

CARINA CARVALHO DOS SANTOS

**Caracterização imunológica de um novo
candidato vacinal para tuberculose
baseado em BCG recombinante:
busca de correlatos de proteção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2019

CARINA CARVALHO DOS SANTOS

**Caracterização imunológica de um novo
candidato vacinal para tuberculose
baseado em BCG recombinante:
busca de correlatos de proteção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Versão original.

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos, Carina Carvalho

Caracterização imunológica de um novo candidato vacinal para tuberculose baseado em BCG recombinante: busca de correlatos de proteção / Carina Carvalho Santos; orientadora Luciana Cezar de Cerqueira Leite. -- São Paulo, 2019.

128 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Tuberculose. 2. Vacina. 3. BCG recombinante.
I. Leite, Luciana Cezar de Cerqueira, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Carina Carvalho dos Santos

Título da tese: CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DE UM NOVO
CANDIDATO VACINAL PARA TUBERCULOSE
BASEADO EM BCG RECOMBINANTE: BUSCA DE
CORRELATOS DE PROTEÇÃO

Orientadora: Profa. Dra Luciana Cezar de Cerqueira Leite

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ____ / ____ / ____, considerou

Aprovada

Reprovada

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN


CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação de biomarcadores de proteção e caracterização imunológica de um novo candidato vacinal contra tuberculose baseado em BCG recombinante", protocolo nº 1202/14, sob a responsabilidade de Luciana Cezar de Cerqueira Leite e Carina Carvalho dos Santos – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 17/5/2017.

This is to certify that the proposal "Identification of biomarkers of protection and immunological characterization of a novel vaccine candidate against tuberculosis based on recombinant BCG", protocol nº 1202/14, under the responsibility of Luciana Cezar de Cerqueira Leite and Carina Carvalho dos Santos – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 5/17/2017. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
04/2014 - 01/2019 Laboratório de Biotecnologia Molecular IV	150 camundongos C57BL/6 (F); 90 Camundongos Balb/c (F)	Aditivo de animais, Prorrogação de vigência

São Paulo, 17 de maio de 2017


Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

À minha mãe e ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido ao longo de 5 anos, mas (de certa forma) foi planejado ao longo de uma vida. Portanto, tenho muito a agradecer.

Agradeço e dedico aos meus pais que são as pessoas mais importantes da minha vida e que têm um papel principal nessa conquista. Dedico a eles, pois trabalharam muito para dar a mim e meus irmãos tudo: educação; um lar; alimentação; muitas vezes, saúde; e principalmente, amor. Eles nos ofereceram qualidade de vida e nos repassaram valores, o que no mundo em que vivemos hoje pode ser considerado um privilégio. Eles nos proporcionaram os meios, coube a nós aprender utilizá-los e seguir. Na verdade, dedico este trabalho a toda minha família, que é a minha base em todos os momentos e sempre está me apoiando e amando (Carvalho's, Calixto's e Cia).

Agradeço a Dr. Luciana Leite pela oportunidade de desenvolver esse projeto de doutorado sob sua orientação. Agradeço pela orientação, pelos ensinamentos únicos, por ter acreditado em mim e pelo dia-a-dia ao longo desses mais de 5 anos.

Agradeço ao Dr. Ivan Nascimento, que me recebeu e orientou no IB. Além disso, agradeço a ele por toda atenção, amizade, ensinamentos, paciência, preocupação, confiança. Enfim, agradeço por tudo!

Agradeço a toda equipe do laboratório de Biotecnologia Molecular IV que com certeza foi “estatisticamente significativa” ao longo destes anos na minha vida. Pois foram mais que colegas de trabalho, principalmente por eu estar longe da minha família, eles acabaram se tornando uma família. A inabalável Larissa (miguxaaa forever! Agora mãe do João!), a Rafa, a super fantástica Cibelly, o Japa (de vez em quando chamado de Alex), o meu querido Thiagão (menino de ouro esse!), a doce Michelle, a querida Cris, Marcela, a queridíssima Ju, Mayra, Darlene, Léo, a querida Dunia (que contribuiu para a realização deste projeto a todo momento! Obrigada Du!!!), Henrique (se hoje eu sei qPCR foi porque ele me ensinou..hahahahah!!), Teresa, a minha mãezona Marlene, Toninho, Solange, a querida Arleide, que me receberam em São Paulo de braços abertos, tornaram meus dias mais alegres, contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho. Galera mais nova vou dar um alô: Zé, Luana e Brenda.

I would like to say thanks to Dr. Tom Ottenhoff and, mainly, to Dr. Marielle Haks, who received me for a 1-year period in their Lab at Leiden University Medical

Center, The Netherlands. I really do not know how to say thanks for everything! Marielle is a fantastic person, a very rare person in the scientific environment. She is a very positive person and is always encouraging their students... It is fantastic for science...Thank you! It was an excellent professional and personal experience in my life. I also would like to say thanks to Matthias, Frank, Cassandra, Kimberley, Suzanne, Susan, Louis, Gina, Josimar and all my colleagues from LUMC. PS I would like to write in Dutch, but I just can say DANK U WEL.

Agradeço aos meus professores e orientadores da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que incitaram em mim o desejo de seguir a vida acadêmica na sua face mais pura.

Agradeço a Aline e ao Rufus (o cachorro dela) pela grande amizade de todas as horas aqui em SP. Tia Vanda e Deh pelos almoços e parceria.

Agradeço a todos os amigos (que passaram por mim pelos diversos momentos da vida) pelo apoio em todos os momentos.

Por fim, eu só tenho a agradecer a Deus por tudo!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Doutorado Direto – Processo 2014/01271-0; BEPE-Doutorado direto - Processo 2017/03332-5).

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.” (**Saint- Exupéry, *O Pequeno Príncipe***)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.” (**Marthin Luther King**)

RESUMO

SANTOS, C. C. **Caracterização imunológica de um novo candidato vacinal para tuberculose baseado em BCG recombinante: busca de correlatos de proteção.** 2019. 128 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A tuberculose (TB) está entre as 10 maiores causas de morte no mundo. A única vacina disponível, o *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG), falha na proteção contra a forma pulmonar da doença em adultos. A busca por uma nova vacina e também por correlatos de proteção contra o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) tornou-se prioridade mundial. Um candidato vacinal baseado em BCG recombinante expressando a subunidade A da enterotoxina termolábil de *E. coli* (rBCG-LTAK63) mostrou proteção superior ao BCG em modelo animal. O objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta imune induzida pelo rBCG-LTAK63 *in vivo* e *in vitro* e investigar indícios de qual seria uma resposta imune protetora para TB. Camundongos BALB/c inoculados intraperitonealmente com rBCG-LTAK63 ou BCG apresentaram indução de resposta imune inata caracterizada por recrutamento de macrófagos e neutrófilos no peritônio 24 h e 7 dias após inoculação. Após 7 dias, rBCG-LTAK63 apresentou maior número de linfócitos no peritônio em relação ao grupo BCG. O rBCG-LTAK63 induziu maior produção de óxido nítrico 24 h após sua inoculação e significativa produção de peróxido de hidrogênio aos 7 dias. O rBCG-LTAK63 e o BCG induziram níveis elevados de IFN- γ , e apenas o rBCG-LTAK63 induziu níveis significativos de TNF- α quando comparado com o grupo Salina. Camundongos BALB/c imunizados subcutaneamente com BCG ou rBCG-LTAK63 apresentaram uma resposta imune de longo prazo (90 dias) do tipo Th1/Th17, maior no grupo rBCG-LTAK63 quando comparado com o BCG. Aos 15 dias após o desafio, a cinética de indução de resposta imune e revelou uma maior porcentagem de células T CD4+ produtoras de TNF- α e multifuncionais produtoras de IL-2/TNF- α no grupo rBCG-LTAK63 quando comparado com o BCG. O grupo rBCG-LTAK63 apresentou uma resposta imune com menor produção total de IFN- γ , TNF- α e uma tendência de maior produção de IL-10 em relação ao BCG. A área alveolar dos pulmões dos animais imunizados com o rBCG-LTAK63 mostrou-se mais preservada (menor redução) após o desafio em relação ao BCG. Em camundongos C57BL/6, o rBCG-LTAK63 manteve seu maior efeito protetor em relação ao BCG. Investigamos o perfil de expressão gênica e produção de citocinas induzidos *in vitro* em macrófagos humanos primários polarizados infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv.

Os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram maior expressão dos genes *IFIT3*, *OAS3* e *CXCL9* e maior produção das citocinas inflamatórias IL-12(p70), TNF- β e IL-15 que os infectados com BCG. Os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram maior expressão dos genes *TAP1*, *GBP1*, *TNIP1*, *SLAMF7*, *IL6* e menor de *CD14* e *HCK* que os infectados por BCG; e maior produção das citocinas inflamatórias e de reparação tecidual MCP-3 e EGF. De uma forma geral, o perfil inflamatório foi regulado positivamente pelo rBCG-LTAK63 em macrófagos M1 e M2 quando comparado ao BCG.

Palavras chaves: Tuberculose. Vacina. BCG recombinante.

ABSTRACT

SANTOS, C. C. **Immunological characterization of a novel recombinant BCG based vaccine candidate against tuberculosis: search for correlates of protection.** 2019. 128 p. Ph.D thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Tuberculosis (TB) is one of the top 10 causes of death in the world. The only vaccine available, *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG), fails to protect against the pulmonary disease in adults. The search for a new vaccine and for correlates of protection against *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) has become a world priority. A recombinant BCG-based vaccine candidate expressing the A subunit of heat-labile enterotoxin from *E. coli* (rBCG-LTAK63) showed superior protection compared to BCG in mouse model. The aim of this study was to characterize the immune response induced by rBCG-LTAK63 in *in vivo* and *in vitro* experimental models and to investigate evidence of a protective immune response for TB. BALB/c mice inoculated intraperitoneally with rBCG-LTAK63 or BCG showed induction of an innate immune response characterized by the recruitment of macrophages and neutrophils in the peritoneum 24 h and 7 days after inoculation. After 7 days, rBCG-LTAK63 had a higher number of lymphocytes in the peritoneum as compared to the BCG group. The rBCG-LTAK63 induced higher nitric oxide production 24 h after its inoculation and significant production of hydrogen peroxide at 7 days. rBCG-LTAK63 and BCG induced elevated levels of IFN- γ , and only rBCG-LTAK63 induced significant levels of TNF- α when compared to the Saline group. BALB/c mice immunized subcutaneously with BCG or rBCG-LTAK63 presented a Th1/Th17 type long-term immune response (at 90 days), higher in the rBCG-LTAK63 group when compared to BCG. At 15 days post challenge, the kinetics of immune response induction and recovered bacillary load presented a higher percentage of TNF- α producing CD4 + T cells and multifunctional IL-2/TNF- α cells in the rBCG-LTAK63 group when compared with BCG. The rBCG-LTAK63 group showed an immune response with lower production of IFN- γ , TNF- α and a trend for higher production of IL-10 in relation to BCG. The alveolar area of the lungs of the animals immunized with rBCG-LTAK63 was shown to be more preserved (less reduction) after challenge with BCG. In C57BL/6 mice, rBCG-LTAK63 maintained its higher protective effect in relation to BCG. We investigated the gene expression profile and cytokine production induced *in vitro* in polarized primary human macrophages infected with rBCG-LTAK63, BCG or *Mtb* H37Rv. M1 macrophages

infected with rBCG-LTAK63 showed higher expression of the *IFIT3*, *OAS3* and *CXCL9* genes and increased production of the inflammatory cytokines, IL-12(p70), TNF- β and IL-15, than those infected with BCG. M2 macrophages infected with rBCG-LTAK63 showed higher expression of the *TAP1*, *GBP1*, *TNIP1*, *SLAMF7* and *IL6* genes and lower *CD14* and *HCK* genes than those infected by BCG; and increased production of inflammatory and tissue repair MCP-3 and EGF cytokines. In general, the inflammatory profile was positively regulated by rBCG-LTAK63 in M1 and M2 macrophages when compared to BCG.

Keywords: Tuberculosis. Vaccine. Recombinant BCG.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Taxas estimadas de mortalidade por TB em 2017, excluindo mortes por TB entre pessoas HIV-positivas.	21
Figura 2. Imunidade inata na infecção por TB.....	24
Figura 3. Imunidade adaptativa ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
Figura 4. Conceitos e propriedades gerais de macrófagos polarizados.	29
Figura 5. <i>Pipeline</i> das vacinas para TB em desenvolvimento no mundo.	34
Figura 6. Desenho experimental da avaliação da imunidade inata <i>in vivo</i>	39
Figura 7. Regime de imunização, desafio e eutanásia dos animais BALB/c e C57BL/6.....	42
Figura 8. Controle de qualidade dos macrófagos M1 e M2 derivados do sangue total humano.	49
Figura 9. Recrutamento de células 24 h, 7 dias e 15 dias após inoculação intraperitoneal de rBCG-LTAK63 e BCG.	55
Figura 10. Produção de NO, H ₂ O ₂ e citocinas inflamatórias pelas células peritoneais dos animais 24 h e 7 dias após inoculação de rBCG-LTAK63 e BCG.	56
Figura 11. Produção de citocinas no pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63.....	58
Figura 12. Cinética da carga bacilar no pulmão dos animais imunizados durante a infecção com <i>Mtb</i> H37Rv.	59
Figura 13. Avaliação das células T CD4 ⁺ no pulmão dos animais aos 7 dias após o desafio com <i>Mtb</i> H37Rv.	60
Figura 14. Produção de citocinas no pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63.....	61
Figura 15. Avaliação das células T CD4 ⁺ no pulmão dos animais aos 15 dias após o desafio com <i>Mtb</i> H37Rv.	62
Figura 16. Produção de citocinas no pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63.....	63
Figura 17. Proteção dos animais C57BL/6 imunizados com rBCG-LTAK63 contra a cepa virulenta de <i>Mtb</i> H37Rv.....	64
Figura 18. Análises histopatológicas dos pulmões dos animais imunizados com rBCG-LTAK63 no 15° e 30° dia após o desafio.	65
Figura 19. Expressão de genes relacionados a resposta imune no sangue total.	66
Figura 20. Estabilidade de rBCG-LTAK63 em macrófagos M1 e M2 avaliados pela cinética da carga intracelular de bactéria.....	67
Figura 21. Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior número de genes diferencialmente expressos relacionados a um perfil inflamatório.	68
Figura 22. Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior número de genes diferencialmente expressos relacionados a um perfil inflamatório.	71
Figura 23. Macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior número de genes diferencialmente expressos relacionados a um perfil inflamatório.	73
Figura 24. Macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior número de genes diferencialmente expressos relacionados a um perfil inflamatório.	76
Figura 25. Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias.....	79
Figura 26. Macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias.....	81
Figura 27. Esquema para ilustrar as diferentes respostas imunes induzidas pelo rBCG-LTAK63 e BCG em macrófagos e a hipótese gerada para a correlação com proteção.....	90

Lista de Tabelas

Tabela 1 Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise imunofenotípica das células do pulmão e do baço.....	47
Tabela 2 Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise da produção de citocinas intracelulares.....	47
Tabela 3 Lista de genes analisados por dcRT-MLPA e respectivas funções nas quais estão predominantemente envolvidos.....	52

Lista de siglas e abreviaturas

μm, Micrometro

μL, Microlitro

μM, Micromolar

μg, Micrograma

CBA, do inglês “*cytometric beads array*”

CDR, Região definidora de clados

CEUAIB, Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan

ConA, Concanavalina A

FITC, Isotiocianato de fluoresceína

FMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IFN-γ, Interferon-gama

IL, Interleucina

mL, mililitro

mm, milímetro

mM, milimolar

MHC, Complexo de histocompatibilidade principal

NaCl, cloreto de sódio

OMS, Organização Mundial da Saúde

PBS, Tampão fosfato-salino

PCR, reação em cadeia da polimerase

RPMI, meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute

SFB, Soro fetal bovino

Th1, Th2, Th17, Resposta auxiliar do tipo 1, 2 e 17

TNF-α, Fator de necrose tumoral alfa

U, Unidade

UFC, Unidade formadora de colônia

TB, Tuberculose

Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*

HIV, Vírus da imunodeficiência humana

GBP1, GBP2 ou GBP5, Proteína ligante de guanilato 1, 2 ou 5

IFI6, IFI16, IFI35, IFI44, IFI44L, IFIH1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IFITM3, Proteínas induzidas por interferon-alfa

IRF7, Fator regulatório de interferon 7

OAS1, OAS2 ou OAS3, Oligoadenilato sintetase 1, 2 ou 3

SOCS1, Supressor da sinalização de citocina tipo 1

STAT1 ou STAT2, Sinal transdutor e ativador de transcrição 1 ou 2

TAP1 ou TAP2, Transportador associado com processamento de antígeno 1 ou 2

BMP6, Proteína morfogênica óssea 6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 A tuberculose no mundo	21
1.2 Imunologia na tuberculose	22
1.3 Macrófagos: células chave na resposta imune inata e adaptativa	28
1.4 A vacina para tuberculose	29
1.5. Novas estratégias vacinais e pipeline das vacinas em ensaios pré-clínicos e clínicos	31
1.6 BCG recombinante expressando o adjuvante LTAK63 proveniente da toxina termolábil (LT) de <i>Escherichia coli</i>	34
2 HIPÓTESE	36
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Cultivo de <i>Mtb H37Rv</i> , BCG e rBCG-LTAK63 e preparação das vacinas	38
4.2 Avaliação da resposta imune inata <i>in vivo</i>	39
4.2.1 Desenho experimental <i>in vivo</i>	39
4.2.2 Obtenção das células peritoneais	40
4.2.3 Contagem diferencial	40
4.2.4 Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	40
4.2.5 Produção de óxido nítrico (NO)	40
4.2.6 Produção de citocinas inflamatórias	41
4.3 Avaliação da resposta imune adaptativa após imunização e resposta imune após o desafio	42
4.3.1 Animais e imunização	42
4.3.2 Ensaio de desafio com a cepa virulenta <i>Mtb H37Rv</i>	43
4.3.3 Coleta de sangue e separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e extração de RNA	43
4.3.4 Síntese de cDNA e amplificação através da reação em cadeia de polimerase em tempo real	44
4.3.5 Análise dos dados de dados de qPCR	45
4.3.6 Detecção de bactérias no pulmão através da unidade formadora de colônia (UFC)	45
4.3.7 Análise imunofenotípica dos linfócitos do pulmão e citocinas intracelulares	46
4.3.8 Produção de citocinas Th1/Th2/Th17	47
4.3.9 Análise histopatológica	48
4.4 Avaliação da indução de resposta imune em macrófagos humanos <i>in vitro</i>	48

4.4.1 Macrófagos derivados de sangue total humano	48
4.4.2 Cultivo das bactérias e infecção de macrófagos	50
4.4.3 Ensaio de sobrevivência intracelular e estabilidade da construção rBCG-LTAK63 em infecção de macrófagos	50
4.4.4 Extração de RNA, dcRT-MLPA e análises	50
4.5 Análises estatísticas.....	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Avaliação da resposta imune inata in vivo	54
5.1.1 Recrutamento de células induzido por rBCG-LTAK63 no peritônio	54
5.1.2 Produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e citocinas inflamatórias	55
5.2 Indução da resposta imune adaptativa após imunização e após o desafio	57
5.2.1 Resposta imune induzida por rBCG-LTAK63 em camundongos BALB/c 90 dias após imunização	57
5.2.2 Cinética da carga bacilar no pulmão de animais BALB/c imunizados após a infecção com <i>Mtb</i> H37Rv	58
5.2.3 Resposta imune celular induzida pela imunização nos pulmões dos animais BALB/c em diferentes intervalos de tempo após o desafio	59
5.2.4 Proteção induzida pelo rBCG-LTAK63 em animais C57BL/6 após o desafio com a cepa virulenta de <i>Mtb</i> H37Rv	63
5.2.5 Análises histopatológicas	64
5.2.6 Expressão de genes relacionados a resposta imune no PBMC e no sangue total	65
5.3 Avaliação da resposta imune induzida em macrófagos in vitro.....	66
5.3.1 Estabilidade da construção rBCG-LTAK63 em macrófagos M1 e M2: cinética da carga bacilar intracelular	66
5.3.2 Perfil de genes diferencialmente expressos em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63, BCG e <i>Mtb</i> H37Rv	67
5.3.3 Perfil de genes diferencialmente expressos em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63, BCG e <i>Mtb</i> H37Rv	72
5.3.4 Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias	78
5.3.5 Macrófagos M2 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias	80
6 DISCUSSÃO	82
6.1 rBCG-LTAK63 induz recrutamento de células para o peritônio, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas inflamatórias	82
6.2 Perfil Th1/Th17 de resposta imune é induzido no pulmão pela imunização com rBCG-LTAK63	83

<i>6.3 Cinética da indução da resposta imune e da carga bacilar após o desafio em camundongos BALB/c imunizados e proteção superior induzida em animais C57BL/6</i>	.83
<i>6.4 Expressão de genes relacionados à resposta imune no sangue</i>	85
<i>6.5 rBCG-LTAK63 induz um perfil inflamatório em macrófagos M1 e M2</i>	87
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
APÊNDICE – Artigos Publicados	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 A tuberculose no mundo

A tuberculose (TB) ainda é um grave problema de saúde pública e está entre as 10 maiores causas de morte no mundo. É a maior causa de morte por um único patógeno, principalmente nos países de baixa e média renda. As estimativas são de que houve 1,3 milhões de mortes por TB e 10 milhões de pessoas desenvolveram a doença em 2017. Apesar do progresso na redução da mortalidade e dos casos de tuberculose, a taxa global dessa infecção ainda permanece alta (Figura 1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu como objetivo o fim da TB epidêmica até 2035. As principais metas são a redução de 90% do número absoluto de mortes por TB e de 80% da incidência de TB (WHO, 2018).

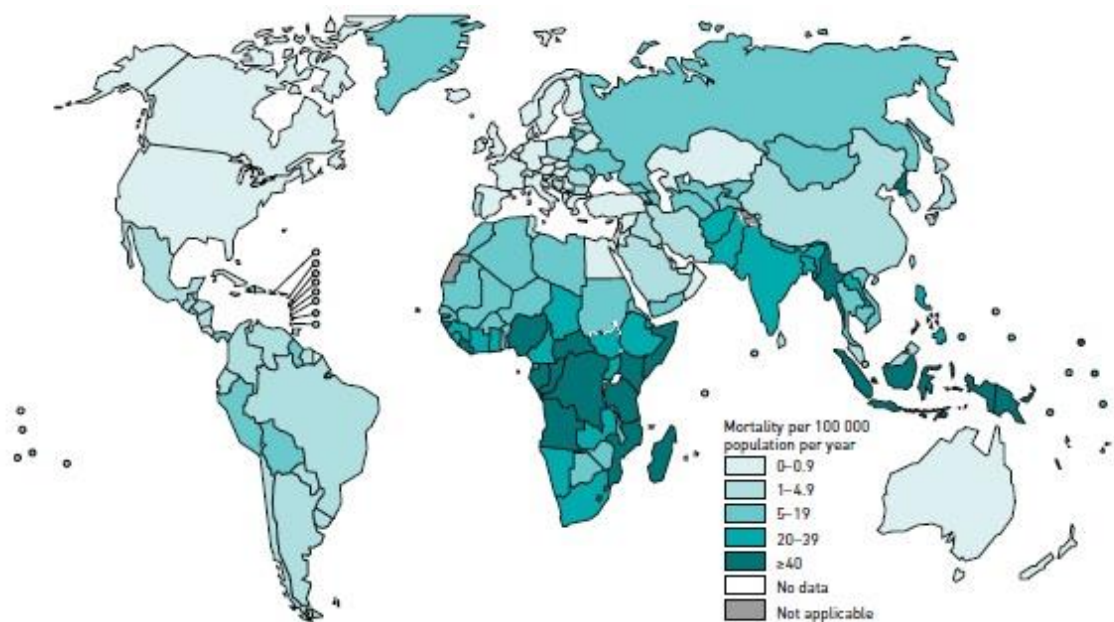


Figura 1. Taxas estimadas de mortalidade por TB em 2017, excluindo mortes por TB entre pessoas HIV-positivas. Número de mortes por TB entre as pessoas HIV-negativas por 100.000 habitantes em 2017. Houve considerável variação entre os países, variando de uma morte por TB por 100.000 habitantes em muitos países de alta renda (países da Europa e América), para mais de 40 mortes por 100.000 habitantes em muitos países da África e alguns países da Ásia. Fonte: WHO, 2018.

Em 2017, houveram casos em todos os países e faixas etárias, mas 90% foram em adultos (idade ≥ 15 anos), 9% foram em pessoas com HIV (72% na África) e dois

terços foram em oito países: Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), Filipinas (6%), Paquistão (5%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%). Esses e outros 22 países estão listados entre os 30 países com alta incidência de tuberculose e representam 87% dos casos de TB no mundo. Apenas 6% dos casos foram na região da Europa (3%) e das Américas (3%) (WHO, 2018).

Especificamente no Brasil os dados epidemiológicos da doença ainda são alarmantes. O Brasil está entre os 30 países com alta incidência de tuberculose. Em 2017, foram notificados cerca de 70.000 novos casos de TB, resultando em um coeficiente de incidência de 33,5 casos para 100 mil habitantes. Apesar do diagnóstico e do tratamento estarem disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS), em 2016, houve 4.426 mortes por TB no país (MS, 2017).

A TB é causada por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar da semelhança genética, essas espécies apresentam características fenotípicas diversas e hospedeiros diferentes (ALEXANDER et al., 2010; SINHA et al., 2016). O *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) é a maior causa de TB em humanos e possui numerosos mecanismos para escapar do sistema de defesa de seu hospedeiro (BEHAR; DIVANGAHI; REMOLD, 2010). O tratamento com antibióticos para TB é considerado longo e de difícil adesão. As cepas de *Mtb* multidroga resistentes (MDR-TB) já são consideradas um problema de saúde pública em muitos países. Em 2017, a estimativa é de 2,5 – 4,7% de novos casos e 6,3 – 34% de casos previamente tratados tiveram MDR-TB (ATMAKURI et al., 2018). A única vacina usada até hoje contra essa infecção é o bacilo *Mycobacterium bovis* de Calmette-Guérin ou BCG. Embora essa vacina seja eficaz contra as diferentes formas de tuberculose em crianças; em adultos a sua eficácia tem sido controversa, podendo variar de 0-80% dependendo do país, da cepa e da população no qual o ensaio clínico foi realizado (WHO, 1979; BARRETO et al., 2005; BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006).

1.2 Imunologia na tuberculose

Os desafios científicos na compreensão da imunidade contra o agente causador da TB surgem a partir da observação que, embora a maioria dos humanos e animais experimentais desenvolve uma resposta imune aparentemente apropriada após a infecção, essa resposta não é capaz de eliminar a bactéria (ERNST, 2012). Existem inúmeros motivos para essa resposta imune ineficiente, alguns deles são: a variabilidade

genética entre as linhagens de *Mtb*, pois tem sido demonstrado nos últimos anos que ela pode ter um importante papel na patogênese e imunidade desenvolvida no hospedeiro (FLEISCHMANN et al., 2002); a característica de latência do micro-organismo, na qual o *Mtb* permanece em um estado de dormência e pode ser reativado (VYNNYCKY; FINE, 2000); os complexos mecanismos de evasão da resposta imune utilizados pelo *Mtb*, como por exemplo a modulação dos mecanismos de morte celular em macrófagos (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

Mesmo com o elevado número de casos da doença por ano, sabe-se que apenas um pequeno número de indivíduos expostos ao micro-organismo desenvolve a TB pulmonar (ativa), apresentando sintomas da TB primária aguda, como tosse prolongada. O não tratamento desses pacientes pode permitir que a bactéria alcance outros órgãos como ossos, rins, cérebro e outros órgãos vitais. Esta fase da infecção é conhecida como TB miliar ou extrapulmonar (FLYNN; CHAN, 2001b).

