas
 - Baixo custo
-

Vacinas em desenvolvimento

As vacinas e as estratégias em desenvolvimento incluem células vivas totais, células totais inativadas, subunidades e vacinas de DNA.

BCG atenuada

É um tipo de vacina viva, esse tipo de vacina tem sido desenvolvida depois da análise do genoma bacteriano para genes com função conhecida, sendo possível à inativação de genes específicos. São cepas de micobactérias vivas (BCG ou *M. tuberculosis*) nas quais as vias de bio-síntese

de aminoácidos e outros componentes essenciais têm sido desabilitados⁷. Como a BCG padrão, essas cepas nutricionalmente deficientes podem produzir infecção ativa em hospedeiros mamíferos, mas a duração da replicação é limitada. Estudos demonstraram que camundongos imunodeficientes morreram depois da imunização com cepas padrão de BCG, mas não depois da imunização com cepas auxotróficas de BCG¹⁷.

Vacinas inativadas com células totais

É uma vacina derivada de *Mycobacterium vaccae*, protetora contra tuberculose em modelos animais e gera resposta citotóxica específica contra micobactéria. Vários estudos feitos em humanos têm mostrado que *M. vaccae*, é segura e estimula a produção de anticorpos específicos contra micobactéria, proliferação linfocitária e produção de INF- γ , tanto em indivíduos sadios quanto em infetados com HIV¹³.

BCG recombinante

A vacina original da BCG tem sido manipulada para produzir cepas de BCG recombinante (BCGr), que expressam genes externos da micobactéria, de outros patógenos assim como moléculas imunoreguladoras. As vantagens com esse tipo de vacinas vivas incluem a capacidade de se replicar no hospedeiro e as propriedades inerentes da parede celular da micobactéria, os quais podem estimular por mais tempo a resposta das células T de memória. Ademais elas apresentam um grande repertório de antígenos os quais podem estimular células T CD4+ e CD8+, células T $\alpha\beta$ não-convencionais e células T $\gamma\delta$ restritas a CD1 as quais reconhecem antígenos não protéicos, aparentemente participam para produzir uma ótima proteção. A BCG falha ao não estimular adequadamente células T CD8+, devido provavelmente a perda de citolisinas essenciais². A desvantagem é o fato de ser uma vacina viva, que sua replicação seja incontrolável em hospedeiros imunodeficientes, particularmente sujeitos infectados com HIV, outras desvantagens são instabilidade genética, e possível dano tecidual¹⁸.

Tem sido feitas vacinas da BCG recombinantes que expressam citolisinas, outras que hiper expressam antígenos, ou combinação de vacinas, BCGr que coexpressa imunomodulador mais antígeno. Entre outras vacinas estão as vacinas a partir de *M. tuberculosis* com mutações e *M. tuberculosis* recombinante com mutações e expressando imunomoduladores¹¹.

Vacinas de DNA

Com o recente sequenciamento do genoma da *M. tuberculosis* e o aumento da informação sobre a expressão de genes através de análise de transcriptoma e proteosoma, a porta para procura de antígenos protetores foi aberto. A técnica de *microarrays* tem revelado 129 "open reading frames" (ORF) da *M. tuberculosis* que estão ausentes no genoma das cepas da vacina da BCG. A vacinação com DNA envolve imunização com plasmídeos de DNA que contém um antígeno da vacina que codifica a sequência de um gene baixo um promotor eucariótico. A imunização resulta na transfecção de células do hospedeiro e produção endógena do antígeno da vacina. Essa vacina tem mostrado eficiência estimulando a resposta imune celular e humoral principalmente em camundongos, é uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de vacinas já que a manipulação e produção de construtos de vacinas são fáceis e permitem fazer um *screening* amplo de candidatos para antígenos de vacinas^{19,13}.

Vários antígenos imunodominantes são reconhecidos por indivíduos infectados de diferentes origens étnicas e são candidatos para a inclusão das vacinas de subunidades. Epítomos de células T CD4+ quanto de CD8+ tem sido identificadas sobre aquelas proteínas e isto pode ser utilizado para avaliar a resposta contra vacinas incorporando

os antígenos. As vantagens das vacinas liberadas como proteínas o DNA em vetores virais que não se replicam, incluem a segurança e ausência de dano tecidual. Isso permite sua utilização repetida em altas doses para manter a memória das células T¹².