Inicialmente, a infecção ocorre tipicamente pela inalação do micro-organismo em aerossol. Ele infecta macrófagos (Figura 2), reside neles e parece ser capaz de evadir da resposta imune. Os macrófagos infectados liberam citocinas, que aumentam a inflamação local e resultam no desenvolvimento de lesões granulomatosas (TABETA et al., 2004). Os macrófagos têm um importante papel no recrutamento de subpopulações de leucócitos, pois ao serem estimulados *in vitro* com componentes derivados do *Mtb*, foram capazes de liberar quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de polimorfonucleares, monócitos, células Th1 e células T $\gamma\delta$. As descobertas indicaram que as quimiocinas IL-8 e MCP-1 são produzidas de forma eficiente e persistente, liberadas em resposta a infecção pelo *Mtb*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e estão envolvidas no recrutamento predominantemente de células efetoras da imunidade inata, como monócitos e granulócitos (FERRERO et al., 2003). Apesar do interior dos macrófagos constituir um ambiente prejudicial para muitos micro-organismos, o *Mtb* vence esse obstáculo, mantendo o fagossomo em um estágio inicial de maturação, impedindo a fusão do fagossomo com lisossomos (DU et al., 2004).

Não só os macrófagos têm um papel importante na resposta inicial contra o *Mtb*. Foi mostrado, em um modelo murino de infecção experimental, que as células dendríticas são capazes de estimular respostas das células T antígeno-específicas e potente imunidade protetora antimicobacteriana, uma vez que são melhores apresentadoras de antígenos que os macrófagos (TASCON et al., 2000). As células

dendríticas têm a capacidade de migrar do local de infecção para os linfonodos e, subsequentemente, de recrutar células T para o local da infecção, ativando efetivamente a resposta imune adquirida (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003).

Além disso, acredita-se que a migração retardada das células dendríticas para os linfonodos seja responsável pelo atraso da resposta imune adquirida ao *Mtb*, sendo essa uma característica notável da infecção (ERNST, 2012). Em murinos, a disseminação do micro-organismo para locais periféricos, tais como baço e fígado, ocorre 11 a 14 dias após a infecção e, em seguida, há o aparecimento de células T antígeno-específicas. Em todos os casos estudados, a disseminação para os linfonodos ou baço antecedeu a ativação de células T antígeno-específicas (CHACKERIAN et al., 2002).

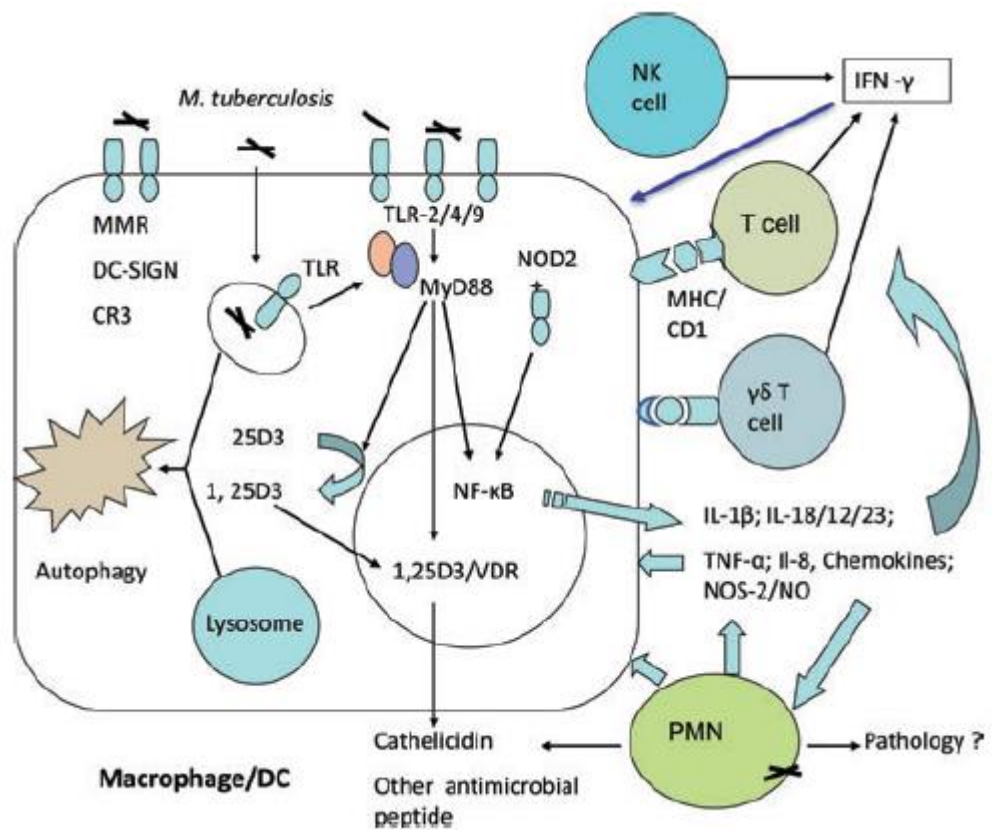


Figura 2. Imunidade inata na infecção por TB. *Mycobacterium tuberculosis* é fagocitado por macrófagos e células dendríticas através receptores ligantes de membrana como CR3, receptor *scavenger*, MMR, TLR e DC-SIGN. Isso leva a ativação das vias de sinalização de macrófagos (NF- κ B), causando secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas antimicrobianas, e ativação do VDR, que induz a expressão de peptídeos antimicrobianos. Em adição, a indução da autofagia media a atividade antimicrobiana. As células polimorfonucleares reconhecem e englobam o *Mtb* e secretam peptídeos antimicrobianos para matar a bactéria. Células NK, células T $\gamma\delta$ e células T restritas a CD1 são também ativadas por ligantes específicos e citocinas, liberando fatores citotóxicos e secretando IFN- γ que ativam macrófagos. CR3, receptor complemento 3; DC-SIGN, molécula de adesão intercelular específica de células dendrítica-3; IFN- γ , interferon gama; MMR, receptor de manose de macrófago; PMN, neutrófilos polimorfonucleares; TLR, receptor *toll-like*; TNF, fator de necrose tumoral; VDR, receptor de vitamina D. Fonte: Dheda K, 2010.

A imunidade celular, principalmente células T CD4+, e as citocinas produzidas, IFN- γ e TNF- α , têm um papel importante no controle e na proteção contra o *Mtb* (FLYNN; CHAN, 2001a). Segundo Fuller et al. (2003), em um estudo realizado com macacos *Cynomolgus*, baixas doses de uma cepa virulenta de *Mtb*, por infecção intrabronquial, resultaram em lesões granulomatosas nos tecidos pulmonares e, nessas regiões, houve abundante expressão de RNAs codificadores das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e TNF- α (FULLER; FLYNN; REINHART, 2003).

Em relação à resposta humoral, apesar desta ser incapaz de controlar a infecção, uma vez que as bactérias podem viver intracelularmente e não são detectadas pelos anticorpos (FLYNN; CHAN, 2001b), estão surgindo evidências experimentais de que as células B desempenham um papel importante na defesa contra uma ampla variedade de bactérias patogênicas, fungos e parasitas intracelulares. Acredita-se que os linfócitos B possam modular a resposta imune através de uma variedade de meios, como efeitos diretos dos anticorpos sobre os agentes patogênicos, na apresentação de antígenos e na produção de citocinas, bem como mecanismos que possam influenciar na morte intracelular nos leucócitos (MAGLIONE; CHAN, 2009).

A resposta imune adaptativa (Figura 3) é capaz de controlar a multiplicação do *Mtb* e levar a infecção a um estágio estacionário, mas sua habilidade de eliminar o microrganismo é limitada (DHEDA et al., 2010). Em camundongos imunocompetentes infectados com cepas virulentas de *Mtb*, o crescimento progressivo da população de bactérias é controlado à medida que ocorre o acúmulo de células T CD4+ e T CD8+ efetoras nos pulmões. Essas células mantêm o tamanho da população bacteriana em um platô de aproximadamente 10^6 até os animais morrerem 12-20 meses depois (MOGUES et al., 2001).

Além das respostas clássicas pelo MHC de classe I – ou classe II – restrito às células T $\alpha\beta$ que reconhecem epítomos peptídicos bacterianos, respostas por outras subpopulações de células T têm sido investigadas. São investigadas também células restritas a CD1, células T específicas a lipídeos micobacterianos (que são predominantemente T CD4+) e células T CD8+ restritas a HLA-E. Ainda assim entre os mediadores da imunidade ao *Mtb*, IFN- γ e TNF- α são os melhores descritos em humanos (ORME et al., 1992; JOUANGUY et al., 2000; CHACKERIAN; PERERA; BEHAR, 2001; HEINZEL et al., 2002; JUNG et al., 2005; HARRIS; KEANE, 2010; KASMAR et al., 2011; MONTAMAT-SICOTTE et al., 2011). Na verdade, embora seja amplamente aceito que as células T CD4⁺ produzindo IFN- γ são necessárias para a imunidade protetora, essa suposição baseia-se em dados correlativos (COOPER, 2009). Isso fica claro com o fato de que a interrupção do crescimento bacteriano é associada com a chegada dessas células produtoras de IFN- γ (ORME et al., 1992; CHACKERIAN; PERERA; BEHAR, 2001; JUNG et al., 2005) e que a perda das células T CD4+ aumenta o risco de morte por tuberculose (KOUASSI et al., 2013).

Apesar de se compreender o papel das células T CD4+ na proteção contra o crescimento bacteriano, ainda não está completamente definido sua capacidade de mediar a proteção e nem por quais mecanismos isso ocorre. Claramente, existem vários subtipos de células T CD4+ efetoras, tornando-se células multifuncionais expressando IL-2, IFN- γ e TNF- α e a presença dessas células multifuncionais é associada com proteção (DARRAH et al., 2007; HARARI et al., 2011). Outras citocinas, como IL-17, IL-22, e IL-23, têm sido identificadas e investigadas quanto ao seu papel protetor em modelos murinos e humanos expostos à tuberculose (KHADER et al., 2007; KHADER; COOPER, 2008).

O papel das células T regulatórias (Tregs) na TB tem sido controverso, uma vez que inicialmente foi associado com a progressão para a doença ativa, no entanto, publicações recentes não têm dado suporte a essa ideia (BELKAID; TARBELL, 2009), indicando assim um papel mais neutro em sua interferência na resposta Th1.

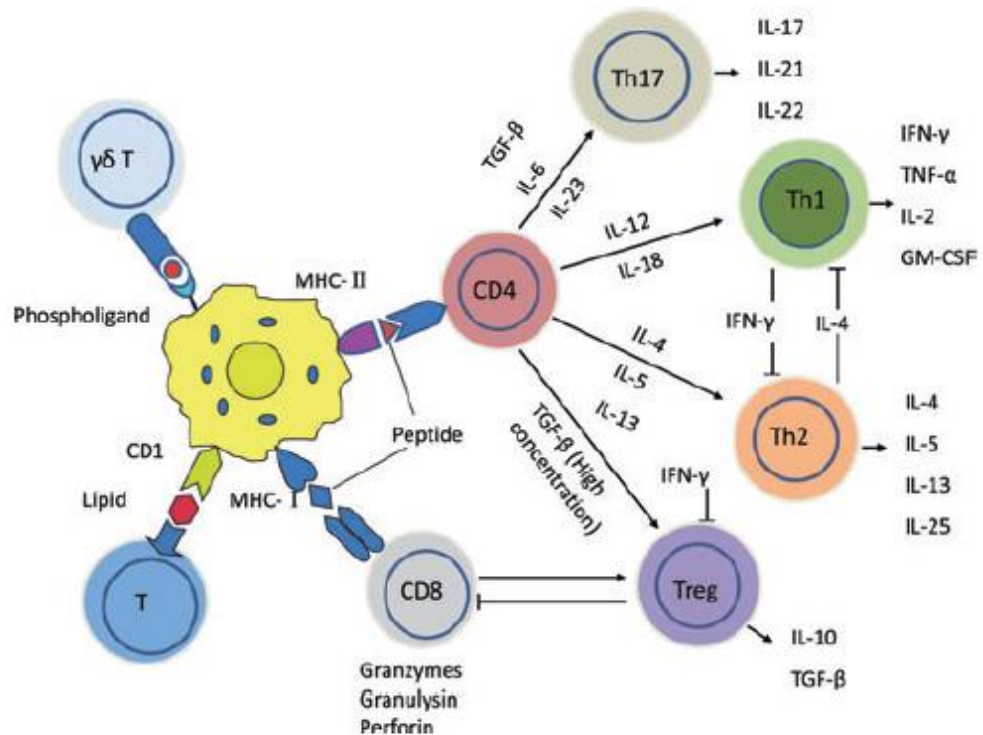


Figura 3. Imunidade adaptativa ao *Mycobacterium tuberculosis*. Os macrófagos e células dendríticas infectados secretam citocinas como IL-12, IL-23, IL-7, IL-15 e TNF- α , e apresentam antígenos para várias populações de células T, incluindo as células T CD4+ (MHC-II), células T CD8+ (MHC-I), células T restritas a CD1 e células T $\gamma\delta$. Essas células T produzem citocinas efetoras como IFN- γ que ativa macrófagos em conjunto com TNF- α para promover a morte da mycobacteria intracelular através dos intermediários das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, as células T CD8+ citotóxicas promovem a morte da bactéria intracelular através das vias mediadas por granulisina e perforina. No entanto, as células T CD4+ com perfil Th2 produzem citocinas imunossupressoras como IL-4 e células T CD4+CD25+FoxP3+ regulatórias (Treg) produzem IL-10 e TGF- β que podem suprimir os mecanismos efetores mycobactericidas. Uma nova subpopulação de células T *helper* chamada Th17 é produzida na presença de IL-23 e é caracterizada pela produção de IL-17, que é um importante modulador da inflamação e de indução de respostas de memória. Células Th17 podem recrutar neutrófilos, monócitos e células T CD4 produtoras de IFN- γ , e estimulam a expressão de quimiocinas. No entanto, IFN- γ pode suprimir as células Th17 produtoras de IL-17. Assim, parece haver uma regulação mais complexa das respostas celulares Th1, Th2, Th17 e Treg, do que anteriormente reconhecido e o papel preciso de cada uma delas na imunidade protetora permanece controverso. Fonte: Dheda K, 2010.

O mecanismo imune, em certas situações, pode provocar a destruição das células ou tecidos do nosso corpo (MUSA, 2013). Para melhorar as estratégias vacinais atuais, devemos entender os fatores que mediam a indução, expressão e regulação da resposta imune no pulmão. Devemos também determinar como induzir tanto respostas imunoprotetoras já conhecidas, como novas respostas, sem induzir efeitos imunopatológicos (COOPER, 2009).

1.3 Macrófagos: células chave na resposta imune inata e adaptativa

Os macrófagos são reconhecidos como as principais células do sistema imune inato (HOEBE; JANSSEN; BEUTLER, 2004). Estudos relacionados à imunidade inata e padrão de ativação de macrófagos têm ganhado mais atenção no desenvolvimento de novas estratégias vacinais para TB. Classicamente, a imunidade inata é importante para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, que apresenta a imunidade de memória. No entanto, estudos recentes demonstraram que, independentemente da resposta imune adaptativa, a resposta imune inata pode desenvolver resistência melhorada após reinfecção com o mesmo patógeno ou outro não relacionado (NETEA et al., 2016) e que essa resposta é induzida por modificações epigenéticas que influenciam a expressão gênica em células mononucleares (KLEINNIJENHUIS et al., 2012).

Macrófagos são moduladores e efetores na resposta imune contra patógenos intracelulares como o *Mtb*. Eles têm importantes papéis como: atividade antimicrobiana e mediadores da imunidade adaptativa (WEISS; SCHAIBLE, 2015). São células heterogêneas e têm sido classicamente divididos em dois grupos: macrófagos M1 e M2. Macrófagos M1 e M2 têm sido descritos por diferirem em termos de receptores, expressão de citocinas e quimiocinas, e funções efetoras (Figura 4). É descrito que macrófagos M1 são envolvidos em mecanismos microbicidas e inflamatórios, enquanto macrófagos M2 são envolvidos em atividades imunomoduladoras. No entanto, por serem células do sistema imune versáteis, frente a diferentes estímulos, macrófagos M1 podem ser tornar M2, e vice-versa. Os macrófagos M2 têm ainda sido classificados em pelo menos três subpopulações: M2a, M2b e M2c (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; MEGE; MEHRAJ; CAPO, 2011; MARTINEZ, F. O.; GORDON, 2014; KELLY; O'NEILL, 2015; GLASS; NATOLI, 2016).

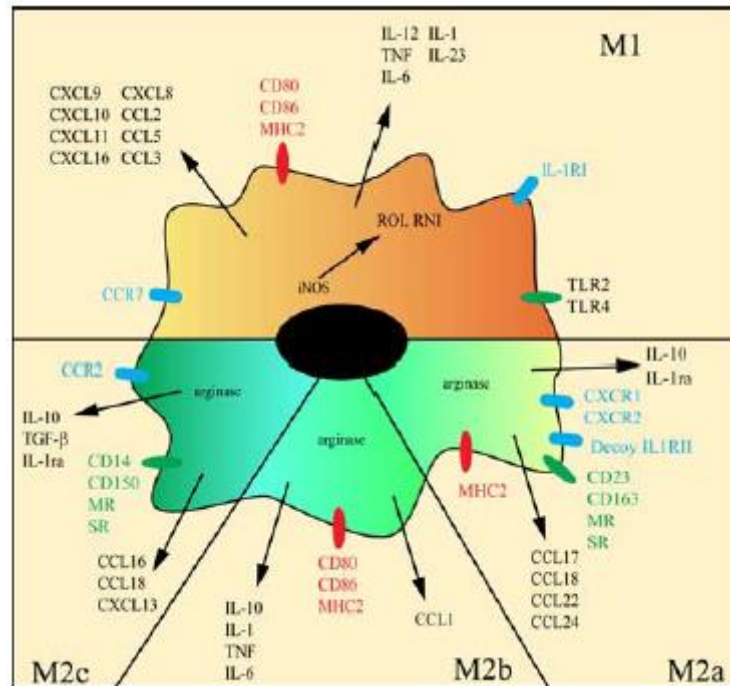


Figura 4. Conceitos e propriedades gerais de macrófagos polarizados. Os macrófagos classicamente ativados (M1) são induzidos por LPS e/ou produtos microbianos. O repertório inflamatório deles é caracterizado pela secreção de mediadores pró-inflamatórios e pela liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROI e RNI, respectivamente). Em contraste, os macrófagos alternativamente ativados (M2) abrange uma gama de estados classificados como M2a, induzidos por IL-4/IL-13, M2b, induzido por complexos imunes e agonistas de receptores do tipo *Toll*, e M2c, induzidos por IL-10 e hormônios glicocorticoides. Fonte: Mege JL, 2011.

1.4 A vacina para tuberculose

Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin (BCG) é a única vacina disponível atualmente contra TB. BCG é uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, que foi derivada de uma cepa virulenta no início do século passado, após mais de 13 anos de contínua passagem *in vitro*. Há algum tempo atrás, as esperanças eram que a tuberculose poderia ser vencida através da imunização com a vacina *Mycobacterium bovis* BCG, isolado por Calmette e Guérin em Lille, França (CALMETTE, 1931; LUCA; MIHAESCU, 2013). Essas esperanças foram ainda mais impulsionadas pelo desenvolvimento dos primeiros medicamentos anti-tuberculose durante a Segunda Guerra Mundial por Selman Waksman, que descobriu a atividade bacteriostática da estreptomicina para o *Mtb* (WAKSMAN, 1950; LUCA; MIHAESCU, 2013). No entanto, é reportado que BCG só protege contra as formas graves de TB em crianças e deixa adultos e adolescentes desprotegidos da tuberculose pulmonar, a forma mais comum da doença hoje (KAUFMANN; HUSSEY; LAMBERT, 2010). Além disso, a resistência das cepas de *Mtb* a medicamentos é um problema crescente em vários países

(GREEN; GARNEAU-TSODIKOVA, 2013) e ameaça o controle da doença (WHO, 2012).

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito protetor do BCG contra a tuberculose pulmonar. Esses estudos apontam uma enorme variação na proteção conferida pelo BCG a depender do desenho ou áreas geográficas onde foram realizados, dentre outros aspectos (BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006). Enquanto um estudo realizado em duas cidades do Brasil mostrou proteção substancial da vacinação neonatal de BCG contra todas as formas de tuberculose, em crianças, com duração de até 15-20 anos (BARRETO et al., 2005); o maior ensaio clínico realizado para avaliar a efetividade da vacina BCG, na Índia, apresentou ausência de proteção contra tuberculose (WHO, 1979; BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006). As variações observadas na proteção com o BCG, principalmente no que se refere às formas pulmonares, podem ser atribuídas a diversos fatores. Entre os mais estudados, encontramos a variabilidade genética entre as cepas de BCG (BEHR, 2002) e a exposição às micobactérias ambientais ou localização geográfica (WILSON; FINEBERG; COLDITZ, 1995; FINE; VYNNYCKY, 1998).

A OMS recomenda dose única de BCG ao nascimento. Alguns países da Europa, como por exemplo, Hungria e Rússia adotam doses múltiplas de BCG, baseado no pressuposto de que sua proteção conferida ao recém-nascido declina ao longo do tempo. Outros adotam a revacinação em escolares que não apresentam cicatriz - Tailândia e Japão - ou recomendam a segunda dose em escolares independente de cicatriz ou teste tuberculínico, como a Turquia. Eslováquia, República Tcheca, Polônia e Bulgária, que adotam a revacinação em escolares que apresentam teste tuberculínico negativo (INFUSO; FALZON, 2006; PEREIRA et al., 2007). O Brasil suspendeu a segunda dose da vacina BCG em 2006, para a faixa etária de 6 a 10 anos (MS, 2006), depois de um estudo controlado e randomizado, realizado em Salvador e Manaus, concluiu-se que a revacinação em crianças de 7-14 anos, naquele ambiente, não fornecia proteção substancial adicional e não deveria ser recomendada (RODRIGUES et al., 2005). Ainda que a revacinação tenha uma possível relação custo-benefício favorável em algumas situações, é necessário uma avaliação mais aprofundada (DYE, 2013). Nos últimos anos estudos sobre a revacinação do BCG têm sido intensificados (NEMES et al., 2018). Além disso, estudos mais recentes têm apontado o possível benefício da vacinação com o BCG oral ou por via de mucosa (PERDOMO et al., 2016). Assim, uma estratégia

efetiva de vacinação do BCG ou o surgimento de novas estratégias tornaram-se uma prioridade de pesquisa internacional.

1.5. Novas estratégias vacinais e pipeline das vacinas em ensaios pré-clínicos e clínicos

Os principais candidatos vacinais para tuberculose dividem-se em duas grandes categorias: vacinas com *Mycobacterium* vivo e vacinas de subunidades (ANDERSEN; DOHERTY, 2005).

Vacinas de subunidades são compostas por um ou mais antígenos que são considerados protetores. Em geral, alguns antígenos são combinados para melhorar a eficácia da vacina e/ou podem ser combinados com adjuvantes (ANDERSEN; KAUFMANN, 2014). Um dos primeiros candidatos, o M72, baseado na fusão dos antígenos Rv1196 e Rv0125, administrado em conjunto com um adjuvante, foi protetor em diferentes modelos animais (SKEIKY et al., 2004). Outros candidatos vacinais, o H4 (proteína recombinante baseada na fusão de dois antígenos de *Mtb*: 85B e TB10.4) e H56 (proteína recombinante baseada na fusão de três antígenos de *Mtb*: 85B, ESAT-6 e Rv2660c), ambos administrados com o adjuvante IC31 mostraram imunogenicidade e proteção em modelos animais (DIETRICH et al., 2005; AAGAARD et al., 2011). Esses candidatos vacinais estão em fase de ensaios clínicos (Figura 5).

As vacinas com *Mycobacterium* vivo podem ser baseadas em atenuação do *Mycobacterium* ou na tecnologia recombinante. Este último está sendo largamente utilizado, aproveitando-se da riqueza de informações sobre o BCG como veículo para a construção de derivados recombinantes. Uma das estratégias para melhorar a eficácia da vacina BCG é a superexpressão de antígenos dominantes (KAUFMANN; GENGENBACHER, 2012). BCG possui uma série de características que, em comparação com os hospedeiros bacterianos comumente utilizados, como *Escherichia coli*, o tornam relativamente difícil de manipular geneticamente. Ele é naturalmente resistente a uma variedade de antibióticos usados frequentemente, replica lentamente (tempo de duplicação de aproximadamente 20 horas), não é facilmente transformado com DNA e as primeiras tentativas de troca de alelos em micobactérias de crescimento lento resultaram em um elevado grau de recombinação. No entanto, muitas dessas questões têm sido sistematicamente tratadas durante as últimas duas décadas (KALPANA; BLOOM; JACOBS, 1991; TRICCAS, 2010).

Assim, a tecnologia de BCG recombinante tornou-se uma abordagem promissora no melhoramento da eficácia protetora da vacina BCG, uma vez que permite a expressão de genes exógenos que codificam antígenos imunodominantes, principalmente antígenos do *Mtb*, ou citocinas imunoregulatórias. Através dessa tecnologia, as proteínas secretadas pelo próprio BCG e as proteínas recombinantes expressadas nele podem simultaneamente estimular o organismo a desenvolver uma resposta imunológica mais forte contra o *Mtb* (PITT et al., 2013). Desenvolver vacinas baseadas em BCG recombinante apresenta vantagens que são inerentes ao próprio BCG, uma vez que ele induz algum nível de imunidade protetora (particularmente em crianças), é bem tolerado e de custo relativamente baixo (TRICCAS, 2010).

Existem várias vacinas para TB baseadas em BCG recombinante em desenvolvimento no mundo. Entre os primeiros candidatos vacinais desenvolvidos, temos duas vacinas de BCG recombinantes expressando a principal proteína secretora do *Mtb* de 30-kDa (rBCG30), que é uma proteína extracelular de *Mtb*, também conhecida como antígeno 85B; estas induziram melhor imunidade protetora contra desafio com *Mtb* que a vacina BCG convencional. As cepas de rBCG30 provocaram uma redução na unidade formadora de colônia (UFC) no pulmão e no baço de animais experimentais, sendo esse o melhor parâmetro utilizado para avaliar a eficácia nesses estudos (HORWITZ et al., 2000).

Cepas de BCG recombinante superexpressando outros antígenos imunodominantes, como Ag85A (SUGAWARA; UDAGAWA; TANIYAMA, 2007), Ag85C (JAIN et al., 2008), ESAT-6 (PYM et al., 2003) e HspX (SHI et al., 2010), têm sido desenvolvidas e estas demonstrado imunogenicidade apropriada contra o *Mtb* em modelos animais experimentais. A partir daí, investiu-se no desenho de cepas de rBCG superexpressando vários antígenos fusionados, o que também levou a um aumento da proteção contra a TB (XU et al., 2007; QIE et al., 2008; QIE et al., 2009; WANG, J. et al., 2009; SHEN et al., 2010; WANG, C. et al., 2012). Todos esses candidatos vacinais mostraram algum nível de proteção e/ou imunogenicidade em modelos animais.

Outra construção vacinal recombinante em destaque, a rBCG Δ ureC hly+ (VPM1002), teve maior eficácia quando comparada com ao BCG convencional em animais experimentais. A estratégia da vacina baseia-se em uma cepa de rBCG expressando a listeriolisina (Hly) de *Listeria monocytogenes* para escapar de fagossomo das células hospedeiras infectadas. Hly tem um pH ótimo ácido, enquanto o BCG

modifica o pH para neutro. Para melhorar o pH, foi contruída uma cepa de rBCG apresentando deficiência de urease C (ureC), uma vez que a urease C tem um papel na neutralização do pH do fagossomo, inibindo sua maturação. Essa construção induziu uma forte imunidade mediada por células T (GRODE et al., 2005). Posteriormente, a resposta imunológica de longo prazo foi comparada entre a rBCG e a BCG parental, diferindo qualitativamente e quantitativamente. Após a vacinação com rBCG foi detectada uma maior abundância de citocinas tipo Th1, assim como de IL-17 no pulmão, sendo essa última indicada como um possível marcador de proteção (DESEL et al., 2011). Até então, essa vacina recombinante VPM1002 já foi avaliada em ensaios clínicos de fase I e II (Figura 5).

Entre as estratégias usando o *Mycobacterium* atenuado, a mais promissora, inclusive em ensaios clínicos avançados, é o MTBVAC (Figura 5). Esse candidato vacinal foi construído por racional atenuação de uma cepa de isolado clínico de *Mtb*, a Mt103. Foram realizadas duas deleções genéticas estáveis, sem uso de marcadores de resistência a antibióticos, nos genes *phoP* e *fadD26*, codificadores dos dois maiores fatores de virulência do *Mtb* (ARBUES et al., 2013).

Apesar de alguns candidatos estarem alcançando às fases clínicas, o progresso para uma estratégia efetiva tem sido devagar e muitos falham ao chegarem nessas fases. Entre os fatores para esse atraso, temos o fato de ainda não existirem bons modelos para avaliar proteção para TB nos estudos pré-clínicos. Por exemplo, em estudos pré-clínicos, diferentes laboratórios utilizam variados protocolos de imunização e/ou desafio (vias de imunização – subcutânea, intranasal – e de desafio - intratraqueal, intranasal, aerossol); são também utilizados diferentes intervalos de tempo de imunização e desafio para avaliar a proteção; não existem correlatos de proteção imunológicos para TB; existe uma falta de modelos translacionais ente animais e humanos; entre outros (FLETCHER; HAWKRIDGE; MCSHANE, 2009; VOSS et al., 2018).

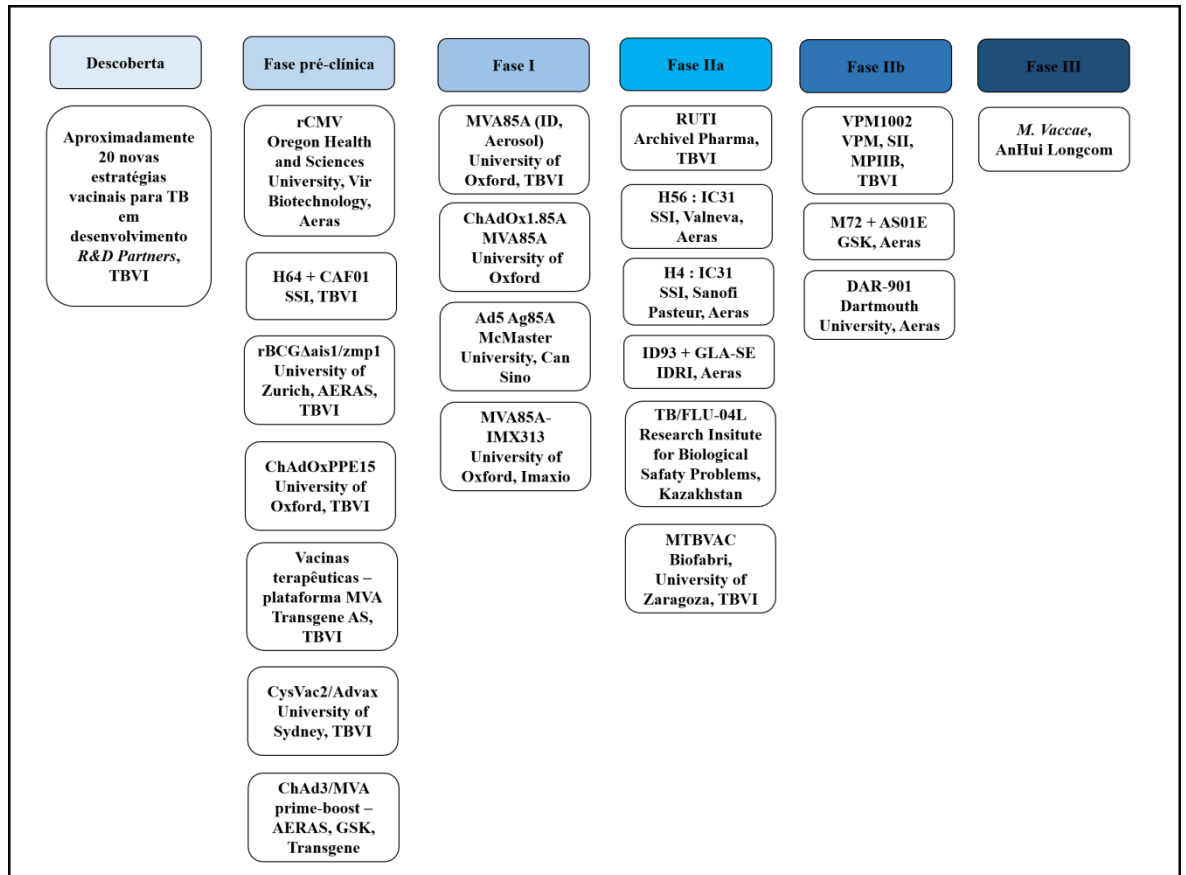


Figura 5. Pipeline das vacinas para TB em desenvolvimento no mundo. Candidatos vacinais para TB baseados em diversas estratégias (subunidades / adjuvantes, vetores virais, Mycobacteria viva ou morta, BCG recombinante) em diferentes fases de desenvolvimento em 2017. Fonte: adaptado de *Global Report on Tuberculosis Vaccines 2018*.

1.6 BCG recombinante expressando o adjuvante LTAK63 proveniente da toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*

A enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) juntamente com a toxina colérica (CT) estão entre os mais fortes imunógenos de mucosa já conhecidos (MEKALANOS et al., 1983; SPANGLER, 1992). Entre as propriedades adjuvantes descritas, o LT pode induzir o aumento da produção de citocinas inflamatórias; recrutamento de células imunes efetoras para o local da imunização; influência na maturação de células dendríticas, apresentação de antígeno e ativação de células T; resposta humoral e celular (GIULIANI et al., 1998; TRITTO et al., 2007). No entanto, devido a sua alta toxicidade, essa molécula é inapropriada para uso em humanos. Diversos estudos têm mostrado que a subunidade LTA da molécula LT, a porção responsável por sua toxicidade, é também o principal fator responsável pelo potente efeito modulador da resposta imunológica conferida pela LT (PIZZA et al., 2001). Uma

solução racional encontrada para a utilização dessa molécula, sem os seus efeitos colaterais indesejados, foi através de mutações sítio dirigidas no gene LTA, que eliminaram o efeito tóxico, porém conservaram suas propriedades adjuvantes ou moduladoras da resposta imune. Uma molécula resultante dessas mutações, denominada LTK63, levou a uma proteína totalmente atóxica, mas com muitas das propriedades adjuvantes da molécula nativa, além de um perfil de resposta Th1 (PIZZA et al., 1994).

Assim, no nosso laboratório foram desenvolvidas diferentes construções baseadas em BCG recombinante que expressam o gene LTAK63. A construção, rBCG-LTAK63lo, demonstrou proteção superior ao BCG em modelos animais de desafio intratraqueal com uma cepa virulenta laboratorial de *Mtb* H37Rv e uma cepa de isolado clínico *Mtb* Beijing (NASCIMENTO et al., 2017). A expressão do adjuvante LTAK63 no BCG apresenta vantagens na proteção contra o *Mtb*, uma vez que o BCG induz algum nível de proteção em crianças contra esse microrganismo e apresenta boa tolerância, além de apresentar baixo custo. O rBCG-LTAK63 também aproveita as propriedades adjuvantes da proteína LTAK63. Nesse projeto, utilizamos esse candidato vacinal como ferramenta de estudo para melhor entender os mecanismos imunológicos induzidos por uma vacina promissora para TB, assim como buscar correlatos de proteção a partir dos resultados revelados.

2 HIPÓTESE

A expressão do adjuvante LTAK63 em BCG apresentou proteção contra desafio com *Mtb* superior ao BCG nativo (NASCIMENTO et al., 2017). Um dos maiores obstáculos hoje nos estudos de candidatos vacinais para TB é o fato de não existirem mecanismos de proteção elucidados ou correlatos de proteção estabelecidos (FLETCHER, 2007). Assim, este estudo foi desenvolvido a partir da hipótese de que ao investigar a resposta imune induzida por rBCG-LTAK63, estaríamos não só caracterizando a imunidade induzida por ele – ainda não conhecida – mas também poderíamos encontrar indícios de qual seria uma resposta imune protetora para TB, contribuindo para os campos de estudo de vacinas e imunologia para a doença.

3 OBJETIVOS

Este projeto visa aprofundar a caracterização imunológica do novo candidato vacinal contra tuberculose, o rBCG-LTAK63, e utilizá-lo como uma ferramenta para identificar correlatos de proteção na TB. Para isso, temos como objetivos específicos:

Objetivo 1: Determinar a cinética de indução de resposta imunológica pela imunização com o candidato vacinal rBCG-LTAK63 em comparação com a carga bacteriana no pulmão dos camundongos após o desafio;

Objetivo 2: Caracterizar o potencial de indução de uma resposta imune inata *in vivo* pelo rBCG-LTAK63 comparando ao BCG nativo;

Objetivo 3: Caracterizar a resposta imune celular induzida *in vivo* pelo rBCG-LTAK63 no pulmão e sangue de camundongos imunizados com rBCG-LTAK63 e BCG, antes e após o desafio com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv, utilizando técnicas como citometria de fluxo e PCR em tempo real;

Objetivo 4: Caracterizar os efeitos histopatológicos nos camundongos imunizados com rBCG-LTAK63 e BCG após o desafio com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv;

Objetivo 5: Caracterizar o perfil de genes relacionados a resposta imune induzidos *in vitro* por rBCG-LTAK63, BCG e *Mtb* H37Rv, em um modelo de infecção de macrófagos humanos primários polarizados (M1 e M2), buscando encontrar correlatos de proteção para TB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de *Mtb H37Rv*, BCG e rBCG-LTAK63 e preparação das vacinas

O *Mycobacterium bovis* BCG Moreau foi usado para gerar a cepa rBCG-LTAK63, como descrito anteriormente (NASCIMENTO et al., 2017). As cepas de BCG e BCG recombinante foram inoculadas inicialmente em 5 mL de meio Middlebrook 7H9 (MB7H9) (Difco, Detroit, MI) suplementado com ácido oleico – albumina – dextrose – catalase (OADC) (BBL, Cockeysville, MD) e Tween 80 0,05% (Tw) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (MB7H9/OADC/Tw) contendo ou não Canamicina (20 µg/ml) e foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por cerca de 7 dias. Após esse período, foi acrescentado meio MB7H9/OADC/Tw com ou sem Canamicina (20 µg/ml) para um volume final de 50 mL e o crescimento foi acompanhado até alcançar densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,8. Em seguida, as bactérias foram submetidas a centrifugação a 3180 x g, lavadas duas vezes com 40 mL de água destilada estéril e ressuspensas em cerca de 1 mL de glicerol 10%. Alíquotas de 60-100 µl das vacinas foram mantidas a -80° C até o uso. Após 48 h mantidas a -80° C, a UFC das vacinas foi quantificada através do método de diluições seriadas e plaqueamento em meio Middlebrook 7H10 (MB7H10) (Difco, Detroit, MI) contendo 5 mL de glicerol (Sigma-Aldrich) suplementado com ácido oleico – albumina – dextrose – catalase (OADC) (BBL, Cockeysville, MD) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (MB7H10/OADC). Após 21 dias, a UFC foi visualizada em microscópio e contada.

A cepa de *Mtb H37Rv* foi usada nos ensaios de desafio e para gerar o extrato de *Mtb* utilizado nos experimentos de resposta imunológica. Alíquotas congeladas da cepa de *Mtb H37Rv* foram colocadas em cultura em MB7H9/OADC/Tw e cresceram até o começo da fase mid-log a 37 °C e 5 % de CO₂. A partir dessas culturas foram feitos estoques e o extrato de *Mtb*. Para os estoques, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 3180 x g, lavadas duas vezes com solução salina de tampão fosfato (PBS), ressuspensas em um volume de 1/10 com PBS/glicerol (1:1) e mantidas a -80 °C até o uso. Após período de 48 h mantidos a -80 °C, a UFC foi quantificada como descrito anteriormente para as vacinas.

Para o extrato de *Mtb*, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 3180 x g, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em cerca de 1 mL de PBS e sonicadas duas vezes por 5 s, amplitude 60, pulso 1,5. Em seguida, o lisado foi centrifugado por 1

min, 380 x g, 4 °C. Foram feitas alíquotas do sobrenadante em tubo eppendorf e dosagem de proteínas pelo método de *Bradford*.

4.2 Avaliação da resposta imune inata *in vivo*

4.2.1 Desenho experimental *in vivo*

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, número do protocolo: 1202/14). Camundongos fêmeas saudáveis da linhagem BALB/c entre 5 e 7 semanas de idade foram adquiridos do biotério da Faculdade de Medicina – USP, mantidos em gaiolas separadas em um laboratório de biossegurança e alimentados com ração comercial e água, sob controle de temperatura. Quinze animais por grupo receberam pela via intraperitoneal (i.p.) 100 µl de suspensão de BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal), enquanto um grupo controle recebeu 100 µl de salina estéril. Cerca de 24 h, 7 dias e 15 dias após a inoculação, foi coletado o lavado peritoneal, como descrito a seguir (Figura 6).

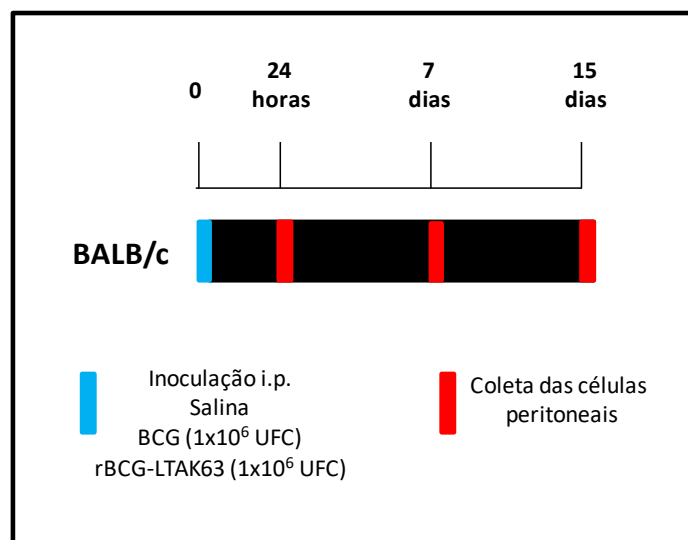


Figura 6. Desenho experimental da avaliação da imunidade inata *in vivo*. Camundongos BALB/c foram inoculados no dia 0 por via i.p. com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal). Um grupo controle recebeu apenas salina. Cerca de 24 h, 7 dias e 15 dias, os animais foram eutanasiados e as células peritoneais foram coletadas para contagem diferencial, análise da produção de H_2O_2 , NO e de citocinas inflamatórias.

4.2.2 Obtenção das células peritoneais

Cerca de 24 h, 7 dias e 15 dias após a inoculação i.p. de BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal), os animais foram eutanasiados e as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através de lavagem peritoneal utilizando 5 mL de PBS estéril. O número total de células foi determinado através de coloração com cristal violeta em câmara de Neubauer, visualizadas em microscópio.

4.2.3 Contagem diferencial

Para a contagem diferencial, 200 μ L da suspensão de células (4×10^4 células) do lavado peritoneal foram centrifugados a $27 \times g$ por 4 min na citocentrífuga (StatSpin Cytofuge, Beckman Coulter) para obtenção das lâminas. Após secarem, realizamos a coloração com um kit de corantes para coloração diferencial rápida “INSTANT PROV” (Interlab).

4.2.4 Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para verificar a produção de H_2O_2 , foi utilizado o método descrito por Pick e Mizel (1981). As células totais obtidas do exsudato peritoneal foram acertadas para 2×10^6 células/mL em solução com vermelho de fenol [NaCl (150 nM); tampão fosfato pH: 7 (10 nM); dextrose (5,5 nM); vermelho de fenol (0,56 nM); peroxidase de raiz tipo II (0,01 mg/mL)] e distribuídas em alíquotas de 100 μ L em placa de 96 poços. Assim como as amostras, a curva padrão foi misturada com a solução vermelho de fenol para ser distribuída na placa. Adicionou-se então 10 μ L de acetato de forbol miristato (PMA) (20 ng/poço) na metade dos poços, como um controle positivo, e incubamos por 1 h a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 . Para o branco, como controle negativo, utilizamos somente a solução de vermelho de fenol. Após este período, a reação foi interrompida mediante adição de 10 μ L de NaOH 1N. A absorbância foi determinada utilizando-se, um leitor de ELISA automático com um filtro de 620 nm. Os resultados obtidos em DO foram transformados em μ M de H_2O_2 / 2×10^5 células, com base na curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (5; 10; 20 e 40 μ M).

4.2.5 Produção de óxido nítrico (NO)

Os lavados contendo as células peritoneais foram ajustados para a concentração de 2×10^6 células/mL em PBS. As células foram centrifugadas a $280 \times g$, por 10 min a 4

°C e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI-1640 (RPMI Medium 1640, Gibco, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 10 µL/mL de antimicótico Anti-anti (Gibco – Life technologies). Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 96 poços (Corning Glass Works, Corning) e cultivadas durante 48 h a 37 °C e 5 % de CO₂ na presença ou não de Concanavalina A (ConA). Após 48 h de incubação foram coletados 50 µl do sobrenadante das culturas de células peritoneais, em seguida adicionou-se 50 µl do reagente de Griess (sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5% e N-1 naftil-etilenediamide 0,1%). A absorbância foi determinada utilizando-se um leitor de ELISA automático com filtro de 540 nm. Os valores obtidos em DO foram transformados em µM de NO₂ /10⁶ células, mediante equação de regressão linear com base numa curva padrão feita com concentrações conhecidas de NaNO₂ (1; 2,5; 5; 10 e 25 µM).

4.2.6 Produção de citocinas inflamatórias

Os lavados contendo as células peritoneais foram ajustados para a concentração de 2×10^6 células/mL em PBS. As células foram centrifugadas a $280 \times g$ por 10 min a 4 °C e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado com 10% SFB e 10 µL/mL de antimicótico Anti-anti (Gibco, Life technologies). Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 96 poços (Corning Glass Works, Corning) e cultivadas durante 48 h a 37 °C e 5 % de CO₂ na presença de RPMI ou ConA. O Kit CBA (*Cytometric Beads Array*) (BD Biosciences) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas inflamatórias: INF- γ e TNF- α em uma mesma amostra. Brevemente, esse kit permite a análise de 6 diferentes citocinas, no qual seis populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no citômetro FACS Canto II. As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE (reagente de detecção), e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 µL de amostra, 50 µL da mistura de *beads* e 50 µL do reagente de detecção *Inflammatory PE Detection Reagent*. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por duas horas, em temperatura

ambiente, sem incidência de luz. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o *software* “FCAP Array”.

4.3 Avaliação da resposta imune adaptativa após imunização e resposta imune após o desafio

4.3.1 Animais e imunização

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, número do protocolo: 1202/14). Camundongos saudáveis, fêmeas da linhagem BALB/c e C57BL/6 entre 5 e 7 semanas de idade foram adquiridos do biotério da Faculdade de Medicina – USP ou do biotério do Instituto Butantan, mantidos em gaiolas separadas em um laboratório de biossegurança e alimentados com ração comercial e água, sob controle de temperatura. Trinta e cinco animais BALB/c e dez animais C57BL/6 por grupo foram imunizados pela via subcutânea (s.c.) com 100 µl de suspensão de BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal). Um grupo controle recebeu Salina (Figura 7).

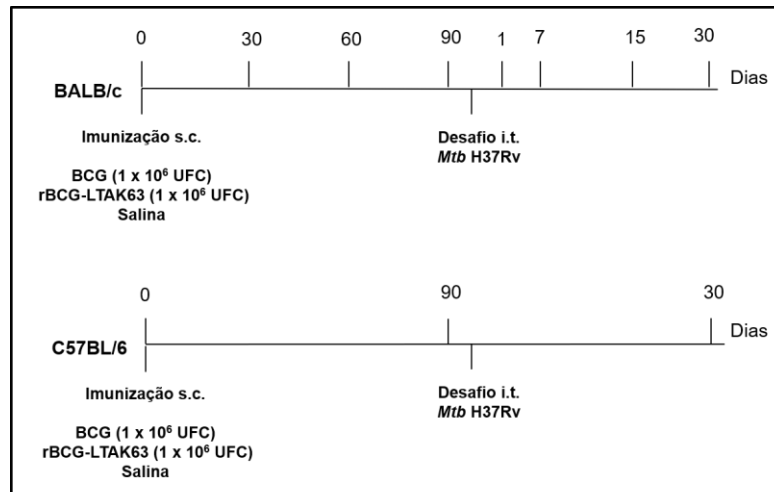


Figura 7. Regime de imunização, desafio e eutanásia dos animais BALB/c e C57BL/6. Os animais BALB/c e C57BL/6 foram imunizados no dia 0 por via subcutânea (s.c.) com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal). Um grupo controle recebeu Salina. Nos dias 30, 60 e 90 após a imunização, o sangue dos animais BALB/c foi coletado. Após 90 dias de imunização, os animais BALB/c e C57BL/6 foram desafiados pela via intratraqueal (i.t.) com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv (1×10^5 UFC/animal). No dia 01 após o desafio, o sangue dos animais BALB/c foi coletado; e nos dias 07, 15 e 30 após o desafio, os animais foram eutanasiados para coleta do pulmão. Os animais C57BL6 foram eutanasiados no dia 30 para coleta do pulmão.

4.3.2 Ensaio de desafio com a cepa virulenta *Mtb* H37Rv

Noventa dias após a imunização, todos os animais de cada grupo foram desafiados pela via intratraqueal (i.t.) com uma dose da cepa virulenta *Mtb* H37Rv (1×10^5 UFC/100 μ l/animal) (Figura 7). Para confirmar a dose de desafio, foram preparadas diluições seriadas que foram plaqueadas em MB7H10/OADC.

4.3.3 Coleta de sangue e separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e extração de RNA

A coleta de sangue foi realizada nos dias 30, 60 e 90 após a imunização dos animais BALB/c. No dia 1, 7, 15 e 30 após o desafio, o sangue também foi coletado; 100 μ l foi colocada diretamente no Trizol (Trizol®, Life Technologies), e cerca de 200 μ l foi destinada à separação de PBMC. Aproximadamente 200 μ L de sangue obtido pelo plexo orbital foi adicionado ao eppendorf 1,5 mL contendo PBS/heparina. Após homogeneização foi transferido para tubo de 5 mL e foi adicionado 1 mL de Histopaque (Sigma). Submeteu-se a centrifugação à 500 x g por 15 min a 20 °C. A separação das células foi realizada através de gradiente de densidade Histopaque, em que foi coletado o anel de células mononucleares situado na interface entre o plasma e o Histopaque. Transferiu-se o PBMC para tubos de 5 mL, homogeneizou-se e adicionou-se RPMI (Gibco, Life Technologies) para lavá-lo. Centrifugou-se a 200 x g por 7 min a 4°C, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento de lavagem. Em seguida, as células foram ressuspensas e transferidas para eppendorf de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a aproximadamente 600 x g por 5 minutos a 4 °C. Descartou-se o máximo de RPMI, deixando apenas o pellet de PBMC e adicionou-se 200 μ L de Trizol Reagente (Trizol®, Life Technologies). Em seguida, as amostras foram armazenadas no freezer -80°C.

Para a extração do RNA total a partir da amostra de sangue total ou PBMC foi utilizada uma solução monofásica contendo fenol e guanidina isotiocianeto (Trizol®, Life Technologies), seguindo protocolo previamente descrito (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). Depois das amostras com Trizol serem descongeladas, foram deixadas a temperatura ambiente por 5 min. Adicionou-se 40 μ L de clorofórmio/tubo. Os tubos foram agitados vigorosamente com as mãos por 15 s. Incubou-se a temperatura ambiente por 3 min. Submeteu-se a centrifugação (12.000 x g, 15 min a 4 °C). Transferiu-se a fase aquosa (~100 μ L) para um novo eppendorf de 1,5

mL. Adicionou-se 100 μ L (mesmo volume da fase aquosa) de álcool isopropílico. Misturou-se invertendo os tubos 10 vezes. Incubou-se a temperatura ambiente por 10 min. Submeteu-se a centrifugação (12.000 x g, 10 min a 4 °C). Descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol 75% por tubo. Submeteu-se a centrifugação (7.500 x g, 5 min a 4 °C). Descartou-se o sobrenadante. O RNA foi dissolvido em água livre de RNase (12 μ L). O RNA total extraído foi quantificado através da leitura em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). A absorbância foi medida a 260 e 280 nm de comprimento de onda. A pureza do RNA extraído foi verificada pela razão entre a absorbância medida a 260 nm e a 280 nm. Sendo valores entre 1,5 e 2,0, indicadores de pureza satisfatória. O RNA foi armazenado no -80 °C até o uso.

4.3.4 Síntese de cDNA e amplificação através da reação em cadeia de polimerase em tempo real

Antes de iniciar a síntese de cDNA, as amostras foram tratadas com DNase (Promega), afim de eliminar possíveis contaminantes de DNA genômico. Foi usado 1 μ L da enzima RQ1 DNase, livre de RNase, para 1 μ g de RNA. Foram adicionados 5 μ L de DNase, 1,5 μ L de tampão 10x RNase free e 5 μ g de RNA, completando-se o volume com água tratada com pirocarbonato de dietila (DEPC) (Sigma-Aldrich) para 15 μ L. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min. Após esse período, adicionou-se 1 μ L de RQ1 DNase Stop Solution e incubou-se a 65 °C por 10 min para a inativação da enzima.

A síntese de fita simples de DNA complementar foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa (ThermoScript RT-PCR System, Invitrogen, Life Technologies). Foram utilizados cerca de 1-3 μ g de RNA total. O RNA foi incubado a 65 °C por 5 min, em um termociclador, com 1 μ L de Random-hexamer primer (50 ng/ μ L), 2 μ L de dNTP Mix 10 mM (2,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC para um volume final de 12 μ L. Posteriormente, adicionou-se 4 μ L do tampão 5x cDNA Synthesis, 1 μ L de DTT 0,1 M, 1 μ L de RNaseOUT (40 U/ μ L), 1 μ L de água DEPC, 15 U de transcriptase reversa (ThermoScript RT) e incubou-se a mistura a 25 °C por 10 min e 50 °C por 50 min. Em seguida, a reação foi inativada aquecendo-a a 85 °C por 5 min, adicionou-se 1 μ L de RNase H e incubada a 37 °C por 20 min.

Após a obtenção do cDNA, através da etapa de transcrição reversa, as reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em placas de 96 poços usando o reagente “TaqMan Gene Expression Master Mix 1x” (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) e o equipamento “Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System”. Foram feitas duplicatas das reações de PCR em tempo real utilizando 50 ng de cDNA e sondas comerciais e oligonucleotídeos 1x, sendo o volume final da reação 20 µL. A reação foi realizada com os parâmetros: 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, de acordo com o manual de instruções da Applied Biosystems. Foram avaliadas as expressões dos genes *INF-γ*, *TNF-α*, *IL-12* e *TGF-β* no PBMC; no sangue total foram avaliados *INF-γ*, *TNF-α*, *TGF-β*, *IL-6*, *CXCL9* e os fatores de transcrição *NF-kB1* e *NF-kB2*. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno.

4.3.5 Análise dos dados de dados de qPCR

As emissões de fluorescência foram coletadas a cada ciclo, analisadas pelo *software* 7300 System SDS e os resultados foram apresentados em gráficos de nível de fluorescência (ΔRn) vs número de ciclos. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn que seria uma linha de corte (conhecido na língua inglesa como *threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de iniciadores. O número de ciclos em que o ΔRn cruza o *threshold* corresponde ao C_T (C_T do inglês, *cycle threshold*) da amostra. O valor de C_T é preditivo da quantidade de RNA alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método “algoritmos de quantificação comparativa” ($\Delta\Delta Ct$), que compara os resultados das amostras experimentais com um calibrador e um normalizador. Com esse método, o C_T do gene de interesse, tanto nas amostras experimentais quanto nas amostras calibradoras, estão ajustadas ao C_T de um gene normalizador. O resultado do valor de $\Delta\Delta Ct$ é usado para determinar a quantificação relativa, através da “expressão relativa” (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), dada pela seguinte fórmula:

$$\text{"EXPRESSÃO RELATIVA"} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.3.6 Detecção de bactérias no pulmão através da unidade formadora de colônia (UFC)

Para os animais BALB/c, cargas bacterianas nos tecidos de pulmão foram analisadas nos dias 7, 15 e 30 após o desafio com a cepa virulenta *Mtb* H37Rv, enquanto para os animais C57BL/6, apenas no dia 30 após o desafio. Os órgãos foram removidos asépticamente. O pulmão de cada animal foi macerado e homogeneizado, e uma parte deste homogenato separada para determinar a carga bacilar. A determinação da UFC foi realizada pelo método de diluições seriadas do homogenato (diluições de 10

x até 10^7 x) que posteriormente foram plaqueadas em meio de cultura MB7H10/OADC e mantidas a 37 °C. Após 21 dias, foi obtida a contagem da UFC.