A seqüência do genoma tem disponibilizado a caracterização das proteínas das micobactérias, as quais estimulam a resposta das células T em humanos e ratos durante a infecção por *M. tuberculosis*, os estudos das vacinas de DNA estão baseados nestes fatos²⁰.

Os antígenos de micobactérias incorporados em vetores de DNA mais estudados são os antígenos que expressam a proteína Ag85A da *M. tuberculosis* (complexo do antígeno 85 que é uma família de três micolil transferasas com homologies em todas as espécies de micobactérias), as proteínas restritas ao complexo da *M. tuberculosis* como ESAT-6 e proteínas de choque térmico (Hsp)65 e Hsp60 apresentam resultados promissores em modelos animais nos quais se desafiavam estes animais com *M. tuberculosis*^{18,21}.

Recentemente a fusão das proteínas Ag85B e ESAT-6 demonstrou ser mais efetiva que qualquer delas sozinha, possivelmente devido ao aumento da estabilidade dos epítomos de ESAT-6. Neste estudo os camundongos tiveram uma proteção igual a BCG, com imunidade de memória de mais de 30 semanas²⁰. O complexo Ag85 induz forte proliferação de células T e produção de INF- γ na maioria de indivíduos saudáveis infetados com *M. tuberculosis* ou *M. leprae* e em humanos e camundongos vacinados com BCG²²⁻²³, fazendo-os promissórios candidatos como antígenos protetores. Um estudo demonstra que vacinação intramuscular (im) com DNA plasmídico codificando para Ag85A induz forte resposta imune mediada por células e humoral²⁴.

Estudos demonstram que a imunização com DNA-Ag85A produz uma forte resposta Th1 com células T CD4+ secretando INF- γ , e altos títulos de anticorpos específicos IgG, e sem resposta IL-4. Em contraste com a BCG, a imunização com DNA induz também produção de células T CD8+ citolíticas e secretoras de INF- γ , isso poderia contribuir a sua eficiência, já que células T CD8+ secretoras de INF- γ são essenciais para proteção contra a infecção por *M. tuberculosis*. É por isso que qualquer antígeno(s) candidato deveria conter epítomos tanto para células T CD4+ quanto para CD8+, os quais poderiam ser apresentados por múltiplos haplótipos de MHC.

As proteínas de choque térmico (hsps) têm vários papéis importantes na ativação do sistema imune, alertam as células imunes de potenciais eventos de dano nos tecidos, conduzem importantes proteínas imuno-reguladoras para dentro dos compartimentos das células imunes, mas o mecanismo exato pelo qual essas proteínas regulam a resposta imune contra TB e o efeito protetor ainda não foi esclarecido, mas é chamativo e reprodutível²⁵⁻²⁶.

Os trabalhos feitos no Brasil pelo grupo do Dr. Célio Silva usando a vacina de DNA que usa proteínas antigênicas da micobactéria (hsp65), indicam que a chave de eficiência da vacina é a indução de uma população de células T específicas nas quais o fenótipo citotóxico (CD8+/CD4-/CD44hi e produção de INF- γ) foi o mais proeminente²⁷.

A administração de vetores expressando DNA plasmídeo mostra a ampla aplicabilidade para a geração de resposta imune protetora contra patógenos, sem necessidade de microorganismos vivos, vetores que se replicam, adjuvantes, entre outros¹⁹.

As principais vias de administração das vacinas de DNA que têm sido usadas são por exemplo: a intramuscular, injeção intradérmica em solução salina, e pistola gênica epidérmica (gg) com partículas de DNA coberta com ouro²⁸.

As vacinas de DNA têm mostrado mais eficiência em ratos do que em humanos, possivelmente pelas diferenças

nos oligonucleotídeos imuno-estimuladores nas duas espécies. Por isso, é necessário que estudos para incrementar a eficiência tanto das vacinas de DNA quanto às de proteínas, deve continuar sendo explorado.