4.3.7 Análise imunofenotípica dos linfócitos do pulmão e citocinas intracelulares

A resposta imune celular Th1 foi avaliada por citometria de fluxo. A análise imunofenotípica foi realizada em células do pulmão de animais BALB/c nos dias 7, 15 e 30 após o desafio com *Mtb* H37Rv.

Nos dias 7, 15 e 30 após o desafio, os animais foram sacrificados e os órgãos removidos assepticamente. O pulmão foi colocado em uma placa de petri com um pouco de RPMI (Gibco, Life Technologies), cortado em pequenos pedaços e transferido para um tubo falcon de 50 mL contendo 5 mL de RPMI com colagenase (0,5 mg/mL) e incubado por 45 min na estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, foram macerados, o volume foi completado para 10 mL com RPMI e foram centrifugados (280 x g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de tampão de lise dos eritrócitos (BD FACS Lysing solution, BD Biosciences), deixando agir por 1 min. Após a lise, o volume foi completado para 10 mL com RPMI e foi submetido a centrifugação novamente (280 x g, 10 min, 4 °C). Em seguida, verificou-se um anel vermelho ao redor das células, indicando a lise dos eritrócitos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de SFB e 10 µL/mL de antimicótico Anti-anti (Gibco, Life technologies). A contagem de células foi realizada através da coloração com Trypan, verificou-se a viabilidade e colocou-se 1×10^6 células/poço em placa de 96 poços para o procedimento de marcação de células com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos.

Um painel de anticorpos monoclonais conjugados com fluoresceína capaz de identificar os antígenos de superfície celular da linhagem linfóide T (CD3, CD4, CD8) e seu perfil de produção intracelular (IL-2, IFN- γ e TNF- α) foi utilizado, como descrito nas tabelas 1 e 2. O CD3 foi utilizado como marcador comum. Para o procedimento de marcação de células, a placa foi lavada com tampão PBS contendo 0,5% de SFB e 2 mM EDTA (tampão Macs), foi adicionado 100-200 µL/poço e submeteu-se a centrifugação 280 x g, 10 min, 4 °C. Depois da lavagem, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se o *mix* α CD3/ α CD4/ α CD8 (100 µL de tampão Macs + 0,5 µL de anticorpo/poço). As células foram ressuspensas e a placa foi colocada por 30 min na geladeira. Em seguida, as células foram submetidas a centrifugação 280 x g, por 10 min,

o sobrenadante foi descartado e foi adicionado tampão Macs. Depois dessa última lavagem, foi realizada a marcação intracelular utilizando o *kit* de permeabilização e fixação da BD Bioscience (BD Cytfix/Cytoperm). Adicionou-se 100 μ L da solução permeabilizadora (reagente do kit) e incubou-se 20 min na geladeira. Após a incubação, adicionou-se 100 μ L de tampão BD Perm/wash 10 x (diluído com água MiliQ). Submeteu-se a centrifugação. Em seguida, foi adicionado o *mix* de citocinas intracelulares α IL-2 / α IFN- γ / α TNF- α (100 μ L de tampão BD Perm/wash + 1 μ L de anticorpo/poço). Incubou-se 30 min na geladeira. Após a incubação, submeteu-se a centrifugação. Em seguida, foi realizado o procedimento de lavagem com tampão Macs e adicionado formaldeído 1% para leitura no FACSCanto II (BD Biosciences).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise imunofenotípica das células do pulmão e do baço.

Anticorpo	Laboratório	Código	Clone
Anti - CD3- APC Cy7	BD Biosciences	560590	17A2
Anti - CD4 - PE-Cy 5.5	BD Biosciences	553654	H129.19
Anti - CD8 - PE-Cy 7	BD Biosciences	552877	53-6.7

Tabela 2. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise da produção de citocinas intracelulares.

Anticorpo	Laboratório	Código	Clone
Anti - IL-2 - APC	BD Biosciences	554428	JES6-5H4
Anti - TNF- α - PE	BD Biosciences	554419	MP6-XT22
Anti - IFN- γ - FITC	BD Biosciences	554411	XMG1.2

4.3.8 Produção de citocinas Th1/Th2/Th17

Os níveis das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram quantificados no sobrenadante de cultura de pulmão de camundongos usando o *kit* para citocinas murinas (BD Biosciences).

Para a obtenção de sobrenadante de cultura, o pulmão foi processado como descrito no item 4.3.7. Foi realizada a contagem de células através da coloração com Trypan e a viabilidade verificada. Cerca de 2×10^5 células foram colocadas em placas de cultura de 96 poços (Corning Glass Works, Corning, NY) em 200 μ L de volume por poço. Foi realizado o estímulo da cultura com extrato de *Mtb* (5 μ g/mL), ou conA (5 μ g/mL, Sigma) como controle positivo. As culturas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 h e o sobrenadante das culturas coletado para determinar a secreção de citocinas por CBA. O Kit CBA (BD) (*Cytometric Beads Array*) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas Th1/Th2/Th17 em uma mesma amostra, como descrito anteriormente no item 4.2.6.

4.3.9 Análise histopatológica

Aos 15 e 30 dias após o desafio intratraqueal com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv, o lobo pulmonar caudal direito de animais BALB/c e C57BL/6, respectivamente, foi perfundido com solução salina tamponada com formaldeído 10%. Os tecidos foram seccionados, corados com hematoxilina e eosina e examinados em microscópio Leica (Germany) e as imagens foram capturadas com uma câmera Coolpix P995 Nikon (Japan). Cinco imagens randômicas de cada secção de pulmão corada com HE (40x magnificação) foram analisadas usando o *software* ImageJ (National Institutes of Health, EUA) para gerar um índice de porcentagem de redução da área alveolar, como previamente descrito (AMARAL et al., 2014).

4.4 Avaliação da indução de resposta imune em macrófagos humanos in vitro

4.4.1 Macrófagos derivados de sangue total humano

O protocolo foi aprovado e realizado no Centro Médico da Universidade de Leiden, Holanda. Os monócitos foram isolados de sangue total de doadores saudáveis por separação por FICOLL e por *sorting* usando *beads* CD14 MACS (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany). Os macrófagos M1 and M2 foram gerados pela diferenciação dos monócitos por 6 dias em presença de 5 ng/mL de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, BioSource Life Technologies-Invitrogen) ou 50 ng/mL de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF, R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) respectivamente, como previamente reportado (KORBEE et al., 2018). As células foram cultivadas em 10 mL de meio RPMI 1640 (Life Technologies-Invitrogen) com SFB 10%, 2 mM L-Alanil-L-Glutamina (PAA, Liz,

Austria) e Penicilina (50 U/mL) - Estreptomicina (50 $\mu\text{g/mL}$) (ThermoFisher). No dia 3, foram adicionados mais 5 mL do mesmo meio. No dia 6, os macrófagos M1 foram coletados usando Tripsina (Sigma-Aldrich) e raspagem com auxílio de *cell scraper* (Sigma-Aldrich); os macrófagos M2 foram coletados apenas usando Tripsina (Sigma-Aldrich). Os macrófagos coletados foram lavados com 40-50 mL de PBS estéril e contados usando um contador de células automatizado (CASY, Roche). As células foram submetidas aos testes de controle de qualidade: imunofenotipagem (avaliação da expressão dos anticorpos de superfície - CD14-FITC, CD11b-PE, CD163-APC) por citometria de fluxo; e avaliação da produção de citocinas (IL-10 e IL-12(p40)) por ELISA (Figura 8).

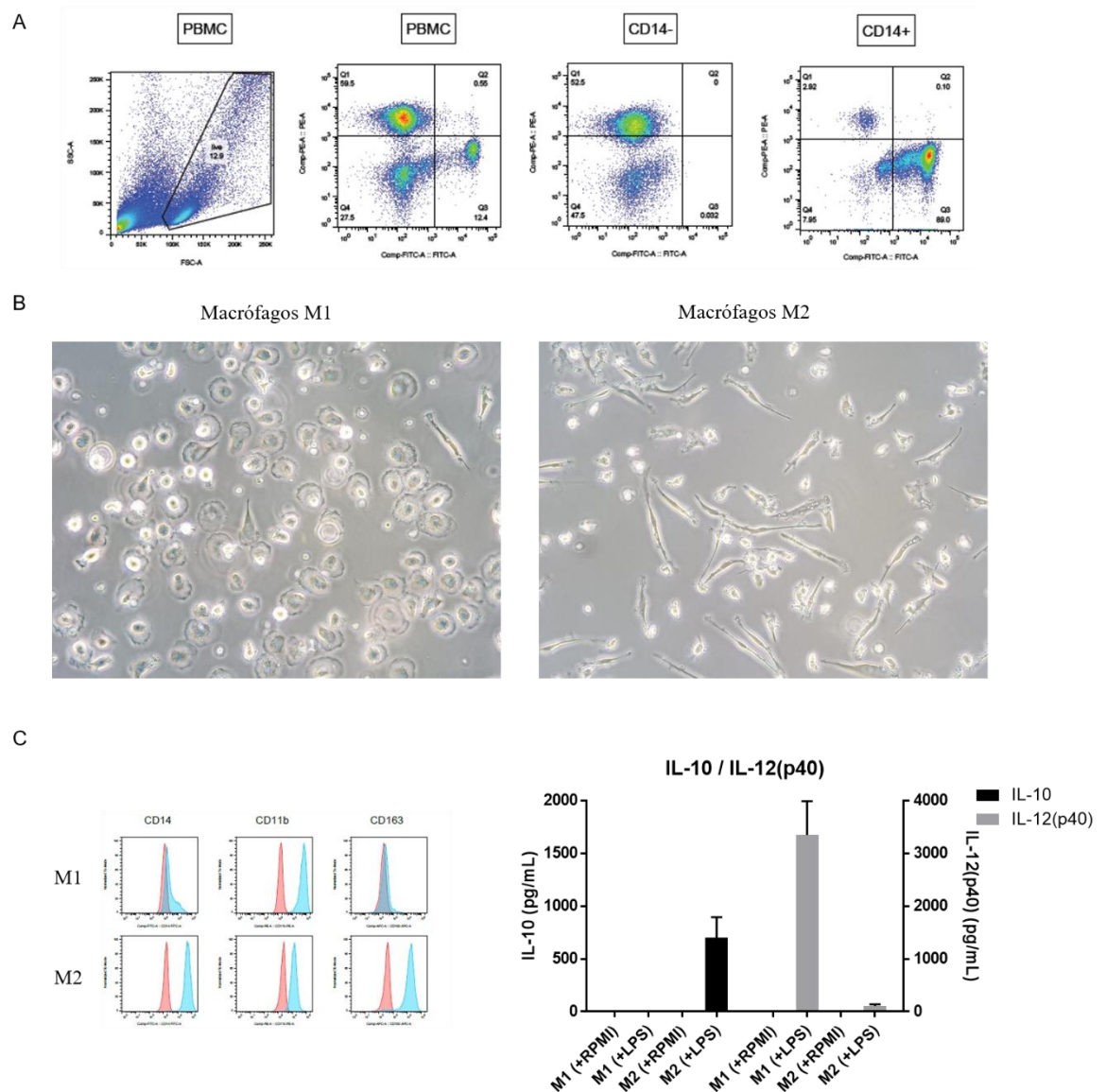


Figura 8. Controle de qualidade dos macrófagos M1 e M2 derivados do sangue total humano. Representativo do controle de qualidade da obtenção de monócitos e diferenciação de macrófagos M1 e

M2. (A) As células polimorfanucleares (PBMC) foram isoladas a partir de sangue total de doadores saudáveis por separação por Ficoll e os monócitos separados por *sorting* usando *beads* CD14 MACS. O PBMC total (antes do *sorting*), a fração negativa (CD14⁻) e a fração positiva (CD14⁺) após *sorting* foram marcados com anti-CD14 (FITC) e a porcentagem e pureza de monócitos avaliada (85-100%). Após 6 dias de diferenciação em macrófagos M1 e macrófagos M2, as células foram avaliadas por: (B) morfologia, macrófagos M1 são arredondados e M2 têm forma de haste; (C) citometria de fluxo (M1: CD14^{negativo}/ CD11b^{alto} / CD163^{negativo}; M2: CD14^{alto} / CD11b^{normal} / CD163^{alto}) e por ELISA (M1 estimulados por LPS produzem IL-12(p40); M2 estimulados por LPS produzem IL-10).

4.4.2 Cultivo das bactérias e infecção de macrófagos

Os estoques das cepas de BCG, rBCG-LTAK63 e *Mtb* H37Rv foram descongeladas e colocados em cultura em meio MB7H9/OADC/Tw, contendo ou não 20 µg/mL Canamicina e incubados a 37 °C com 5% CO₂ até alcançarem a DO₆₀₀ 1,0. As bactérias foram usadas para infecção dos macrófagos *in vitro*. Um dia antes da infecção, as culturas de Mycobacteria foram diluídas para uma DO₆₀₀ correspondente com o início da fase log de crescimento DO₆₀₀ ~ 0,4. Culturas de macrófagos M1 e M2 foram inoculadas com 100 µL de rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv (multiplicidade de infecção, MOI, 10) e incubados a 37 °C / 5% CO₂ por 1 h, 24 h ou 48 h.

4.4.3 Ensaio de sobrevivência intracelular e estabilidade da construção rBCG-LTAK63 em infecção de macrófagos

Macrófagos M1 e M2 gerados de 4-7 doadores foram infectados com cepas de rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv (MOI 10) por 1 h, 24 h e 48 h. Após cada intervalo de tempo, as células foram lavadas com RPMI com alta concentração de gentamicina (50 µg/mL) para eliminar a bactéria extracelular e foram deixadas por 2 h com RPMI com baixa concentração de gentamicina (5 µg/mL). Após esse período, o sobrenadante foi removido e as células foram lisadas com água com 0,05% SDS. Após a lise, o homogenato foi diluído 5, 25, 125 ou 375 vezes e plaqueado em MB7H10/OADC contendo ou não 20 µg/mL de Canamicina. Após cerca de 15 dias, a UFC foi visualizada em microscópio e contada.

4.4.4 Extração de RNA, dcRT-MLPA e análises

Após 24 h e 48 h de infecção dos macrófagos M1 e M2 com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv (MOI 10), as células infectadas foram coletadas em 350 µL de Trizol (Trizol®, Life Technologies). A extração de RNA foi realizada seguindo

protocolo previamente descrito no item 4.3.3, as quantidades dos reagentes foram adequadas para 350 μ L de Trizol.

A técnica de *dual-color Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (dcRT-MLPA) foi realizada como descrito anteriormente (JOOSTEN et al., 2012; HAKS et al., 2015). Brevemente, para cada sequência alvo específica, primers RT específicos foram desenhados flanqueando as sequências alvo a serem amplificadas. Em seguida foi realizada a transcrição reversa de 100 ng (macrófagos M1) ou 25 ng de RNA (macrófagos M2) usando a *transcriptase* reversa MMLV (Promega), e as meias-sondas flanqueadoras foram hibridizadas ao cDNA a 60°C *overnight*. Subsequentemente os fragmentos gênicos foram amplificados por PCR (33 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C e 60 s a 72 °C, seguido por um ciclo de 20 min a 72 °C). *Primers* e *probes* usados foram provenientes da Sigma-Aldrich Chemie e reagentes para realização do MPLA da MRC Holland (Amsterdam, Holanda). Produtos de amplificação de PCR foram diluídos 1:10 em Hi-Di *formamide* (ThermoFisher) contendo o marcador padrão de tamanho GeneScan 400HD ROX (ThermoFisher) e foram analisados no sequenciador capilar Applied Biosystems em modo GeneScan. Os dados foram analisados usando o *software* GeneMapper (Applied Biosystems/Life Technologies). As áreas atribuídas a cada pico (em unidades arbitrárias) foram exportadas para mais análises em software Microsoft Excel. Sinais abaixo do valor de corte para ruído no GeneMapper (área de pico transformada para $\log_2 \leq 7.64$) foram atribuídas ao valor limite para corte de ruído. A normalização dos dados foi realizada com o gene GAPDH. Os genes avaliados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de genes analisados por dcRT-MLPA e respectivas funções nas quais estão predominantemente envolvidos.

Função	Gene
Via de sinalização de Interferon (IFN)	CD274 FCGR1A GBP1 GBP2 GBP5 IFI6 IFI16 IFI35 IFI44 IFI44L IFIH1 IFIT2 IFIT3 IFIT5 IFITM3 INDO IRF7 OAS1 OAS2 OAS3 SOCS1 STAT1 STAT2 TAP1 TAP2
Inflamação	TNIP1
Crescimento celular/proliferação	BMP6 VEGF
Transporte celular	KIF1B
Ativação celular	SLAMF7 LYN HCK
Proteína ativadora de GTPase	ASAP1
Quimiocinas	CXCL9 CCL11 CX3CL1
Genes associados a resposta Th1/Th2	CXCL10 IL6
Genes associados às células mielóides	CD14 CCL3 CCL4 IL12B

4.4.5 Produção de citocinas pelos macrófagos infectados

O sobrenadante das células foi coletado 24 h e 48 h após infecção com rBCG-LTAK63 ou BCG e a produção das citocinas, IL12(p70), TGF- α , MCP-3, MDC, TNF- β , Eotaxina, Fractalkina, SCD40L, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-3, IL-5, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, IFN- γ , IP-10, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL12(p40), IL-7, IL-13, IFNA2, TGF- α , EGF, VEGF, FGF-2, PDGF-AA, PDGF-AB-BB, Fit-3L, G-CSF, GM-CSF, RANTES, foi avaliada usando Milliplex (Merck Millipore).

4.5 Análises estatísticas

Para avaliações estatísticas, os resultados foram colocados em uma planilha e os testes estatísticos *One-way* ANOVA ou *Repeated-measures* (RM)-ANOVA ou teste *Student's t* foram realizados, dependendo do tipo de análise requerida, com o apoio instrumental do *software* “GraphPad Prism 7” (Prism Software, Irvine, CA, USA). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P \leq 0,05$ ou quando o valor de P é indicado.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da resposta imune inata in vivo

5.1.1 Recrutamento de células induzido por rBCG-LTAK63 no peritônio

Ao avaliarmos o perfil das células recrutadas ao lavado peritoneal 24 h após a inoculação i.p. de BCG ou rBCG-LTAK63, verificamos o aumento significativo no número de células totais e neutrófilos quando comparamos com o grupo Salina. Apesar do número maior de macrófagos nos animais inoculados com BCG ou rBCG-LTAK63, não houve diferença estatística entre eles ou em relação ao grupo Salina. Também não houve alteração no número de linfócitos (Figura 9A). Aos 7 dias após a inoculação, de modo semelhante a 24 h, vemos um número estatisticamente maior de células totais e neutrófilos. Ocorre um aumento no número de macrófagos nos animais imunizados com BCG ou rBCG-LTAK63 em relação a 24 h; e em comparação com o grupo Salina, o número de macrófagos é estatisticamente maior nos animais imunizados com BCG ou rBCG-LTAK63. O número de linfócitos foi estatisticamente maior ($P \leq 0,05$) no peritônio dos animais inoculados com rBCG-LTAK63 quando comparamos com os grupos Salina e BCG (Figuras 9B). No 15º dia após a inoculação, o número de células totais já não é significativo nos animais imunizados com BCG ou rBCG-LTAK63. Ainda é possível ver diferença estatística no número de neutrófilos ao comparamos com o grupo Salina. O número de linfócitos foi estatisticamente maior no lavado peritoneal dos animais inoculados com BCG ou rBCG-LTAK63 quando comparamos com o grupo Salina. Não houve diferença no número de macrófagos entre os grupos estudados (Figura 9C).

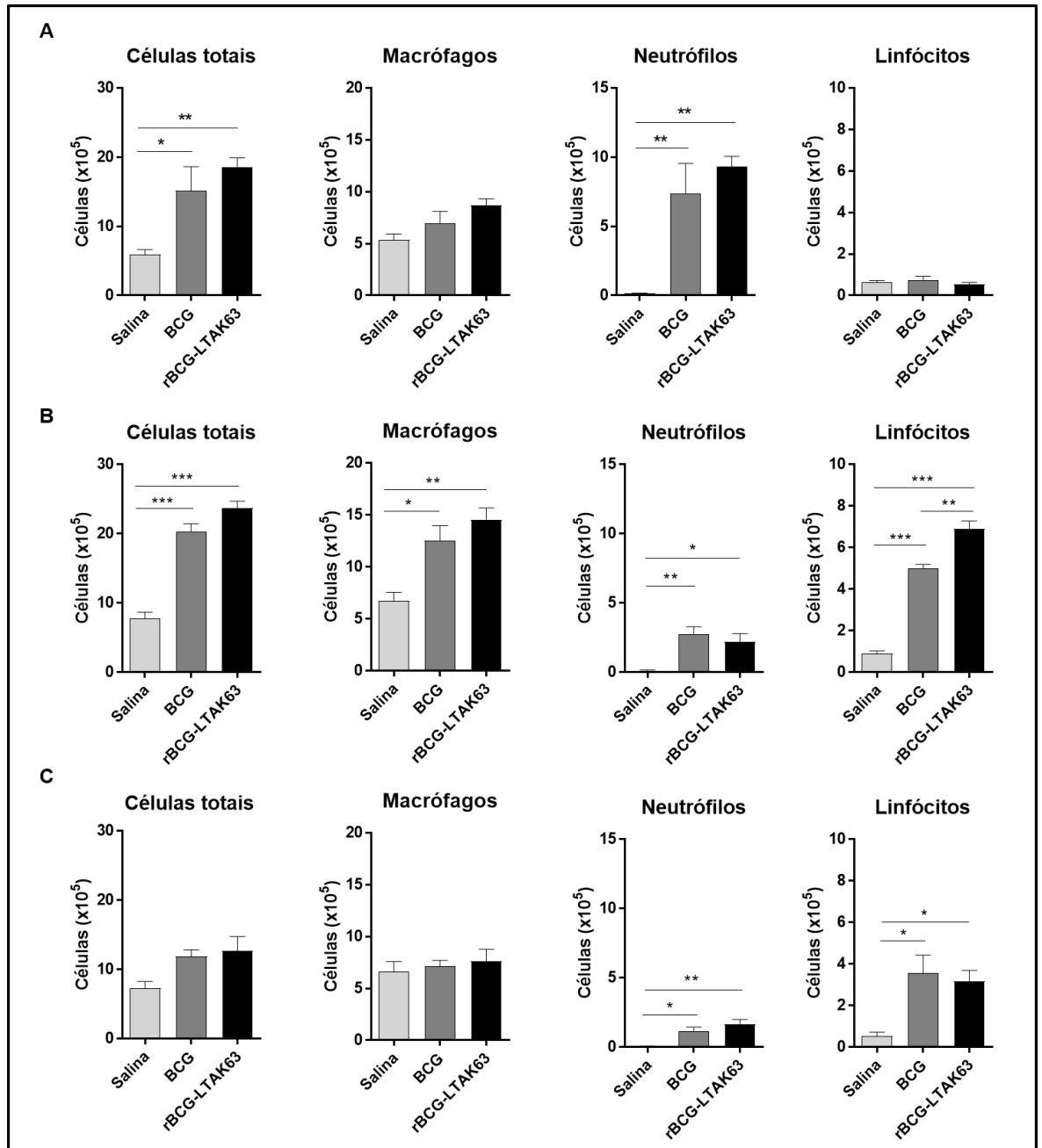


Figura 9. Recrutamento de células 24 h, 7 dias e 15 dias após inoculação intraperitoneal de rBCG-LTAK63 e BCG. Camundongos BALB/c (n= 5) foram inoculados por via intraperitoneal com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal) e um grupo controle recebeu Salina. As células peritoneais foram coletadas (A) 24 h, (B) 7 dias e (C) 15 dias após a inoculação para contagem diferencial (células totais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos) e imunofenotipagem por citometria de fluxo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$) entre os grupos indicados (*one-way ANOVA*).

5.1.2 Produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e citocinas inflamatórias

Avaliamos a produção de NO pelas células do peritônio 24 h e 7 dias após a inoculação i.p. de BCG ou rBCG-LTAK63. Após 24 h, os animais que receberam

rBCG-LTAK63 produziram espontaneamente uma concentração de NO estatisticamente maior ($P \leq 0,05$) que os animais do grupo BCG ou Salina (Figura 10A). Aos 7 dias não foi detectada produção de NO nos grupos de estudo.

Verificamos elevada produção de H_2O_2 cerca de 24 h após inoculação i.p. de BCG ou rBCG-LTAK63. Essa produção foi estatisticamente maior ao compararmos com o grupo Salina (Figura 10B). Já aos 7 dias, nota-se uma liberação estatisticamente maior de H_2O_2 nos animais imunizados com rBCG-LTAK63 em relação ao grupo BCG e em relação ao grupo Salina (Figura 10E).

Ao avaliarmos a produção de citocinas 24 h após a inoculação i.p., vemos que não houve diferença na produção de $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ entre os grupos (Figuras 10C, 10D). No entanto, após 7 dias vemos a produção de $IFN-\gamma$ estatisticamente maior nos animais que receberam BCG ou rBCG-LTAK63 quando comparamos com o grupo Salina (Figura 10F). Apenas os animais inoculados com rBCG-LTAK63 apresentaram significativa produção de $TNF-\alpha$ quando comparamos com o grupo Salina (Figura 10G).

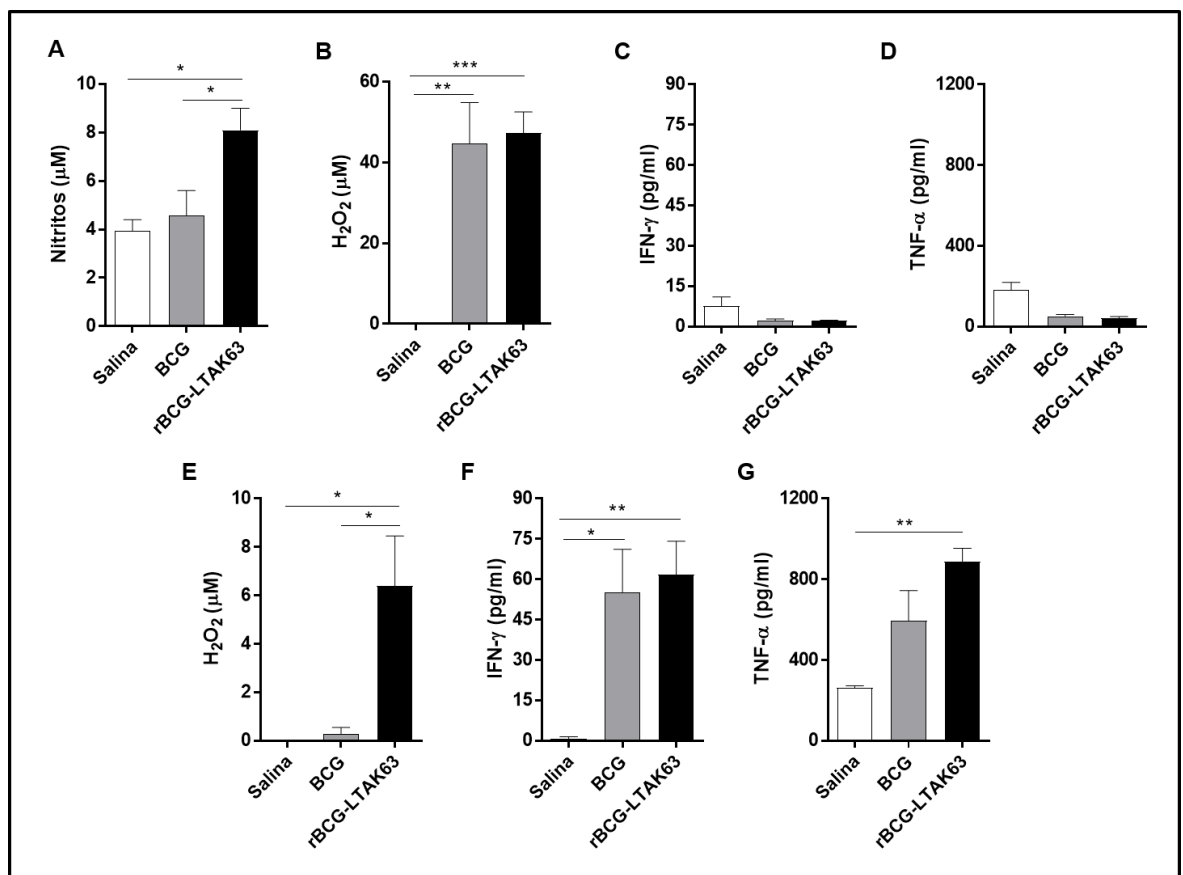


Figura 10. Produção de NO, H₂O₂ e citocinas inflamatórias pelas células peritoneais dos animais 24 h e 7 dias após inoculação de rBCG-LTAK63 e BCG. Camundongos BALB/c (n= 5) foram inoculados por via intraperitoneal com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal) e um grupo controle recebeu Salina. A concentração de (A) nitritos, (B) H₂O₂, (C) IFN- γ e (D) TNF- α foram quantificadas no sobrenadante da cultura de células peritoneais coletadas 24 h após inoculação de BCG ou rBCG-LTAK63. As concentrações de (E) H₂O₂, (F) IFN- γ e (G) TNF- α foram quantificadas no sobrenadante da cultura de células peritoneais coletadas 7 dias após inoculação de BCG ou rBCG-LTAK63. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (*P \leq 0,05; **P \leq 0,01; ***P \leq 0,001) entre os grupos indicados (*one-way* ANOVA).

5.2 Indução da resposta imune adaptativa após imunização e após o desafio

5.2.1 Resposta imune induzida por rBCG-LTAK63 em camundongos BALB/c 90 dias após imunização

O perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 induzido foi avaliado no pulmão dos animais 90 dias após a imunização s.c. com BCG ou rBCG-LTAK63. Verificou-se que a imunização s.c. com rBCG-LTAK63 induziu uma produção estatisticamente maior (P \leq 0,05) de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10 quando comparado com o BCG. Houve uma produção estatisticamente significativa de IL-2 no grupo imunizado com BCG ou rBCG-LTAK63 em relação ao grupo controle, no entanto nenhuma diferença foi observada entre eles (Figura 11).

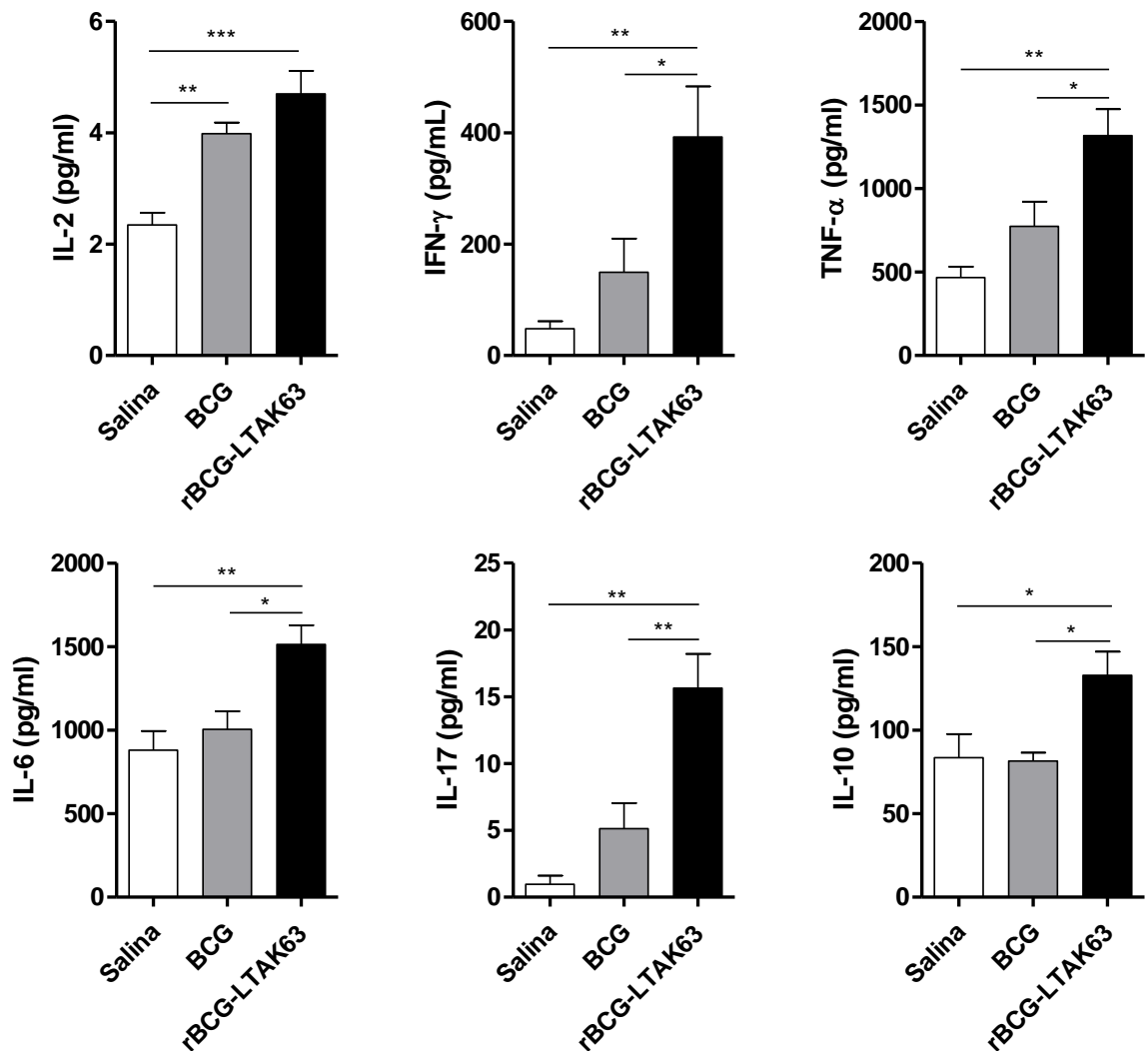


Figura 11. Produção de citocinas no pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63. Camundongos BALB/c (n= 4-5 animais) foram imunizados por via subcutânea com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal) e um grupo recebeu Salina. Os pulmões foram coletados 90 dias após imunização e estimulados com extrato de *Mtb* por 24 h ou 48 h. A produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$) entre os grupos indicados (*one-way* ANOVA).

5.2.2 Cinética da carga bacilar no pulmão de animais BALB/c imunizados após a infecção com *Mtb* H37Rv

Para verificar a cinética da carga bacilar ao longo do desafio, coletamos o pulmão de camundongos BALB/c nos dias 7, 15 e 30 dias após o desafio com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv para determinar o número de UFC, como está descrito na Figura 7. Verificou-se que até o 15º dia após o desafio houve um aumento da carga bacilar nos pulmões dos animais de todos os grupos. Vemos que do 15º ao 30º dia a

carga bacilar nos pulmões dos animais dos grupos BCG e Salina continua aumentando. Por outro lado, a partir do 15º dia, a carga bacilar nos animais imunizados com rBCG-LTAK63 começa a diminuir, levando a uma redução significativa ($P \leq 0,05$) de cerca de 2.0 logs no número de UFC nos pulmões desses animais 30 dias após o desafio ao compararmos com o grupo BCG (Figura 12).

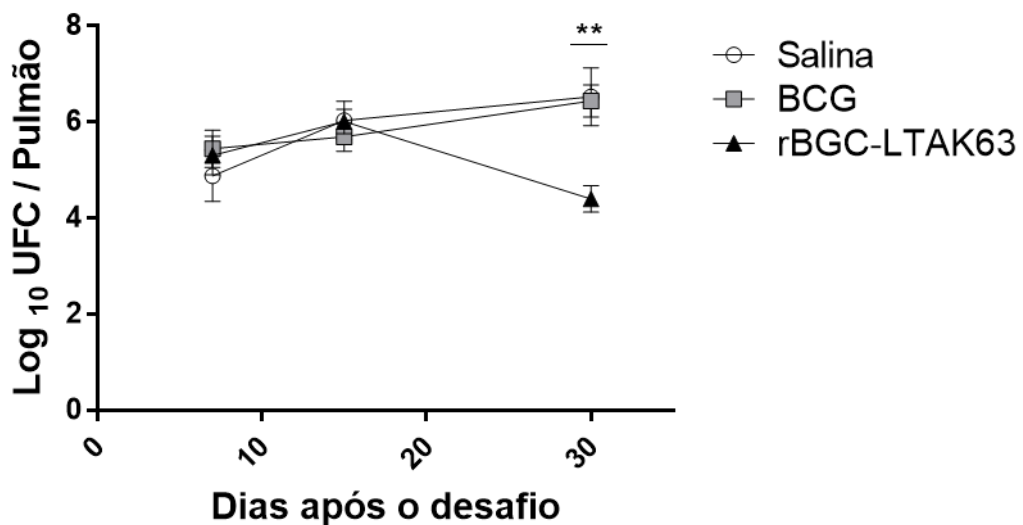


Figura 12. Cinética da carga bacilar no pulmão dos animais imunizados durante a infecção com *Mtb* H37Rv. Camundongos BALB/c (n= 7-10) foram imunizados por via subcutânea com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal) e um grupo recebeu Salina. Os animais foram desafiados com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv 90 dias após a imunização. Os pulmões foram coletados e plaqueados para avaliação do número de UFC nos dias 7, 15 e 30 após o desafio. Os resultados representam um de dois experimentos independentes com resultados similares. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (** $P \leq 0,01$) quando comparadas com o grupo BCG (*one-way* ANOVA).

5.2.3 Resposta imune celular induzida pela imunização nos pulmões dos animais BALB/c em diferentes intervalos de tempo após o desafio

Na tentativa de identificar correlatos de proteção, comparamos a resposta imune após imunização com BCG ou rBCG-LTAK63 em um modelo murino de infecção de TB. Aos 7 dias após o desafio, os pulmões dos animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram quantidade estatisticamente maior ($P \leq 0,05$) de linfócitos T CD4⁺ TNF- α ⁺ que os pulmões dos animais do grupo salina. Avaliamos também no período de 7 dias, a presença de células T multifuncionais e verificamos uma maior quantidade de linfócitos T CD4⁺ IL-2⁺ TNF- α ⁺ nos pulmões dos animais imunizados com rBCG-

LTAK63 do que nos animais imunizados com BCG ou Salina, embora não tenha sido significativo. As demais subpopulações de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺, T CD4⁺ IL-2⁺ e T CD4⁺ IFN- γ ⁺ TNF- α não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de estudo (Figura 13).

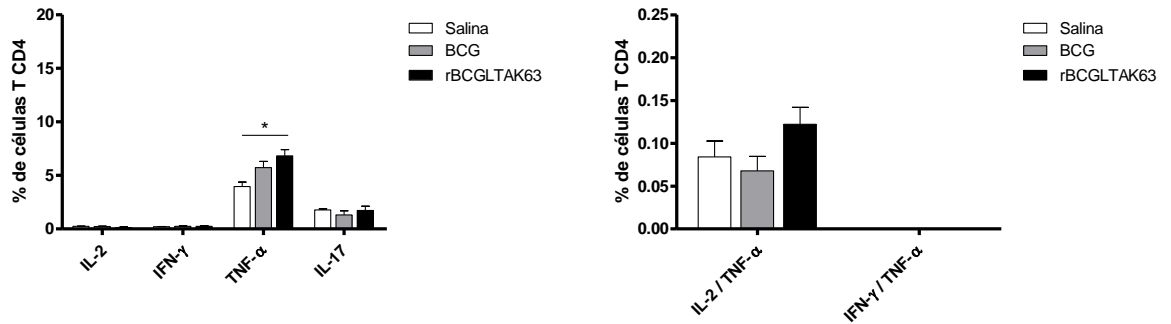


Figura 13. Avaliação das células T CD4⁺ no pulmão dos animais aos 7 dias após o desafio com *Mtb* H37Rv. Camundongos BALB/c (n= 3-4 animais) foram imunizados por via subcutânea com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal) e um grupo recebeu Salina. Os animais foram desafiados com a cepa de *Mtb* H37Rv 90 dias após a imunização. No dia 7 após a infecção, os pulmões foram coletados e a produção intracelular de citocinas das células T CD4⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados representam um de dois experimentos independentes com resultados similares. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) quando comparadas com o grupo BCG (*one-way* ANOVA).

Ao avaliarmos a produção de citocinas 7 dias após o desafio, verificamos que os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram concentrações estatisticamente maiores ($P \leq 0,05$) de IL-6 e IL-10 quando comparamos com o grupo Salina; essas citocinas também mostraram a tendência de estarem elevadas ao comparamos com o grupo BCG. Os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram tendência de produzirem menores níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α que os animais imunizados com BCG. Os animais imunizados com BCG, por sua vez, apresentaram níveis estatisticamente maiores de IL-2, IFN- γ e TNF- α quando comparamos com o grupo Salina. Não houve diferença nos níveis de IL-17 e não houve produção de IL-4 (Figura 14).

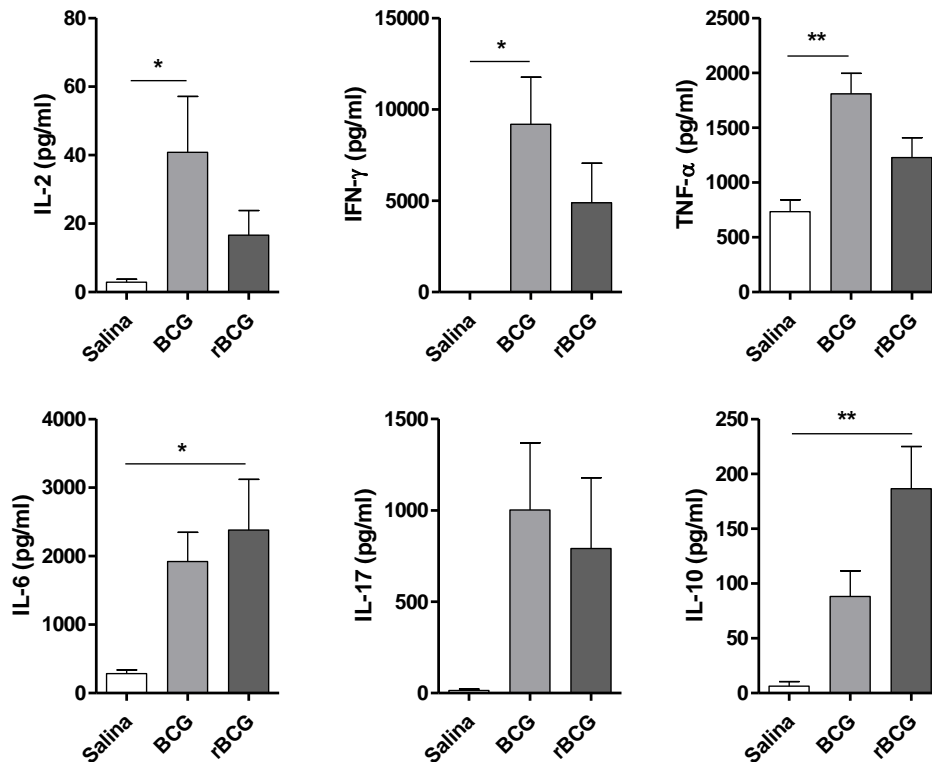


Figura 14. Produção de citocinas no pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63. Camundongos BALB/c (n= 4-5 animais) foram imunizados por via s.c. com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal) e um grupo recebeu Salina. Os animais foram desafiados com a cepa de *Mtb* H37Rv 90 dias após a imunização. No dia 7 após a infecção, os pulmões foram coletados e estimulados em cultura com extrato de *Mtb*. Após 48 h, a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados representam um de dois experimentos independentes com resultados similares. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$) entre os grupos indicados (*one-way* ANOVA).

Aos 15 dias após o desafio, os pulmões dos animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram quantidade significativamente maior de linfócitos T $CD4^+$ $TNF-\alpha^+$ que os pulmões dos animais do grupo BCG ($P \leq 0.05$). Avaliamos também no período de 15 dias, a presença de células T multifuncionais e verificamos uma quantidade estatisticamente maior de linfócitos T $CD4^+$ $IL-2^+$ $TNF-\alpha^+$ nos pulmões dos animais imunizados com rBCG-LTAK63 do que nos animais imunizados com BCG. As demais subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ $IFN-\gamma^+$, T $CD4^+$ $IL-2^+$ e T $CD4^+$ $IFN-\gamma^+$ $TNF-\alpha$ não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de estudo (Figura 15).

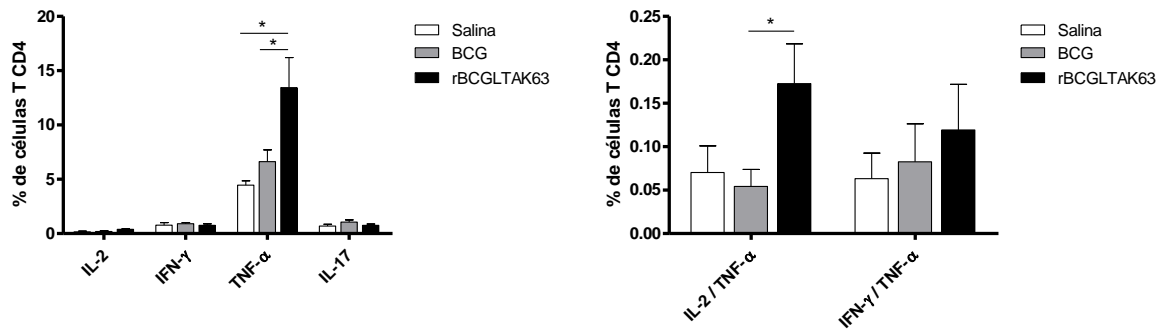


Figura 15. Avaliação das células T CD4⁺ no pulmão dos animais aos 15 dias após o desafio com *Mtb* H37Rv. Camundongos BALB/c (n= 3-4 animais) foram imunizados por via s.c. com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal) e um grupo recebeu Salina. Os animais foram desafiados com a cepa de *Mtb* H37Rv 90 dias após a imunização. No dia 15 após a infecção, os pulmões foram coletados e a produção intracelular de citocinas das células T CD4⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados representam um de dois experimentos independentes com resultados similares. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) quando comparadas com o grupo BCG (*one-way* ANOVA).

Ao avaliarmos a produção de citocinas 15 dias após o desafio, os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram níveis estatisticamente menores ($P \leq 0,05$) de IFN- γ e TNF- α quando comparamos com o grupo BCG; assim como aos 7 dias, apresentaram níveis maiores de IL-10 quando comparamos com o grupo Salina. As demais citocinas não apresentaram diferenças entre os grupos e não houve produção de IL-4 (Figura 16).

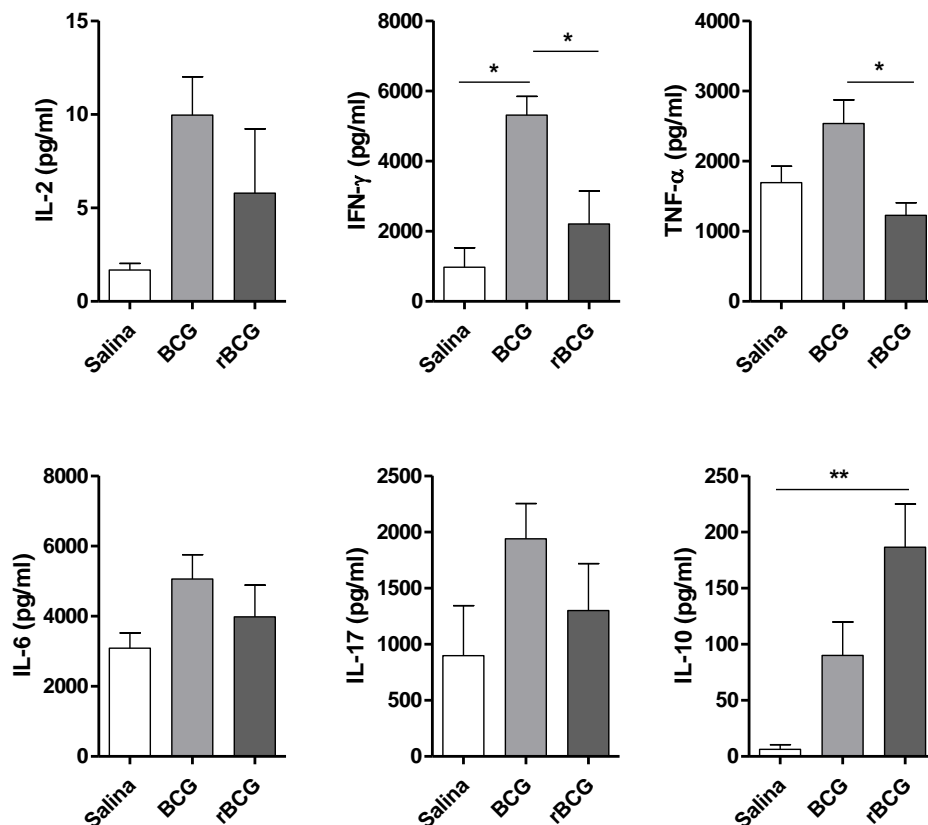


Figura 16. Produção de citocinas no pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63. Camundongos BALB/c (n= 4-5 animais) foram imunizados por via s.c. com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC / animal) e um grupo recebeu apenas salina. Os animais foram desafiados com a cepa de *Mtb* H37Rv 90 dias após a imunização. No dia 15 após a infecção, os pulmões foram coletados e estimulados em cultura com extrato de *Mtb*. Após 48 h, a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados representam um de dois experimentos independentes com resultados similares. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) quando comparadas com o grupo BCG (*one-way* ANOVA).

5.2.4 Proteção induzida pelo rBCG-LTAK63 em animais C57BL/6 após o desafio com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv

Avaliamos a eficácia protetora do rBCG-LTAK63 em outra linhagem de camundongos, a C57BL/6. Foi observado uma redução significativa ($P \leq 0,05$) da carga bacilar de cerca de 1,3 logs no número de UFC nos pulmões dos animais imunizados rBCG-LTAK63 em relação ao grupo BCG (Figura 17).

O peso dos animais imunizados foi acompanhado diariamente até o vigésimo quarto dia antes da coleta dos pulmões. Pode-se notar que no 20º dia de infecção os animais imunizados com rBCG-LTAK63 não apresentavam redução de peso, apresentando uma pequena variação ao longo dos dias. Já os animais imunizados com BCG ou os que receberam Salina, no 20º dia, apresentavam redução de peso e tiveram

uma variação maior ao longo do tempo até o momento de serem sacrificados. A partir do 18º dia após o desafio, os animais do grupo Salina apresentaram peso estatisticamente menor em relação aos animais do grupo rBCG-LTAK63 (Figura 17). Não houve diferença de peso estatística entre o grupo rBCG-LTAK63 e BCG.

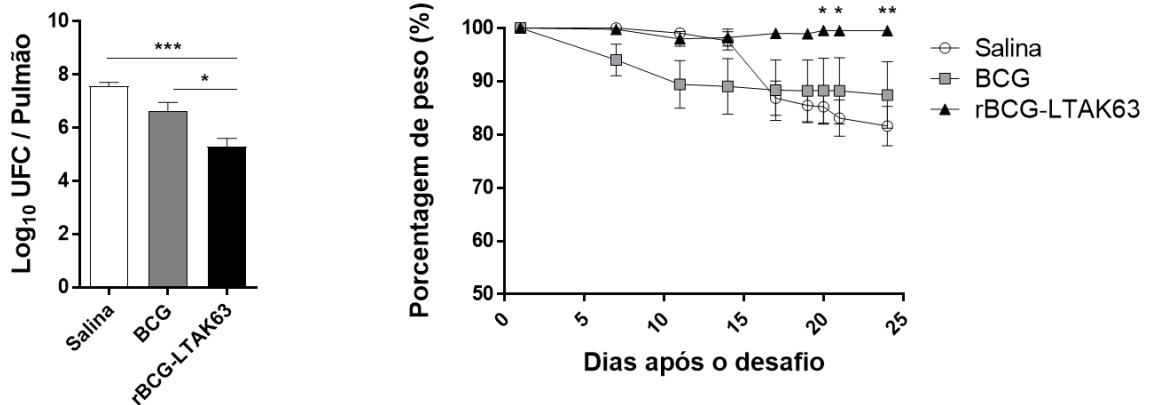


Figura 17. Proteção dos animais C57BL/6 imunizados com rBCG-LTAK63 contra a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv. Camundongos C57BL/6 (n= 8-10 animais) foram imunizados por via s.c. com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC / animal) e um grupo recebeu Salina. Os animais foram desafiados com a cepa virulenta de *Mtb* H37Rv 90 dias após a imunização. Cerca de 30 dias após o desafio, os pulmões foram coletados e plaqueados para avaliação do número de UFC. O peso dos animais foi acompanhado após o desafio. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$) entre os grupos indicados (*one-way* ANOVA).

5.2.5 Análises histopatológicas

A análise histopatológica do pulmão é um importante parâmetro para avaliar a proteção para TB. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados com BCG ou rBCG-LTAK63, ou receberam Salina. Os pulmões dos animais foram coletados para análise histopatológica aos 15 e 30 dias após desafio com *Mtb* H37Rv. Pulmões de animais que não foram nem imunizados nem desafiados foram usados como Controle.

Os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram menor infiltrado celular e menor redução da área alveolar quando comparado com os imunizados com BCG, tanto aos 15 dias após o desafio para os animais BALB/c (Figura 18 A), quanto aos 30 dias após o desafio para os animais C57BL/6 (Figura 18B).

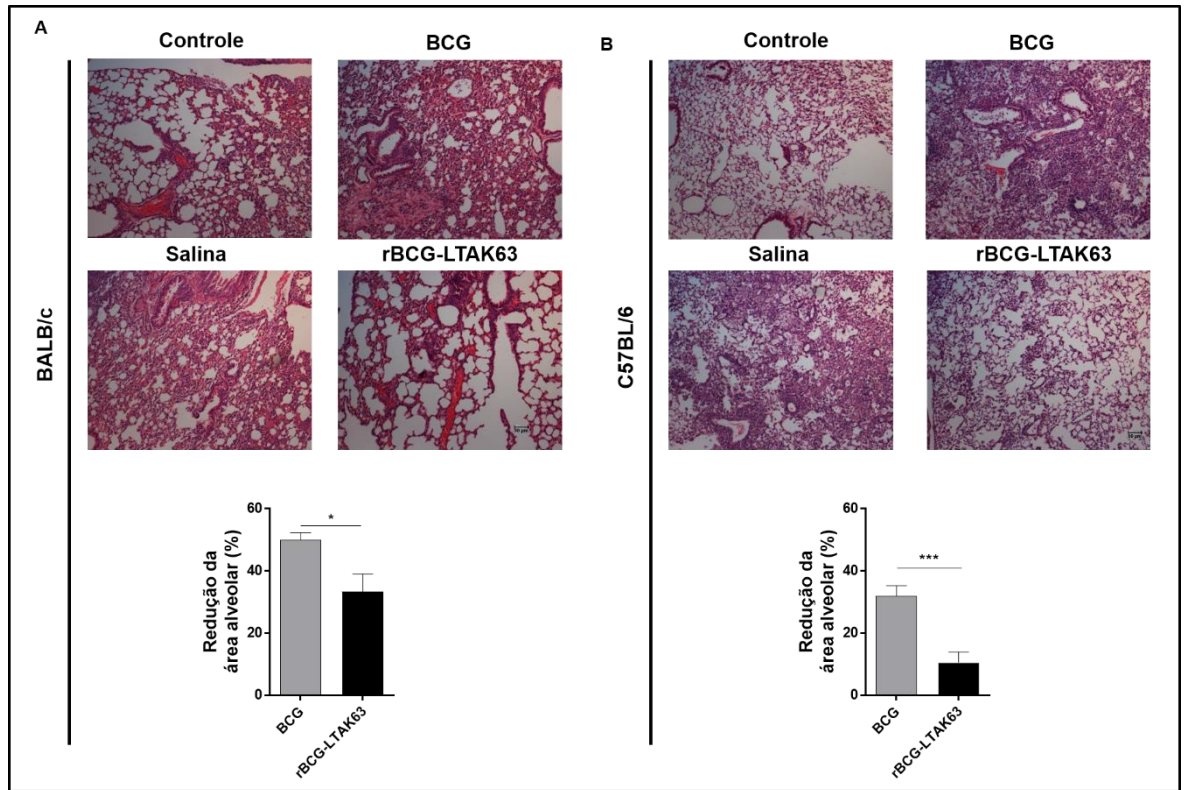


Figura 18. Análises histopatológicas dos pulmões dos animais imunizados com rBCG-LTAK63 no 15° e 30° dia após o desafio. (A) Aos 15 dias após o desafio com a cepa de *Mtb* H37Rv, os pulmões dos animais BALB/c imunizados com BCG ou rBCG-LTAK63, dos que receberam Salina e dos animais controle não desafiados (controle), foram coletados para análise histopatológica. As imagens mostram cortes histológicos representativos de cada grupo corados com HE (40x magnificação). (B) Aos 30 dias após o desafio com a cepa de *Mtb* H37Rv, os pulmões dos animais C57BL/6 imunizados com BCG ou rBCG-LTAK63, dos que receberam Salina e dos animais controle não desafiados (controle), foram coletados para análise histopatológica. As imagens mostram cortes histológicos representativos de cada grupo corados com HE (40x magnificação).