Conclusões

A maioria dos humanos infetados com *M. tuberculosis* consegue gerar uma resposta imune que previne o desenvolvimento da doença, a infecção natural pela micobactéria confere proteção contra TB, e algumas vacinas têm mostrado prevenir a TB, isto indica que uma vacina mais efetiva contra TB é uma realidade possível. Depois da substituição da vacina da BCG, será necessário demonstrar que a nova vacina pode ao menos igualar a eficácia da BCG na proteção da tuberculose.

O aparecimento de nova tecnologia para gerar novas vacinas é igualado pelos problemas frustrantes associados ao entendimento da imunidade protetora. Soma-se a isto a ausência de um teste que dê uma correlação da imunidade protetora, sendo uma limitante para ensaios de novas vacinas.

O entendimento das grandes diferenças na proteção entre populações poderia discernir como futuras vacinas deveriam ser usadas, todos esses desafios indicam que controlar uma doença tão antiga quanto a TB é uma grande razão para continuar os estudos.

Referências

- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* 1999; 282: 677-86.
- Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 34-45.
- Nunn P. The global epidemic. The present epidemiology of tuberculosis. *Scott Med J* 2000; 45: 6-7.
- Saul Krugman SLK, Anne.A. Gershon. *Infectious Diseases of Children*. Eighth ed. St Louis, Missouri: The C. V. MOSBY COMPANY; 1985.
- Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *Jama* 1994; 271: 698-702.
- Rahman M, Sekimoto M, Takamatsu I, Hira K, Shimbo T, Toyoshima K, et al. Economic evaluation of universal BCG vaccination of Japanese infants. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 380-5.
- Brewer TF. Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmette-Guérin vaccine. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31: 864-867.
- Andersen PH, Thomsen VO, Smith E. [Tuberculosis among children in Denmark, 1990-1999]. *Ugeskr Laeger* 2001; 163: 6739-42.
- Britton WJ, Roche PW, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol* 1994; 2: 284-8.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129.
- Kaufmann SH. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000; 6: 955-60.
- Silva CL, Lowrie DB. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000; 68: 3269-74.
- Von Reyn CF, Vuola JM. New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 465-74.
- Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 1994; 62: 2536-44.
- Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995; 346: 1339-45.
- Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999; 32: 643-55.
- Guleria I, Teitelbaum R, McAdam RA, Kalpana G, Jacobs WR, Jr., Bloom BR. Auxotrophic vaccines for tuberculosis. *Nat Med* 1996; 2: 334-7.

18. Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996; 2: 893-8.
19. Tighe H, Corr M, Roman M, Raz E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* 1998; 19: 89-97.
20. Olsen A.W. vP, L.A.H., Okkels, L.M., Rasmussen, P.B. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Infect. Immun.* 2001; 69: 2773-2778.
21. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med* 1996; 2: 888-92.
22. Launois P, DeLeys R, Niang MN, Drowart A, Andrien M, Dierckx P, et al. T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect Immun* 1994; 62: 3679-87.
23. Silver RF, Wallis RS, Ellner JJ. Mapping of T cell epitopes of the 30-kDa alpha antigen of *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guerin in purified protein derivative (PPD)-positive individuals. *J Immunol* 1995; 154: 4665-74.
24. Tanghe A, Denis O, Lambrecht B, Motte V, van den Berg T, Huygen K. Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment. *Infect Immun* 2000; 68: 3854-60.
25. Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 19-39.
26. Lima KM, Bonato VL, Faccioli LH, Brandao IT, dos Santos SA, Coelho-Castelo AA, et al. Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. *Vaccine* 2001; 19: 3518-25.
27. Lowrie DB, Silva CL. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine* 2000; 18: 1712-6.
28. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-8.

Correspondência:
Antonio Condino Neto
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Avenida Lineu Prestes 1730
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - Brasil
Fone: 55-0XX-11-3091.7435
Fax: 55-0XX-19-3289.8638
E-mail: condino@icb.usp.br