5.2.6 Expressão de genes relacionados a resposta imune no PBMC e no sangue total

Verificamos que não houve diferença entre os grupos na expressão de *IFN- γ* e *TNF- α* no PBMC 60 dias após imunização, 1 e 7 dias após o desafio.

Ao avaliarmos a expressão de citocinas no sangue total, 7 dias após o desafio, vemos níveis semelhantes da expressão de genes relacionados às citocinas *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-6* e *TGF- β* entre os grupos de estudo. Os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram a tendência de expressar maiores níveis da quimiocina *CXCL9* (Figura 19).

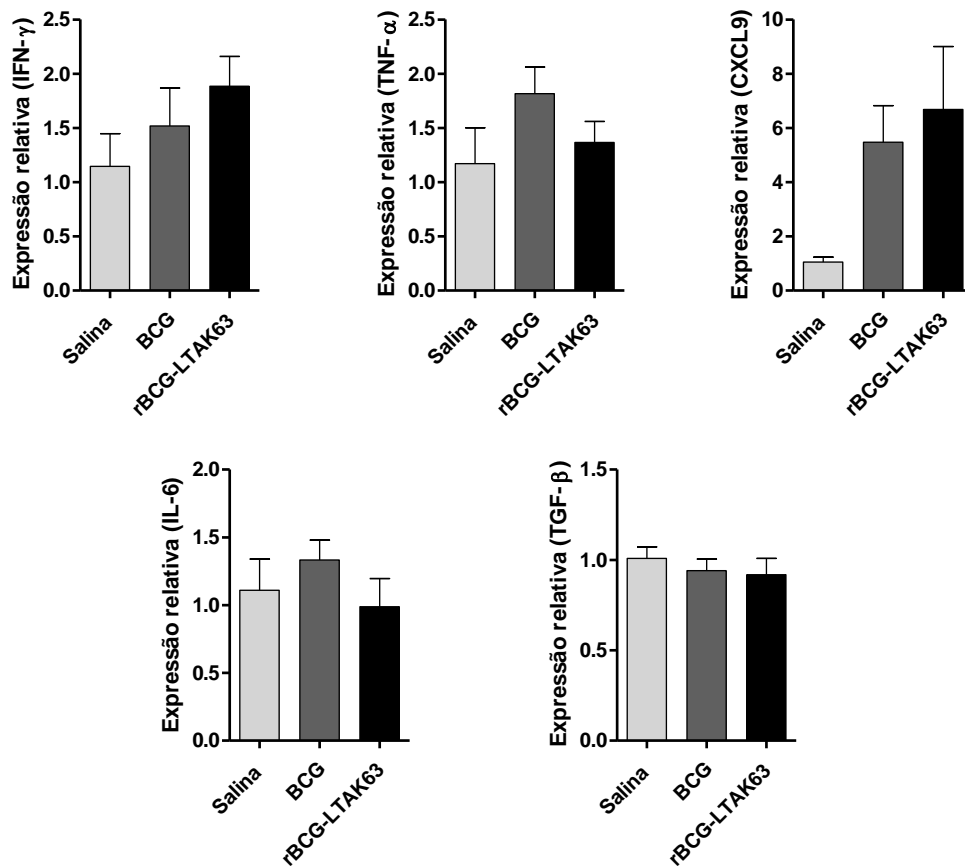


Figura 19. Expressão de genes relacionados a resposta imune no sangue total. Os animais foram imunizados por via subcutânea com BCG ou rBCG-LTAK63 (1×10^6 UFC/animal). Um grupo controle recebeu Salina. Após 90 dias de imunização, os animais foram desafiados com a cepa *Mtb* H37Rv. No dia 7 após o desafio o sangue foi coletado. No sangue total, a expressão gênica relativa de citocinas foi avaliada por qRT-PCR. Não houveram diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) (*one-way* ANOVA).

5.3 Avaliação da resposta imune induzida em macrófagos *in vitro*

5.3.1 Estabilidade da construção rBCG-LTAK63 em macrófagos M1 e M2: cinética da carga bacilar intracelular

A expressão de proteínas heterólogas em micobactérias pode ser influenciada por vários fatores nas condições *in vitro* e *in vivo* (BASTOS et al., 2009; DA COSTA et al., 2014). Após a infecção de macrófagos com as diferentes micobactérias, a UFC de rBCG-LTAK63 recuperada de macrófagos M1 e M2 foi similar à de BCG (Figura 20A). A expressão do plasmídeo contendo o LTAK63 também foi estável em macrófagos M1 e M2 até 48 h após infecção, como é observado na UFC plaqueada em MB7H10/OADC/Tw com ou sem Canamicina (Figure 20B).

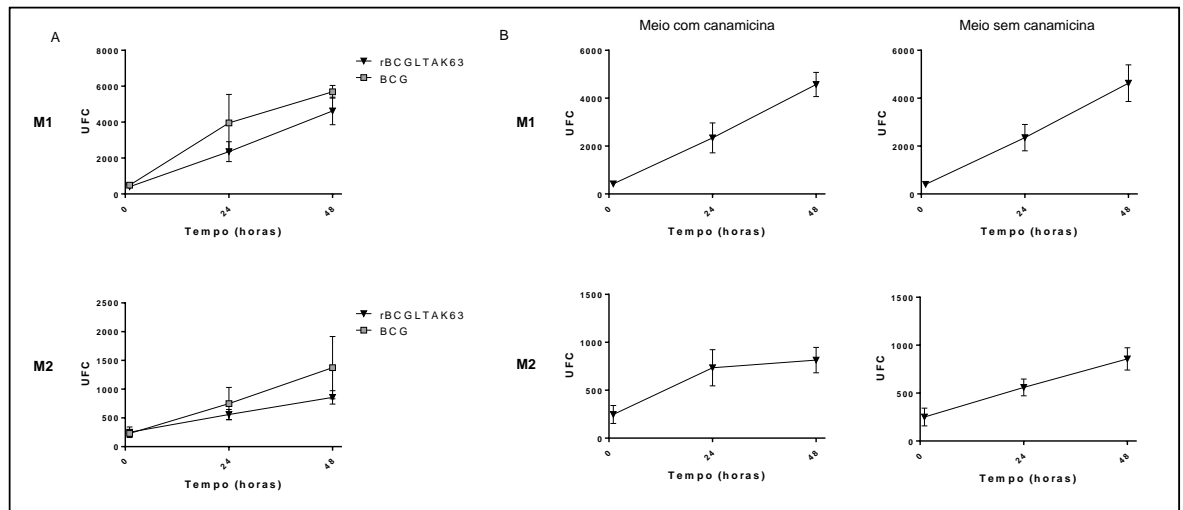


Figura 20. Estabilidade de rBCG-LTAK63 em macrófagos M1 e M2 avaliados pela cinética da carga intracelular de bactéria. (A) Macrófagos M1 e M2 de 4-7 doadores foram infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG (MOI 10) e a carga bacteriana intracelular foi recuperada 1 h, 24 h ou 48 h após infecção. (B) Carga bacteriana recuperada de macrófagos infectados com rBCG-LTAK63 foi plaqueada em meio MB7H10/OADC/Tw com ou sem Canamicina.

5.3.2 Perfil de genes diferencialmente expressos em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63, BCG e *Mtb* H37Rv

Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 após 24 h apresentaram 22 genes diferencialmente expressos (expressão relativa aos macrófagos M1 não infectados), enquanto os infectados com BCG apresentaram 15 genes diferencialmente expressos; sendo que 14 desses genes foram em comum (Figura 21A). Entre todos os genes analisados (Figura 21B), os genes *IFIT3*, *OAS3* e *CXCL9* foram regulados positivamente ($P \leq 0,05$) quando comparamos os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 com os infectados com BCG; e o gene *ASAP1* foi regulado negativamente nos macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com *Mtb* H37Rv (Figura 21C). As diferenças entre os grupos BCG e *Mtb* H37Rv foram menores, como evidenciado no *heat map*, apenas o gene *INDO* foi regulado positivamente nos infectados com BCG (Figura 21B).

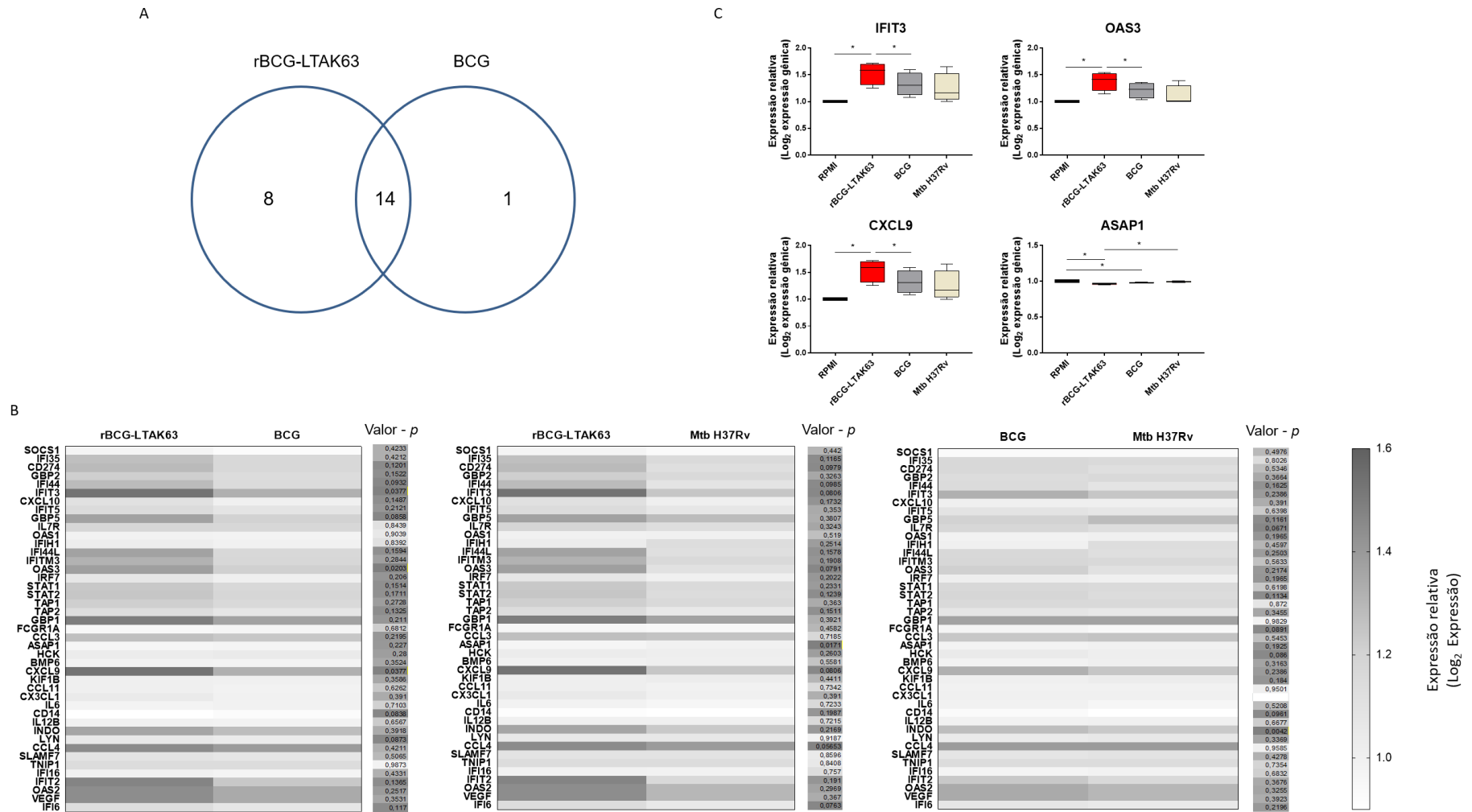


Figura 21. Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior número de genes diferencialmente expressos relacionados a um perfil inflamatório. Macrófagos M1 de 4 doadores foram infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv por 24 h e o RNA foi isolado para avaliação de expressão gênica por dcRT-MLPA. (A) Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG (expressão relativa aos macrófagos M1 não infectados). (B) Heat map da expressão de genes relacionados a resposta imune em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb*

H37Rv (expressão relativa aos macrófagos M1 não infectados) e diferenças estatísticas (valores de *P*) na comparação de macrófagos M1 infectados com: rBCG-LTAK63 versus BCG; rBCG-LTAK63 versus *Mtb* H37Rv; BCG versus *Mtb* H37Rv. (C) Genes diferencialmente expressos em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com BCG (*IFIT3*, *OAS3*, *CXCL9*) ou *Mtb* H37Rv (*ASAP1*). Diferenças estatísticas foram determinadas por *Student's t* teste ($P < 0,05$).

Após 48 h, os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram 22 genes diferencialmente expressos (expressão relativa aos macrófagos M1 não infectados), enquanto os infectados com BCG apresentaram 18 genes diferencialmente expressos; sendo que 16 desses genes foram em comum (Figura 22A). Nenhuma diferença foi observada quando comparamos os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 com os infectados com BCG (Figura 22B). Os genes *HCK* e *VEGF* foram regulados positivamente e o gene *CD14* foi regulado negativamente nos macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com *Mtb* H37Rv ($P \leq 0,05$). Maiores diferenças foram observadas entre macrófagos M1 infectados com BCG e *Mtb* H37Rv; os genes *IFI35*, *GBP2*, *IFI44*, *IFI44L*, *OAS3*, *TAP1*, *TAP2*, *FCGR1A*, *CCL3*, *IFI6*, *IFIT2*, *SLAMF7*, *CCL4*, *CD14* e *KIF1B* foram regulados negativamente e os genes *IFIT3* e *HCK* foram regulados positivamente nos macrófagos M1 infectados com BCG (Figura 22B).

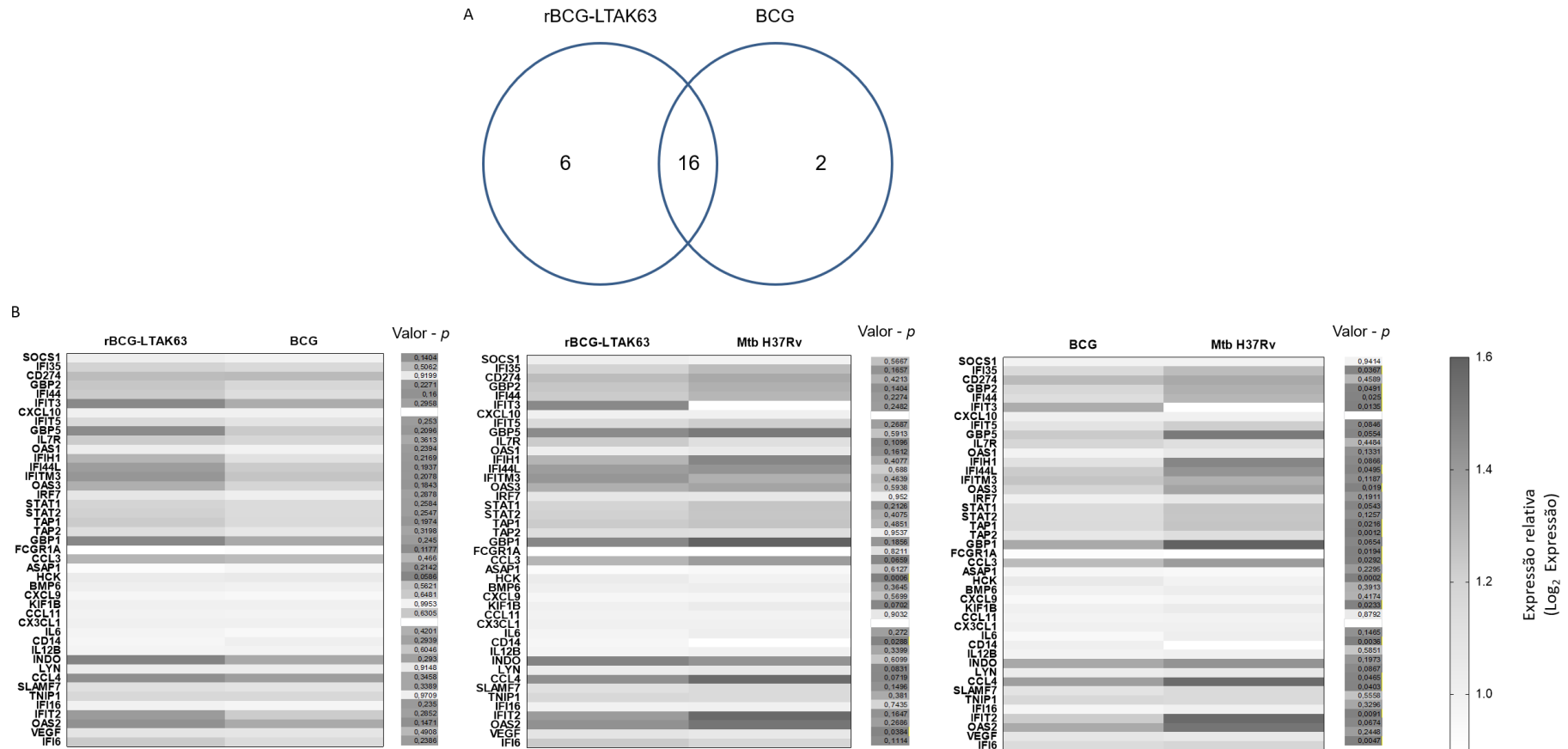
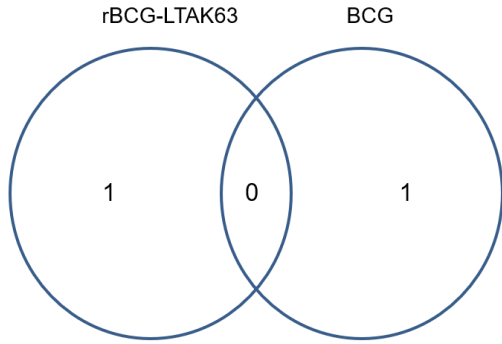


Figura 22. Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior número de genes diferencialmente expressos relacionados a um perfil inflamatório. Macrófagos M1 de 4 doadores foram infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv por 48 h e o RNA foi isolado para avaliação de expressão gênica por dcRT-MLPA. (A) Diagrama de *Venn* dos genes diferencialmente expressos em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG (expressão relativa aos macrófagos M1 não infectados). (B) *Heat map* da expressão de genes relacionados a resposta imune em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv (expressão relativa aos macrófagos M1 não infectados) e diferenças estatísticas (valores de *P*) na comparação de macrófagos M1 infectados com: rBCG-LTAK63 versus BCG; rBCG-LTAK63 versus *Mtb* H37Rv; BCG versus *Mtb* H37Rv. Diferenças estatísticas foram determinadas por *Student's t* teste ($P < 0,05$).

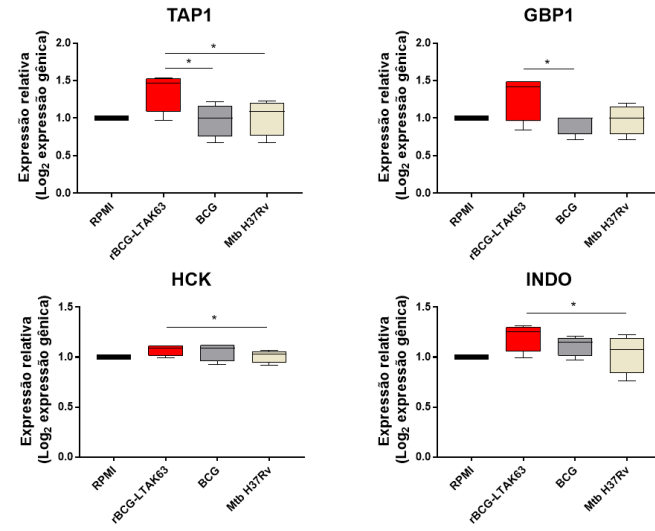
5.3.3 Perfil de genes diferencialmente expressos em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63, BCG e *Mtb* H37Rv

Após 24 h, os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram 1 gene diferencialmente expresso (expressão relativa aos macrófagos M2 não infectados), assim como os infectados com BCG; eles não apresentaram nenhum gene diferencialmente expresso em comum (Figura 23A). Entre todos os genes analisados (Figura 23B), os genes *TAP1* e *GBP1* foram regulados positivamente ($P \leq 0,05$) quando comparamos os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 com os infectados com BCG; e os genes *TAP1*, *HCK* e *INDO* foram regulados positivamente nos macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com *Mtb* H37Rv (Figura 23C). As diferenças entre os grupos BCG e *Mtb* H37Rv foram menores, como evidenciado pelo *heat map*, nenhum gene foi diferencialmente expresso (Figura 23B).

A



C



B

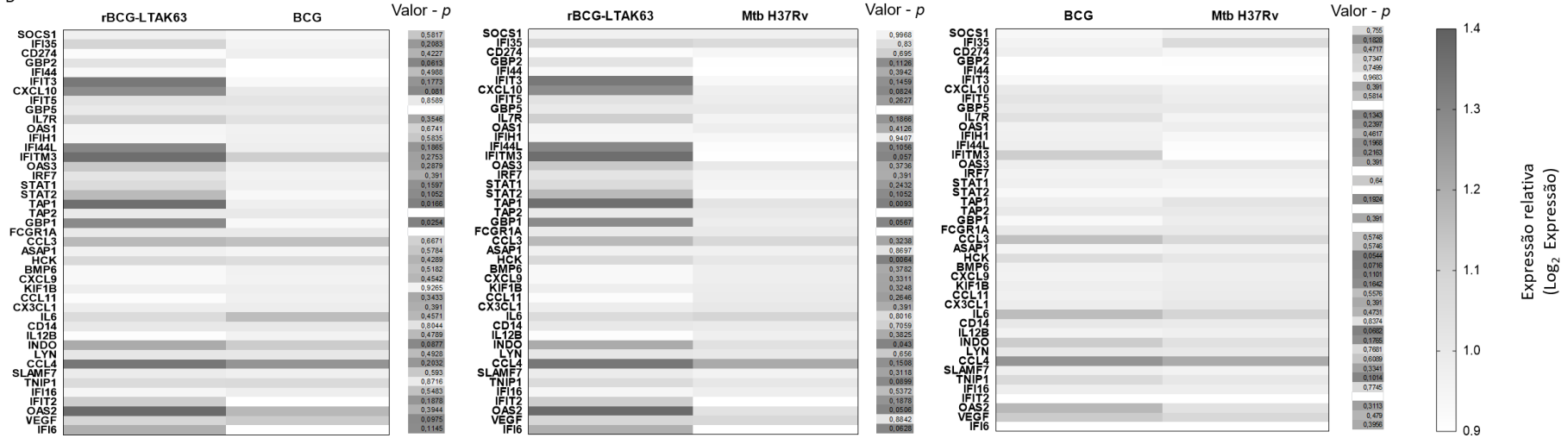
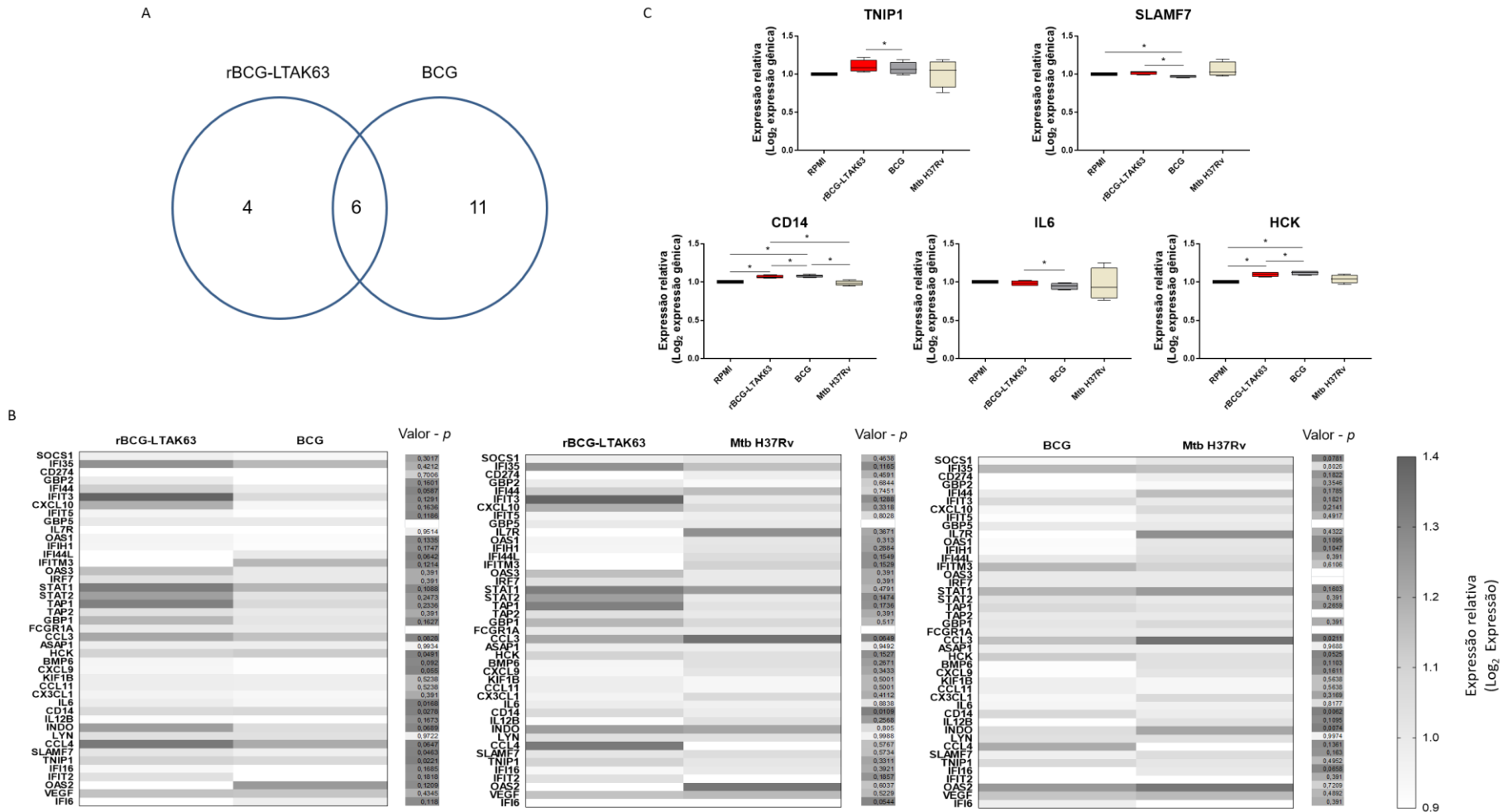


Figura 23. Macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior número de genes diferencialmente expressos relacionados a um perfil inflamatório. Macrófagos M2 de 4 doadores foram infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv por 24 h e o RNA foi isolado para avaliação de expressão gênica por dcRT-MLPA. (A) Diagrama de *Venn* dos genes diferencialmente expressos em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG (expressão relativa aos macrófagos M2 não infectados). (B) *Heat map* da expressão de genes relacionados a resposta imune em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv (expressão relativa aos macrófagos M2 não infectados) e diferenças estatísticas (valores de *P*) na comparação de macrófagos M2 infectados com: rBCG-LTAK63 *versus* BCG; rBCG-LTAK63 *versus* *Mtb* H37Rv; BCG *versus* *Mtb* H37Rv. (C) Genes diferencialmente expressos em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com BCG ou *Mtb* H37Rv. Diferenças estatísticas foram determinadas por *Student's t* teste ($P < 0,05$).

Após 48 h, os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram 10 genes diferencialmente expressos (expressão relativa aos macrófagos M2 não infectados), enquanto os infectados com BCG apresentaram 17 genes diferencialmente expressos; sendo que 6 desses genes foram em comum (Figura 24A). Entre todos os genes analisados (Figura 24 B), os genes *TNIP1*, *SLAMF7*, *CD14*, *IL6* e *HCK* foram regulados positivamente ($P \leq 0,05$) quando comparamos os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 com os infectados com BCG; e o gene *CD14* foi regulado positivamente quando comparamos os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 com os infectados com *Mtb* H37Rv (Figura 24C). O gene *CD14* foi regulado positivamente e os genes *CCL3*, e *INDO* foram regulados negativamente quando comparamos os macrófagos M2 infectados com BCG com os infectados com *Mtb* H37Rv (Figura 24B).

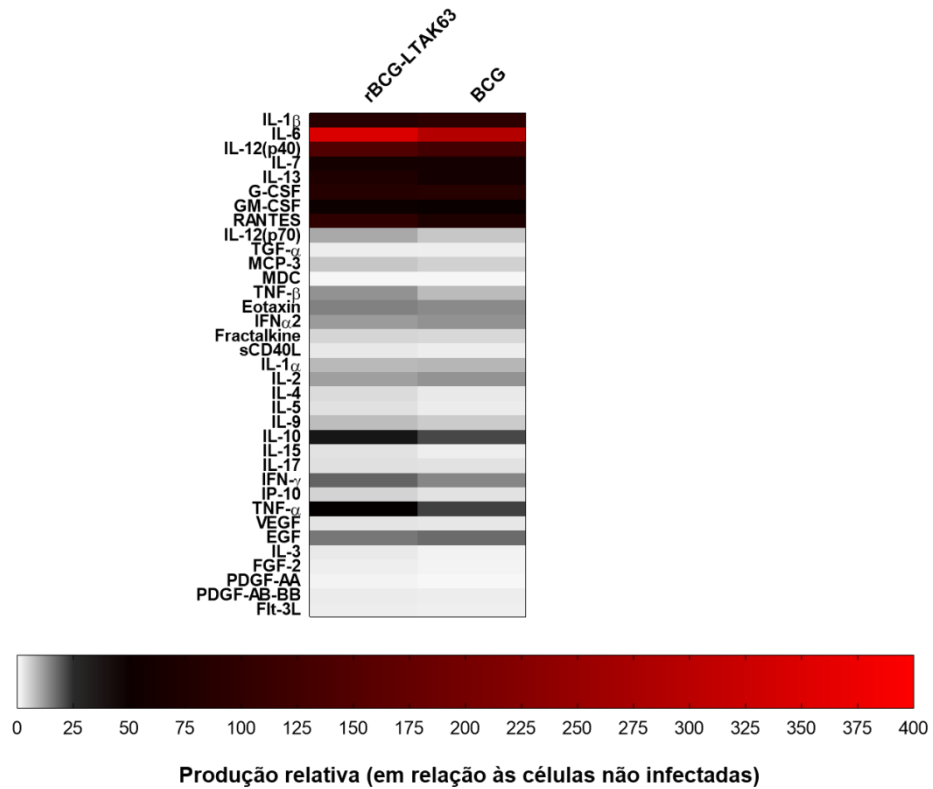


por dcRT-MLPA. (A) Diagrama de *Venn* dos genes diferencialmente expressos em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG (expressão relativa aos macrófagos M2 não infectados). (B) *Heat map* da expressão de genes relacionados a resposta imune em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63, BCG ou *Mtb* H37Rv (expressão relativa aos macrófagos M2 não infectados) e diferenças estatísticas (valores de *P*) na comparação de macrófagos M2 infectados com: rBCG-LTAK63 *versus* BCG; rBCG-LTAK63 *versus* *Mtb* H37Rv; BCG *versus* *Mtb* H37Rv. (C) Genes diferencialmente expressos em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com BCG ou *Mtb* H37Rv. Diferenças estatísticas foram determinadas por *Student's t* teste ($P < 0,05$).

5.3.4 Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias

Avaliamos a produção de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG após 48 h ou macrófagos não infectados como controle. Os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG apresentaram elevados níveis de produção de citocina quando comparados com os não infectados (Figura 25A). A produção de IL-12(p70), TNF- β e IL-15 foi estatisticamente maior nos macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com BCG; a produção de IL-17A, IFNA2, TNF- α , Fractalkina, IL-10, VEGF e Fit3L foi estatisticamente maior no grupo rBCG-LTAK63 quando comparado com os não infectados (Figura 25B). As demais citocinas avaliadas não apresentaram diferenças estatísticas.

A



B

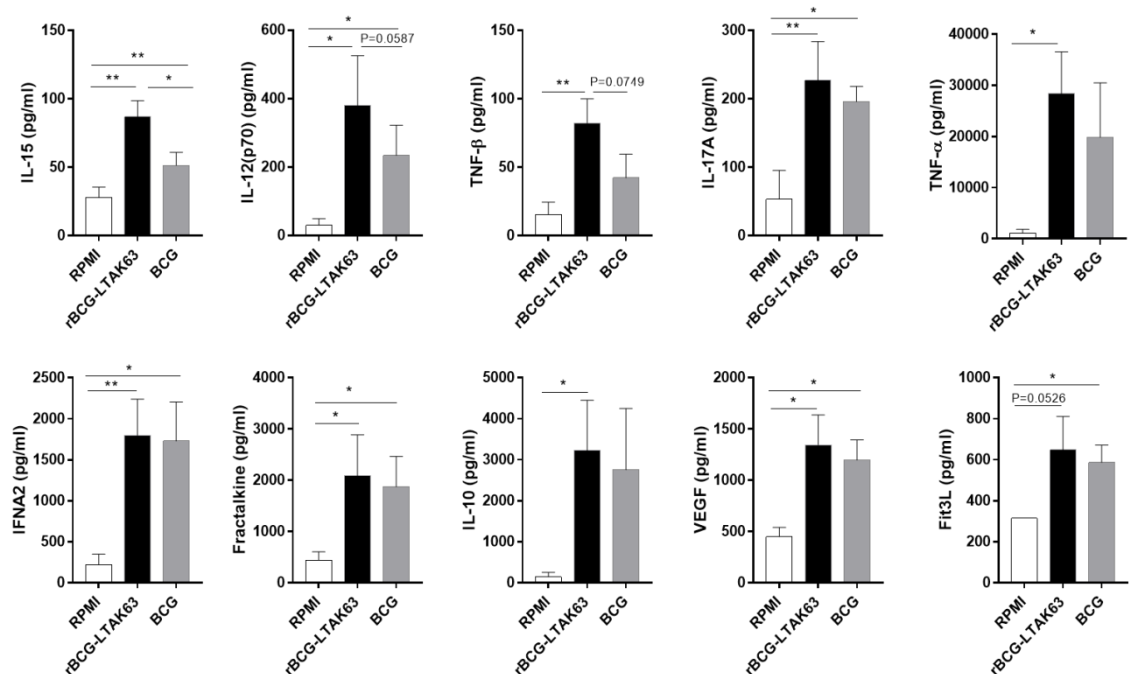


Figura 25. Macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias. Macrófagos M1 provenientes de 4 doadores foram infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG por 48h e o sobrenadante foi coletado para avaliação da produção de citocinas por Luminex. (A) *Heat map* da produção de citocinas em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG (expressão relativa aos macrófagos M1 não infectados). (B) Diferenças estatísticas na produção de

citocinas em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG. As diferenças estatísticas foram determinadas por RM – ANOVA ($P < 0.05$).

5.3.5 Macrófagos M2 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias

Nós avaliamos a produção de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG após 48 h ou macrófagos não infectados como controle. Os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG apresentaram elevados níveis de produção de citocina quando comparados com os não infectados (Figura 26A). A produção de MCP-3 e EGF foi significativamente elevada nos macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparado com os infectados com BCG; a produção de IL-6, IFN- γ , IL-9, IL-7, Fractalkine, TGF- α e IL-12(p70) foi significativamente maior no grupo rBCG-LTAK63 quando comparado com os não infectados (Figura 26B). Apesar das outras citocinas serem produzidas em níveis elevados, não apresentaram diferenças estatísticas.

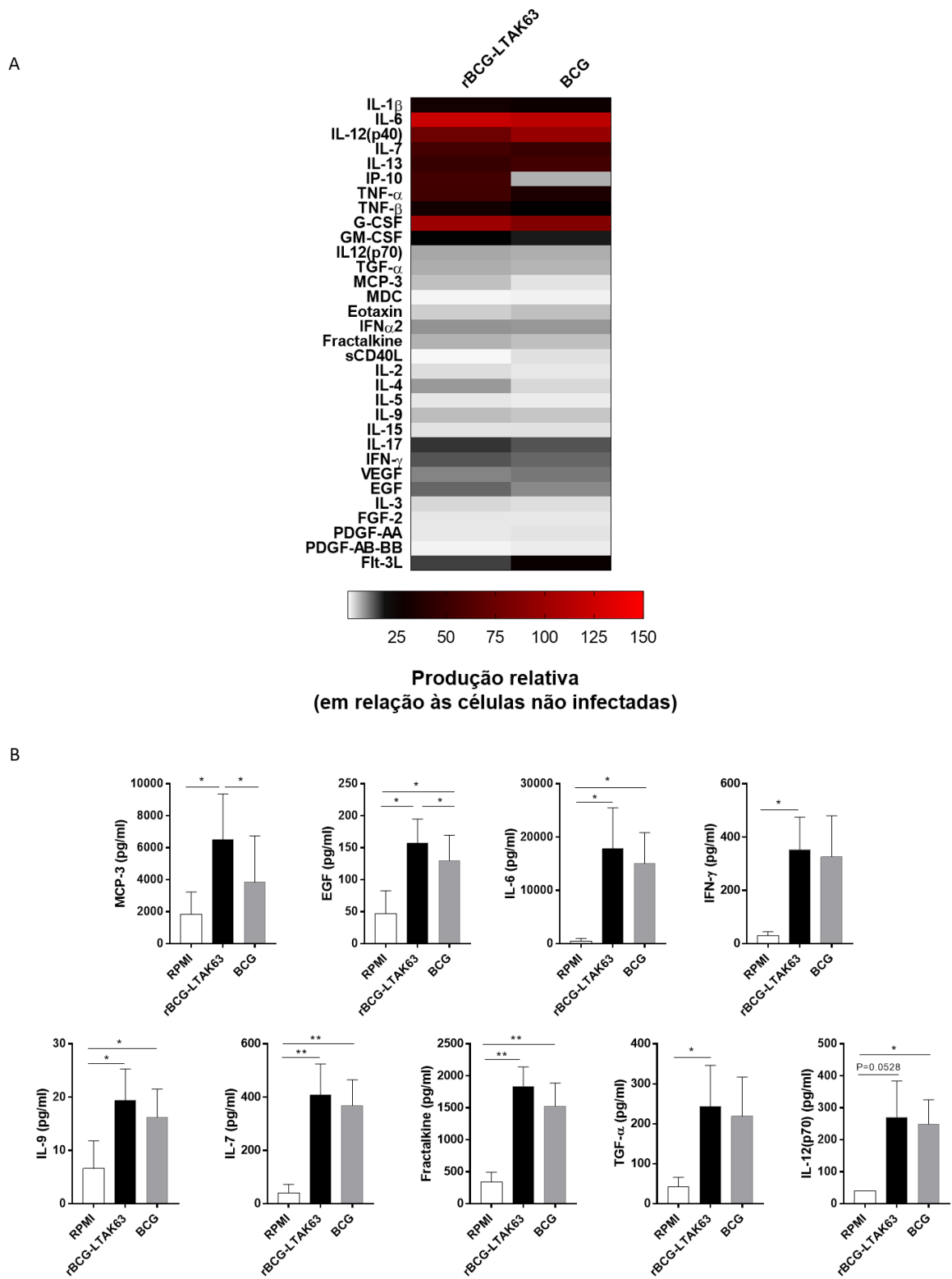


Figura 26. Macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentam maior produção de citocinas inflamatórias. Macrófagos M2 provenientes de 4 diferentes doadores foram infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG por 48 h e o sobrenadante foi coletado para avaliação da produção de citocinas por Luminex. (A) *Heat map* da produção de citocinas em macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG (expressão relativa aos macrófagos M2 não-infectados). (B) Produção de citocinas em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 ou BCG. Diferenças estatísticas foram determinadas por RM – ANOVA ($P < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 *rBCG-LTAK63* induz recrutamento de células para o peritônio, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas inflamatórias

A resposta imune inata inicia-se com o recrutamento de células, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas. Sabe-se a importância do papel de células fagocíticas no início da resposta para TB, sendo o *Mtb* um microrganismo intracelular (ERNST, 2012). Assim, avaliar o potencial de recrutamento de células induzido pelo rBCG-LTAK63 é importante na busca pelos mecanismos imunes iniciais que poderiam levar a proteção contra TB. O modelo de imunização intraperitoneal, que vem sendo usado por outros grupos de pesquisa (DESEL et al., 2011), nos permite avaliar o potencial de recrutamento de células e resposta imune inicial induzido pelo rBCG-LTAK63 uma vez que a população de células predominante no lavado peritoneal é composta predominantemente por macrófagos e células imigrantes. Observamos que rBCG-LTAK63 e BCG induziram aumento de células totais e neutrófilos após 24 h, que permaneceram aumentados até 7 dias após inoculação intraperitoneal. É possível notar um infiltrado maior de macrófagos aos 7 dias após inoculação intraperitoneal com rBCG-LTAK63 ou BCG. O número de linfócitos foi estatisticamente maior no peritônio dos animais inoculados com rBCG-LTAK63 quando comparamos com o grupo controle e BCG aos 7 dias.

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas inflamatórias são importantes indicadores de ativação das células. Sabe-se que macrófagos são ativados por IFN- γ e TNF- α , matando o *Mtb* através do *burst* oxidativo (produção de NO e H₂O₂) (CHAN et al., 1992). Assim, é possível ver a importância da produção significativa de NO após 24 horas no grupo inoculado com rBCG-LTAK63, juntamente com a produção de H₂O₂ e citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α no período de 7 dias. Apesar da produção significativa de IFN- γ também ter sido induzida pelo BCG, apenas o rBCG-LTAK63 induziu níveis significativos de TNF- α quando comparado com o grupo Salina. A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas inflamatórias indica ativação da resposta imune, principalmente de macrófagos. O papel do óxido nítrico não está restrito ao processo de *killing* da mycobacteria, mas também em induzir a apoptose da célula hospedeira e restringir o crescimento intracelular do *Mtb* (BODNAR; SERBINA; FLYNN, 2001). O NO pode

também estar diretamente envolvido na diferenciação dos tipos de células Th1, Th2 e Th17 (BOGDAN, 2015). Desse modo, temos indicadores de mecanismos iniciais induzidos pelo rBCG-LTAK63 que podem estar envolvidos posteriormente no controle de uma infecção por *Mtb*. A imunofenotipagem dos linfócitos, células dendríticas e investigação dos mecanismos de ativação de macrófagos serão parâmetros importantes para futuros estudos.

6.2 Perfil Th1/Th17 de resposta imune é induzido no pulmão pela imunização com rBCG-LTAK63

Avaliamos a resposta imune adquirida induzida 90 dias após imunização com rBCG-LTAK63 ou BCG. Os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram aumento de citocinas do tipo Th1 assim como Th17 quando comparados aos imunizados com BCG. Em um estudo anterior, já tínhamos observado a indução de um perfil de resposta do tipo Th1 e Th17 60 dias após imunização (NASCIMENTO et al., 2017). A IL-17 é importante para a defesa antimicrobiana através do recrutamento de neutrófilos e outras funções (GAFFEN, 2008). Há a hipótese de que o aumento da susceptibilidade ao *Mtb* por camundongos knockout de IL-17A é relacionado com um atraso no recrutamento de neutrófilos para o pulmão durante as primeiras semanas de infecção, associado com diminuição de IL-6 e IL-10 e aumento de IL-1 β (FRECHES et al., 2013). Sabe-se que células Th17 e Th1 produzem IL-10, com a função de atenuar suas características inflamatórias. No entanto, sabe-se que as células Th1 são mais importantes que as Th17 na defesa contra microrganismos intracelulares como o *Mtb* (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013). Nós observamos que a imunização com rBCG-LTAK63 induz um perfil de resposta imune Th1 e Th17, com a produção significativa de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-10 quando comparado com o grupo BCG. Será importante em estudos futuros a caracterização do tipo de linfócitos envolvidos nessa resposta, se estão ativados e/ou se são de memória. Muitos estudos mostram a importância das diferentes subpopulações de linfócitos (memória central e residentes) na resposta imune protetora para TB (PERDOMO et al., 2016).

6.3 Cinética da indução da resposta imune e da carga bacilar após o desafio em camundongos BALB/c imunizados e proteção superior induzida em animais C57BL/6

Buscando identificar correlatos de proteção, comparamos a resposta imune após imunização com BCG ou rBCG-LTAK63 em um modelo murino de infecção de TB. O

modelo amplamente utilizado para avaliar a eficácia protetora de um candidato vacinal para TB ainda é a determinação do número de UFC no pulmão de animais imunizados após desafio com uma cepa virulenta de *Mtb*. Em um estudo anterior, verificamos uma proteção superior 30, 60, 90 e 120 dias após desafio induzida pela imunização subcutânea com rBCG-LTAK63 quando comparamos com o BCG. A proteção superior também foi observada utilizando a cepa Beijing, que é uma cepa hipervirulenta de *Mtb* isolada de amostra clínica. Foi observado uma redução significativa de 2,0 logs de UFC no pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63 30 dias após o desafio ao compararmos com os animais imunizados com BCG (NASCIMENTO et al., 2017). Investigamos qual seria o melhor momento para encontrar possíveis correlatos de proteção através da cinética da carga bacilar pulmonar e vimos que no 7° e 15° dia após o desafio, o número de UFC no pulmão dos animais dos diferentes grupos de estudo estava igual. No entanto entre o 15° e o 30° dias a carga bacilar nos animais imunizados com rBCG-LTAK63 diminuiu, enquanto nos demais grupos continuou a aumentar. Assim, percebemos que o perfil de resposta imune induzido nos animais imunizados com rBCG-LTAK63 no período ao redor dos 15 dias de infecção, poderia indicar possíveis moléculas do sistema imune que tenham um papel importante na redução da carga bacilar.

Para reforçar essa hipótese, no 15° dia após o desafio encontramos maiores diferenças na resposta imune induzida pelo rBCG-LTAK63 quando comparamos com o BCG. Nesse período, o candidato vacinal induziu elevada porcentagem de células T CD4+ produtoras de TNF- α e de células T CD4+ multifuncionais produtoras de IL-2 e TNF- α . TNF- α tem um papel primordial no processo de controle da infecção por *Mtb*, agindo sobre uma variedade de células (CAVALCANTI et al., 2012). Um dos papéis importante é a contribuição na formação do granuloma, capaz de controlar a progressão da doença (MOHAN et al., 2001). Alguns estudos têm associado a presença de células multifuncionais com proteção (DE ROSA et al., 2004). Um achado importante é que a carga bacilar é similar entre os grupos no 7° e no 15° dia após o desafio; no entanto, nós podemos observar que a resposta imune é diferente, principalmente quando avaliamos a produção de citocinas no pulmão. É interessante que foi observado uma produção marcante de IL-6 e IL-10 pelas células do pulmão dos animais imunizados com rBCG-LTAK63, enquanto os níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α foram similares ou menores que os dos animais imunizados com BCG. Apesar da maior porcentagem de células T CD4+

produtoras de TNF- α observada nos animais imunizados com rBCG-LTAK63, a produção total de TNF- α foi menor do que nos imunizados com BCG. Provavelmente, o pulmão contem outros tipos celulares que estão envolvidos na produção de TNF- α . Aos 15 dias de infecção, também analisamos a histopatologia dos pulmões e os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram menor redução da área alveolar. É importante ressaltar que a rede de citocinas envolvida na infecção por *Mtb* é complexa e um dos grandes desafios no desenvolvimento de uma vacina para TB é promover o aumento da proteção sem causar efeitos imunopatológicos (COOPER, 2009). As quantidades relativas de IL-10 e IFN- γ produzidas pelas células Th1 podem influenciar no balanço entre o *clearance* e a persistência da infecção por certos patógenos. A produção de IL-10 pelas células Th1 pode agir como um regulador para controlar a patologia associada com uma intensa resposta inflamatória (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013). É reportado que a resposta imune inflamatória exacerbada pode romper macrófagos e granulomas, levando a ativação da TB (COOPER, 2009). Previamente, vimos uma resposta similar por PCR em tempo real aos 30 dias após o desafio. Foi mostrado que o rBCG-LTAK63 modulou a resposta imune após o desafio, com aumento da expressão do gene TGF- β e diminuição da expressão dos genes relacionados à resposta Th1 e Th17 (NASCIMENTO et al., 2017).

É importante verificar proteção para TB em diferentes linhagens ou modelos animais, portanto analisamos a proteção em camundongos C57BL/6. O rBCG-LTAK63 manteve proteção superior em camundongos C57BL/6 quando comparado com o BCG, como observado anteriormente em BALB/c. Os animais imunizados com rBCG-LTAK63 tiveram menor perda de peso nos dias após o desafio. Além disso, aos 30 dias após o desafio, também analisamos a histopatologia dos pulmões e os animais imunizados com rBCG-LTAK63 apresentaram menor redução da área alveolar.

6.4 Expressão de genes relacionados à resposta imune no sangue

Embora os biomarcadores possam ser estudados em qualquer tecido ou fluido corporal, o sangue periférico é a fonte amplamente utilizada na prática clínica. Genes, transcritos, proteínas, lipídios e metabólitos podem ser medidos no sangue para estudos de biomarcadores (DAVIES et al., 2005). Neste estudo, avaliamos a expressão de alguns genes relacionados à resposta imune no PBMC e no sangue total tanto em animais apenas imunizados como em animais desafiados. O PBMC apresentou um fator

limitante que foi a quantidade de RNA extraída, sendo possível a análise por qRT--PCR de poucos genes. O sangue total permitiu a obtenção de uma quantidade maior de RNA e assim a análise de uma quantidade maior de genes.

Nos últimos anos tem-se buscado no sangue de humanos, principalmente de regiões endêmicas de TB, possíveis marcadores de infecção ativa ou latente e até de proteção (DEMISSIE et al., 2006; MARTINEZ, V. et al., 2007). É importante ressaltar que o sítio da infecção do *Mtb* é o pulmão e, por isso, a maioria dos estudos que utilizam um modelo animal investigam os mecanismos imunológicos que ocorrem nesse órgão.

Como foi citado neste estudo, o PBMC de animais apenas imunizados (sem ser estimulado), não mostrou diferenças significativas na expressão de genes relacionados à resposta imune, o mesmo ocorreu para os animais imunizados e desafiados. Talvez um desenho experimental utilizando PBMC estimulado com algum antígeno de *Mtb* poderia ter indicado a nós resultados mais promissores. O sangue total permitiu a análise de mais genes, no entanto, os resultados obtidos também não indicaram, entre as citocinas estudadas, alguma que poderia ser importante no sangue como um possível correlato de proteção. Ainda assim, vemos que é uma fonte que não pode ser totalmente descartada e que precisa ser mais explorada. Pois, temos a variação observada na expressão do gene CXCL9 (quimiocina induzida por interferon gama), que é conhecida por ser uma quimiocina quimiotática de células T. O receptor para esta quimiocina, CXCR3, está presente em células T ativadas que são recrutadas para pulmões infectados com *Mtb* (KANG, D., 2011). Os animais imunizados com rBCG-LTAK63 exibiram, 7 dias após o desafio, uma tendência de expressar maiores níveis de CXCL9 no sangue total ao compararmos com os grupos BCG e Salina.

Os genes utilizados nesta análise foram escolhidos devido ao fato de serem mais descritos na literatura como importantes na resposta imune para TB, genes relacionados a uma resposta do tipo Th1. Talvez a utilização de uma técnica que permita uma análise mais global, com um leque maior de genes associados a mecanismos e vias do sistema imune, possa ser capaz de oferecer um perfil de moléculas diferencialmente expressas no sangue e/ou pulmão que correlacione melhor com a proteção.

6.5 rBCG-LTAK63 induz um perfil inflamatório em macrófagos M1 e M2

Para investigar os mecanismos ou vias do sistema imune ativadas pelo rBCG-LTAK63, nós investigamos o perfil de expressão gênica induzido em macrófagos humanos primários. Como a expressão de proteínas heterólogas pode ser influenciada por vários fatores das condições *in vivo* e *in vitro* (SORENSEN; MORTENSEN, 2005; BASTOS et al., 2009; DA COSTA et al., 2014), inicialmente demonstramos que a mycobacteria recombinante é estável em infecções em macrófagos humanos primários e comparável com o BCG nativo.

Os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram maior expressão dos genes *IFIT3* e *OAS3*, que fazem parte da via de sinalização do IFN. O papel da via de sinalização do IFN ainda não está totalmente elucidado. Tem sido reportada de forma controversa, por vezes considerada benéfica, às vezes prejudicial ao hospedeiro (SADLER; WILLIAMS, 2008). O gene *IFIT3* faz parte das proteínas induzidas por interferon com repetições tetratricopeptídicas (IFITs), fortemente induzidas pela ativação do IFN tipo I (DIAMOND; FARZAN, 2013). Inicialmente, o papel desse gene é descrito na defesa antiviral, assim como a ativação de vários componentes da via de sinalização do IFN (SADLER; WILLIAMS, 2008). No entanto, também foi descrito ser positivamente regulado em infecções bacterianas, como as micobactérias (MACMICKING, 2012; WU et al., 2012; BOXX; CHENG, 2016; KOVARIK et al., 2016). A expressão do gene da família IFIT depende do reconhecimento de padrões e da via JAK-STAT. Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são moléculas associadas a diferentes grupos de patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e outros. Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reconhecem diferentes PAMPs durante a infecção por patógenos e ativam moléculas de sinalização. Como resultado, a ativação de receptores conhecidos como *Toll-like* (TLRs) e receptores *RIG-like* (RLRs) induz a expressão gênica da família IFIT (DIAMOND; FARZAN, 2013). O gene *IFIT3* foi descrito como uma molécula protetora contra a infecção viral (WU et al., 2012). É reportado que, após infecção viral ou bacteriana, a ativação da sinalização do IFN induz a produção da família da 2'-5'-oligoadenilato sintetase (OAS) (LI, Y. et al., 2016), que inclui o gene *OAS3*, que foi regulado positivamente pela infecção com rBCG-LTAK63. O papel da família OAS nas infecções bacterianas também não está bem definido. No entanto, tem sido relatado que induz a sobrevivência intracelular de micobactérias, secreção de IFN e autofagia

(TOLEDO PINTO et al., 2018). Outro gene regulado positivamente pela infecção por rBCG-LTAK63 é o gene codificador da monocina induzida por IFN, o *CXCL9*, que é produzida em resposta ao IFN- γ e induz inflamação com recrutamento de linfócitos ativados (LOETSCHER et al., 1996; HAN et al., 2017). O *CXCL9* é uma molécula pleiotrópica envolvida nos mecanismos da resposta imune inata e adaptativa (SMIT et al., 2003; KANG, D. D. et al., 2011; DING et al., 2016). Após 48 h de infecção, não foram observadas diferenças quando os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 foram comparados com os infectados com BCG. No entanto, é interessante notar que as diferenças observadas entre as infecções por rBCG-LTAK63 e *Mtb* H37Rv foram menores que as diferenças entre o BCG e o *Mtb* H37Rv. Os macrófagos M1 infectados com BCG apresentaram vários genes regulados negativamente quando comparados com os infectados com *Mtb* H37Rv; mas este mesmo padrão não foi observado quando os infectados com rBCG-LTAK63 foram comparados com os infectados com *Mtb* H37Rv.

O perfil de expressão gênica observado correlacionou-se bem com a produção de citocinas. Os altos níveis de IL-12(p70), TNF- β e IL-15 induzidos em macrófagos M1 pelo rBCG-LTAK63 quando comparado com BCG, também indicam um perfil de resposta imune celular inflamatória e ativada. A IL-12(p70) é uma citocina pró-inflamatória, sendo descrita como tendo um papel importante no controle da infecção micobacteriana (MENDEZ-SAMPERIO, 2010; COOPER; MAYER-BARBER; SHER, 2011; VIGNALI; KUCHROO, 2012). O TNF- β e o TNF- α são homotrímeros e possuem estrutura e funções semelhantes (CROFT, 2009; PARAMESWARAN; PATIAL, 2010). É relatado que os macrófagos infectados com micobactérias secretam IL-15 (MAEURER et al., 2000). A IL-15 é produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas e atua no recrutamento de linfócitos T, estimula as células T CD4 (RUCKERT et al., 2009) e subpopulações específicas de linfócitos T CD8 de memória (MUELLER et al., 2005; STONIER et al., 2008).

Nos macrófagos M2, que possuem uma característica imunomoduladora, genes relacionados a um perfil inflamatório também foram regulados positivamente pelo rBCG-LTAK63 quando comparado com o BCG. Os genes *TAP1* e *GBP1*, que fazem parte da via de sinalização do IFN, foram regulados positivamente. *TAP1* - transportador associado ao processamento de antígeno 1 - é importante para a função do MHC-I e tem papel fundamental na imunidade adaptativa (LANKAT-BUTTGEREIT; TAMPE, 2002; EGGENSPERGER; TAMPE, 2015). *GBP1* - precursor da proteína 1 de

ligação ao guanilato - faz parte da família de GTPase induzida por IFN. Esta proteína está associada à proteção em infecções bacterianas, defesa do hospedeiro e morte de patógenos intracelulares, incluindo micobactérias (KIM et al., 2011; LEAVY, 2011; LI, P. et al., 2017; QIU et al., 2018). Os níveis de expressão dos genes *TNIP1*, *SLAMF7* e *IL-6* também foram maiores em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparados ao BCG. O *TNIP1* é um dos principais reguladores da via de sinalização do NF- κ B e está implicado na inflamação celular (CHEN et al., 2015). Sugere-se um amplo repertório de funções para TNIP1, incluindo a modulação da ativação celular e o aumento dos níveis de células T CD4 (GUREVICH et al., 2011). O SLAMF7 é um receptor presente em células imunes como as células NK e está relacionado à ativação celular (COMTE et al., 2017; MALAER; MATHEW, 2017). A IL-6 é uma citocina pleotrópica, secretada por vários tipos de células, desempenhando um papel na inflamação, resposta a infecções e reparo de tecidos celulares (MARTINEZ, A. N.; MEHRA; KAUSHAL, 2013). As citocinas MCP-3 e EGF foram produzidas em níveis significativos em macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 quando comparados àqueles infectados com BCG. A quimiocina MCP-3 é estrutural e funcionalmente semelhante à MCP-1 e é um potente quimioatrativo de monócitos para células T e células NK (JIA et al., 2008). O fator de crescimento epidérmico (EGF) promove proliferação, diferenciação, sobrevivência e reparo celular em vários tipos de células (LU et al., 2014). Portanto, o perfil inflamatório dos macrófagos M1 e um perfil inflamatório e reparador nos macrófagos M2 foi regulado positivamente pelo rBCG-LTAK63 quando comparado ao BCG.

Neste estudo comparativo, utilizamos três diferentes cepas de micobactérias: o *Mtb* H37Rv, uma cepa virulenta; o BCG, uma cepa atenuada e a única vacina usada atualmente para TB; e o rBCG-LTAK63, uma cepa recombinante de BCG proposta como um candidato vacinal que induz proteção superior para TB. As diferentes cepas de micobactéria induziram um número relativamente elevado de genes diferencialmente expressos em macrófagos humanos M1 e M2. Embora não haja muitas diferenças no perfil de expressão gênica exibido pelas diferentes cepas, isso não foi surpresa. Um estudo recente relatou uma resposta imune similar desencadeada em macrófagos pela infecção por cepas de micobactérias virulentas ou atenuada (BLISCHAK et al., 2015). Isso também mostra a complexidade para entender os mecanismos imunológicos relacionados à patogenicidade ou proteção induzidos por micobactérias. Nossos dados

indicam um importante perfil de resposta imune induzido em macrófagos humanos pelo rBCG-LTAK63 que pode ser correlacionado com uma resposta imune protetora para TB (Figura 27). Mais estudos serão importantes para confirmar essa hipótese.

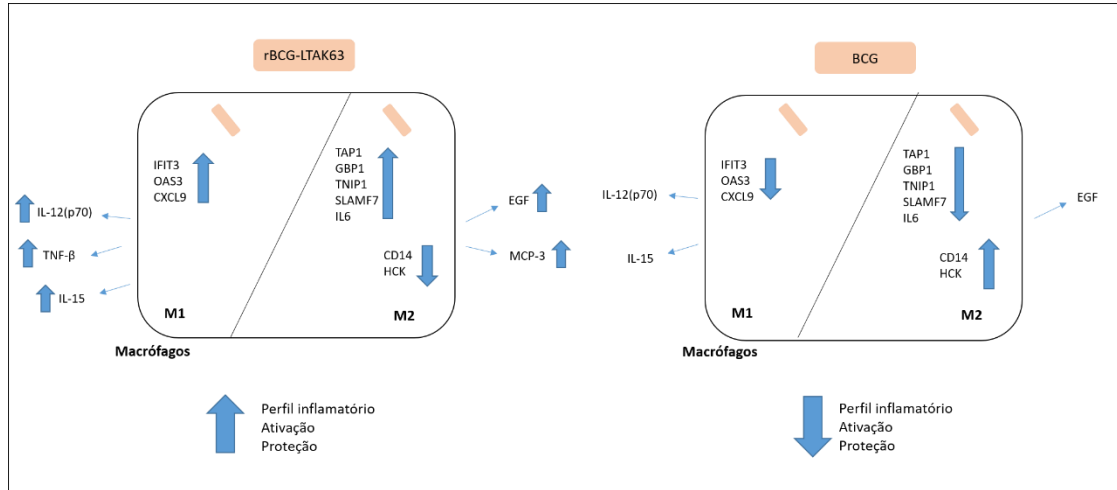


Figura 27. Esquema para ilustrar as diferentes respostas imunes induzidas pelo rBCG-LTAK63 e BCG em macrófagos e a hipótese gerada para a correlação com proteção. Os macrófagos M1 e M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram um perfil de resposta imune relacionado com maior inflamação, ativação e proteção do que os infectados com BCG. Os macrófagos M1 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram maior expressão dos genes *IFIT3*, *OAS3* (genes que fazem parte da via de sinalização de IFN) e *CXCL9* (envolvido na atração de linfócitos ativadas) que os infectados com BCG. O rBCG-LTAK63 induziu maior produção das citocinas inflamatórias IL-12(p70), TNF- β e IL-15. Os macrófagos M2 infectados com rBCG-LTAK63 apresentaram maior expressão dos genes *TAP1*, *GBP1* (genes que fazem parte da via de sinalização de IFN), *TNIP1* (inflamação), *SLAMF7* (ativação celular), *IL6* (inflamação e reparação tecidual) e menor expressão dos genes *CD14* e *HCK* do que os infectados por BCG. Os macrófagos M2 infectados com BCG, por sua vez, apresentaram maior expressão dos genes *CD14* e *HCK*. O rBCG-LTAK63 induziu maior produção das citocinas inflamatórias e de reparação tecidual MCP-3 e EGF.

7 CONCLUSÕES

Este estudo foi desenvolvido a partir da hipótese de que ao investigar a resposta imune induzida pelo rBCG-LTAK63, estaríamos não só aprofundando a caracterização da imunidade induzida por ele – ainda não elucidada – mas também poderíamos encontrar indícios de correlatos de proteção para TB. Os resultados mostram que o rBCG-LTAK63 tem o potencial de induzir uma eficiente resposta imune inata *in vivo*, pois assim como o BCG induziu recrutamento de células como neutrófilos e macrófagos no peritônio. O rBCG-LTAK63 induziu maior recrutamento de linfócitos no peritônio que o BCG, elevou a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio e de TNF- α . Esses dados indicam o potencial de indução de uma maior ativação da resposta imune inata pelo rBCG-LTAK63 em relação ao BCG. O rBCG-LTAK63 também induziu nos pulmões dos animais um perfil de resposta imune adaptativa do tipo Th1/Th17 maior quando comparado com o BCG. Após o desafio, o rBCG-LTAK63 induziu maior porcentagem de células T CD4+ produtoras de TNF- α , no entanto foi observado uma menor produção total de citocinas do tipo Th1 e uma tendência de maior produção de IL-10 quando comparado com o BCG. Essa resposta imune pode ser associada com a menor injúria pulmonar verificada nos animais imunizados com o rBCG-LTAK63 e com a proteção superior observada em relação ao BCG. Os resultados de resposta imune *in vitro*, revelaram a regulação positiva de um perfil inflamatório dos macrófagos M1 e de um perfil inflamatório e de reparo celular nos macrófagos M2 pelo rBCG-LTAK63 quando comparado ao BCG. Importantes moléculas da resposta imune relacionados com a via de sinalização de IFN, ativação e reparo celular, resposta imune inata adaptativa foram correlacionados com uma resposta imune protetora para TB. O estudo deste candidato vacinal tem sido promissor, utilizando-o como ferramenta para melhor entender os mecanismos de proteção de uma vacina para TB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

AAGAARD, C.; HOANG, T.; DIETRICH, J.; CARDONA, P. J.; IZZO, A.; DOLGANOV, G.; SCHOOLNIK, G. K.; CASSIDY, J. P.; BILLESKOV, R.; ANDERSEN, P. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. **Nat Med**, v. 17, n. 2, p. 189-194, 2011.

ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 8, p. 1296-1299, 2010.

AMARAL, E. P.; RIBEIRO, S. C.; LANES, V. R.; ALMEIDA, F. M.; DE ANDRADE, M. R.; BOMFIM, C. C.; SALLES, E. M.; BORTOLUCI, K. R.; COUTINHO-SILVA, R.; HIRATA, M. H.; ALVAREZ, J. M.; LASUNSKAIA, E. B.; D'IMPERIO-LIMA, M. R. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 7, p. e1004188, 2014.

ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 8, p. 656-662, 2005.

ANDERSEN, P.; KAUFMANN, S. H. Novel vaccination strategies against tuberculosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 6, p., 2014.

ARBUES, A.; AGUILO, J. I.; GONZALO-ASENSIO, J.; MARINOVA, D.; URANGA, S.; PUENTES, E.; FERNANDEZ, C.; PARRA, A.; CARDONA, P. J.; VILAPLANA, C.; AUSINA, V.; WILLIAMS, A.; CLARK, S.; MALAGA, W.; GUILHOT, C.; GICQUEL, B.; MARTIN, C. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. **Vaccine**, v. 31, n. 42, p. 4867-4873, 2013.

ATMAKURI, K.; PENN-NICHOLSON, A.; TANNER, R.; DOCKRELL, H. M. Meeting report: 5th Global Forum on TB Vaccines, 20-23 February 2018, New Delhi India. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 113, n., p. 55-64, 2018.

BARRETO, M. L.; CUNHA, S. S.; PEREIRA, S. M.; GENSER, B.; HIJJAR, M. A.; YURY ICHIHARA, M.; DE BRITO, S. C.; DOURADO, I.; CRUZ, A.; SANTA'ANA, C.; RODRIGUES, L. C. Neonatal BCG protection against tuberculosis lasts for 20 years in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, n. 10, p. 1171-1173, 2005.

BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 3 Suppl, p. S45-54, 2006.

¹ De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023 2002.

BASTOS, R. G.; BORSUK, S.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495-6503, 2009.

BEHAR, S. M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 668-674, 2010.

BEHR, M. A. BCG--different strains, different vaccines? **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 86-92, 2002.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). **Annu Rev Immunol**, v. 27, n., p. 551-589, 2009.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. **J Immunol**, v. 181, n. 6, p. 3733-3739, 2008.

BLISCHAK, J. D.; TAILLEUX, L.; MITRANO, A.; BARREIRO, L. B.; GILAD, Y. *Mycobacterial* infection induces a specific human innate immune response. **Sci Rep**, v. 5, n., p. 16882, 2015.

BODNAR, K. A.; SERBINA, N. V.; FLYNN, J. L. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. **Infect Immun**, v. 69, n. 2, p. 800-809, 2001.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends Immunol**, v. 36, n. 3, p. 161-178, 2015.

BOXX, G. M.; CHENG, G. The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 6, p. 760-769, 2016.

CALMETTE, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. **Proc R Soc Med**, v. 24, n. 11, p. 1481-1490, 1931.

CAVALCANTI, Y. V.; BRELAZ, M. C.; NEVES, J. K.; FERRAZ, J. C.; PEREIRA, V. R. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. **Pulm Med**, v. 2012, n., p. 745483, 2012.

CHACKERIAN, A. A.; PERERA, T. V.; BEHAR, S. M. Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v. 69, n. 4, p. 2666-2674, 2001.

CHACKERIAN, A. A.; ALT, J. M.; PERERA, T. V.; DASCHER, C. C.; BEHAR, S. M. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4501-4509, 2002.

CHAN, J.; XING, Y.; MAGLIOZZO, R. S.; BLOOM, B. R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J Exp Med**, v. 175, n. 4, p. 1111-1122, 1992.

CHEN, Y.; YAN, H.; SONG, Z.; CHEN, F.; WANG, H.; NIU, J.; SHI, X.; ZHANG, D.; ZHANG, N.; ZHAI, Z.; ZHONG, B.; CHENG, L.; QIAN, T.; HAO, F. Downregulation of TNIP1 Expression Leads to Increased Proliferation of Human Keratinocytes and Severer Psoriasis-Like Conditions in an Imiquimod-Induced Mouse Model of Dermatitis. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0127957, 2015.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

COMTE, D.; KARAMPETSOU, M. P.; YOSHIDA, N.; KIS-TOTH, K.; KYTTARIS, V. C.; TSOKOS, G. C. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 Engagement Restores Defective Effector CD8⁺ T Cell Function in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheumatol**, v. 69, n. 5, p. 1035-1044, 2017.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n., p. 393-422, 2009.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 252-260, 2011.

CROFT, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 4, p. 271-285, 2009.

DA COSTA, A. C.; COSTA-JUNIOR ADE, O.; DE OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, S. V.; ROSA, J. D.; RESENDE, D. P.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. A new recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112848, 2014.

DARRAH, P. A.; PATEL, D. T.; DE LUCA, P. M.; LINDSAY, R. W.; DAVEY, D. F.; FLYNN, B. J.; HOFF, S. T.; ANDERSEN, P.; REED, S. G.; MORRIS, S. L.; ROEDERER, M.; SEDER, R. A. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. **Nat Med**, v. 13, n. 7, p. 843-850, 2007.

DAVIES, D. H.; LIANG, X.; HERNANDEZ, J. E.; RANDALL, A.; HIRST, S.; MU, Y.; ROMERO, K. M.; NGUYEN, T. T.; KALANTARI-DEHAGHI, M.; CROTTY, S.; BALDI, P.; VILLARREAL, L. P.; FELGNER, P. L. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 3, p. 547-552, 2005.

DE ROSA, S. C.; LU, F. X.; YU, J.; PERFETTO, S. P.; FALLOON, J.; MOSER, S.; EVANS, T. G.; KOUP, R.; MILLER, C. J.; ROEDERER, M. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. **J Immunol**, v. 173, n. 9, p. 5372-5380, 2004.

DEMISSIE, A.; LEYTEN, E. M.; ABEBE, M.; WASSIE, L.; ASEFFA, A.; ABATE, G.; FLETCHER, H.; OWIAFE, P.; HILL, P. C.; BROOKES, R.; ROOK, G.; ZUMLA, A.; AREND, S. M.; KLEIN, M.; OTTENHOFF, T. H.; ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute

and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 2, p. 179-186, 2006.

DESEL, C.; DORHOI, A.; BANDERMANN, S.; GRODE, L.; EISELE, B.; KAUFMANN, S. H. Recombinant BCG DeltaureC hly+ induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses. **J Infect Dis**, v. 204, n. 10, p. 1573-1584, 2011.

DHEDA, K.; SCHWANDER, S. K.; ZHU, B.; VAN ZYL-SMIT, R. N.; ZHANG, Y. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. **Respirology**, v. 15, n. 3, p. 433-450, 2010.

DIAMOND, M. S.; FARZAN, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 1, p. 46-57, 2013.

DIETRICH, J.; AAGAARD, C.; LEAH, R.; OLSEN, A. W.; STRYHN, A.; DOHERTY, T. M.; ANDERSEN, P. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. **J Immunol**, v. 174, n. 10, p. 6332-6339, 2005.

DING, Q.; LU, P.; XIA, Y.; DING, S.; FAN, Y.; LI, X.; HAN, P.; LIU, J.; TIAN, D.; LIU, M. CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. **Cancer Med**, v. 5, n. 11, p. 3246-3259, 2016.

DU, X.; TABETA, K.; HOEBE, K.; LIU, H.; MANN, N.; MUDD, S.; CROZAT, K.; SOVATH, S.; GONG, X.; BEUTLER, B. Velvet, a dominant Egfr mutation that causes wavy hair and defective eyelid development in mice. **Genetics**, v. 166, n. 1, p. 331-340, 2004.

DYE, C. Making wider use of the world's most widely used vaccine: Bacille Calmette-Guerin revaccination reconsidered. **J R Soc Interface**, v. 10, n. 87, p. 20130365, 2013.

EGGENSPERGER, S.; TAMPE, R. The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity. **Biol Chem**, v. 396, n. 9-10, p. 1059-1072, 2015.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 8, p. 581-591, 2012.

FERRERO, E.; BISWAS, P.; VETTORETTO, K.; FERRARINI, M.; UGUCCIONI, M.; PIALI, L.; LEONE, B. E.; MOSER, B.; RUGARLI, C.; PARDI, R. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. **Immunology**, v. 108, n. 3, p. 365-374, 2003.

FINE, P. E.; VYNNYCKY, E. The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g. BCG) vaccines. **Vaccine**, v. 16, n. 20, p. 1923-1928, 1998.

FLEISCHMANN, R. D.; ALLAND, D.; EISEN, J. A.; CARPENTER, L.; WHITE, O.; PETERSON, J.; DEBOY, R.; DODSON, R.; GWINN, M.; HAFT, D.; HICKEY, E.;

KOLONAY, J. F.; NELSON, W. C.; UMayAM, L. A.; ERMOLAEVA, M.; SALZBERG, S. L.; DELCHER, A.; UTTERBACK, T.; WEIDMAN, J.; KHOURI, H.; GILL, J.; MIKULA, A.; BISHAI, W.; JACOBS JR, W. R., JR.; VENTER, J. C.; FRASER, C. M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. **J Bacteriol**, v. 184, n. 19, p. 5479-5490, 2002.

FLETCHER, H. A. Correlates of immune protection from tuberculosis. **Curr Mol Med**, v. 7, n. 3, p. 319-325, 2007.

FLETCHER, H. A.; HAWKRIDGE, T.; MCSHANE, H. A New Vaccine for Tuberculosis: The Challenges of Development and Deployment. **J Bioeth Inq**, v. 6, n. 2, p. 219-228, 2009.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 19, n., p. 93-129, 2001a.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Tuberculosis: latency and reactivation. **Infect Immun**, v. 69, n. 7, p. 4195-4201, 2001b.

FRECHES, D.; KORF, H.; DENIS, O.; HAVAUX, X.; HUYGEN, K.; ROMANO, M. Mice genetically inactivated in interleukin-17A receptor are defective in long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunology**, v. 140, n. 2, p. 220-231, 2013.

FULLER, C. L.; FLYNN, J. L.; REINHART, T. A. In situ study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v. 71, n. 12, p. 7023-7034, 2003.

GAFFEN, S. L. An overview of IL-17 function and signaling. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 402-407, 2008.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 514-532, 2012.

GIULIANI, M. M.; DEL GIUDICE, G.; GIANNELLI, V.; DOUGAN, G.; DOUCE, G.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. **J Exp Med**, v. 187, n. 7, p. 1123-1132, 1998.

GLASS, C. K.; NATOLI, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. **Nat Immunol**, v. 17, n. 1, p. 26-33, 2016.

GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go? **Front Microbiol**, v. 4, n., p. 208, 2013.

GRODE, L.; SEILER, P.; BAUMANN, S.; HESS, J.; BRINKMANN, V.; NASSER EDDINE, A.; MANN, P.; GOOSMANN, C.; BANDERMANN, S.; SMITH, D.; BANCROFT, G. J.; REYRAT, J. M.; VAN SOOLINGEN, D.; RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant

Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. **J Clin Invest**, v. 115, n. 9, p. 2472-2479, 2005.

GUREVICH, I.; ZHANG, C.; FRANCIS, N.; ANESKIEVICH, B. J. TNIP1, a retinoic acid receptor corepressor and A20-binding inhibitor of NF-kappaB, distributes to both nuclear and cytoplasmic locations. **J Histochem Cytochem**, v. 59, n. 12, p. 1101-1112, 2011.

HAKS, M. C.; GOEMAN, J. J.; MAGIS-ESCURRA, C.; OTTENHOFF, T. H. Focused human gene expression profiling using dual-color reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification. **Vaccine**, v. 33, n. 40, p. 5282-5288, 2015.

HAN, J. H.; SUH, C. H.; JUNG, J. Y.; AHN, M. H.; HAN, M. H.; KWON, J. E.; YIM, H.; KIM, H. A. Elevated circulating levels of the interferon-gamma-induced chemokines are associated with disease activity and cutaneous manifestations in adult-onset Still's disease. **Sci Rep**, v. 7, n., p. 46652, 2017.

HARARI, A.; ROZOT, V.; ENDERS, F. B.; PERREAU, M.; STALDER, J. M.; NICOD, L. P.; CAVASSINI, M.; CALANDRA, T.; BLANCHET, C. L.; JATON, K.; FAOUZI, M.; DAY, C. L.; HANEKOM, W. A.; BART, P. A.; PANTALEO, G. Dominant TNF-alpha+ *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. **Nat Med**, v. 17, n. 3, p. 372-376, 2011.

HARRIS, J.; KEANE, J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. **Clin Exp Immunol**, v. 161, n. 1, p. 1-9, 2010.

HEINZEL, A. S.; GROTZKE, J. E.; LINES, R. A.; LEWINSOHN, D. A.; MCNABB, A. L.; STREBLOW, D. N.; BRAUD, V. M.; GRIESER, H. J.; BELISLE, J. T.; LEWINSOHN, D. M. HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells. **J Exp Med**, v. 196, n. 11, p. 1473-1481, 2002.

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptive immunity. **Nat Immunol**, v. 5, n. 10, p. 971-974, 2004.

HORWITZ, M. A.; HARTH, G.; DILLON, B. J.; MASLESA-GALIC, S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13853-13858, 2000.

HUTCHINS, A. P.; DIEZ, D.; MIRANDA-SAAVEDRA, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. **Brief Funct Genomics**, v. 12, n. 6, p. 489-498, 2013.

INFUSO, A.; FALZON, D. European survey of BCG vaccination policies and surveillance in children, 2005. **Euro Surveill**, v. 11, n. 3, p. 6-11, 2006.

JAIN, R.; DEY, B.; DHAR, N.; RAO, V.; SINGH, R.; GUPTA, U. D.; KATOCH, V. M.; RAMANATHAN, V. D.; TYAGI, A. K. Enhanced and enduring protection against

tuberculosis by recombinant BCG-Ag85C and its association with modulation of cytokine profile in lung. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e3869, 2008.

JIA, T.; SERBINA, N. V.; BRANDL, K.; ZHONG, M. X.; LEINER, I. M.; CHARO, I. F.; PAMER, E. G. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. **J Immunol**, v. 180, n. 10, p. 6846-6853, 2008.

JOOSTEN, S. A.; GOEMAN, J. J.; SUTHERLAND, J. S.; OPMEER, L.; DE BOER, K. G.; JACOBSEN, M.; KAUFMANN, S. H.; FINOS, L.; MAGIS-ESCURRA, C.; OTA, M. O.; OTTENHOFF, T. H.; HAKS, M. C. Identification of biomarkers for tuberculosis disease using a novel dual-color RT-MLPA assay. **Genes Immun**, v. 13, n. 1, p. 71-82, 2012.

JOUANGUY, E.; DUPUIS, S.; PALLIER, A.; DOFFINGER, R.; FONDANECHÉ, M. C.; FIESCHI, C.; LAMHAMEDI-CHERRADI, S.; ALTARE, F.; EMILE, J. F.; LUTZ, P.; BORDIGONI, P.; COKUGRAS, H.; AKCAKAYA, N.; LANDMAN-PARKER, J.; DONNADIEU, J.; CAMCIOGLU, Y.; CASANOVA, J. L. In a novel form of IFN-gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-gamma. **J Clin Invest**, v. 105, n. 10, p. 1429-1436, 2000.

JUNG, Y. J.; RYAN, L.; LACOURSE, R.; NORTH, R. J. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J Exp Med**, v. 201, n. 12, p. 1915-1924, 2005.

KALPANA, G. V.; BLOOM, B. R.; JACOBS, W. R., JR. Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in mycobacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 12, p. 5433-5437, 1991.

KANG, D. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis **PLoS One**, v., n., p., 2011.

KANG, D. D.; LIN, Y.; MORENO, J. R.; RANDALL, T. D.; KHADER, S. A. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16161, 2011.

KASMAR, A. G.; VAN RHIJN, I.; CHENG, T. Y.; TURNER, M.; SESHADRI, C.; SCHIEFNER, A.; KALATHUR, R. C.; ANNAND, J. W.; DE JONG, A.; SHIRES, J.; LEON, L.; BRENNER, M.; WILSON, I. A.; ALTMAN, J. D.; MOODY, D. B. CD1b tetramers bind alpha-beta T cell receptors to identify a mycobacterial glycolipid-reactive T cell repertoire in humans. **J Exp Med**, v. 208, n. 9, p. 1741-1747, 2011.

KAUFMANN, S. H.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P. H. New vaccines for tuberculosis. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2110-2119, 2010.

KAUFMANN, S. H.; GENGENBACHER, M. Recombinant live vaccine candidates against tuberculosis. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 6, p. 900-907, 2012.

KELLY, B.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell Res**, v. 25, n. 7, p. 771-784, 2015.

KHADER, S. A.; BELL, G. K.; PEARL, J. E.; FOUNTAIN, J. J.; RANGEL-MORENO, J.; CILLEY, G. E.; SHEN, F.; EATON, S. M.; GAFFEN, S. L.; SWAIN, S. L.; LOCKSLEY, R. M.; HAYNES, L.; RANDALL, T. D.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nat Immunol**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2007.

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 79-83, 2008.

KIM, B. H.; SHENOY, A. R.; KUMAR, P.; DAS, R.; TIWARI, S.; MACMICKING, J. D. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. **Science**, v. 332, n. 6030, p. 717-721, 2011.

KLEINNIJENHUIS, J.; QUINTIN, J.; PREIJERS, F.; JOOSTEN, L. A.; IFRIM, D. C.; SAEED, S.; JACOBS, C.; VAN LOENHOUT, J.; DE JONG, D.; STUNNENBERG, H. G.; XAVIER, R. J.; VAN DER MEER, J. W.; VAN CREVEL, R.; NETEA, M. G. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 43, p. 17537-17542, 2012.

KORBEE, C. J.; HEEMSKERK, M. T.; KOCEV, D.; VAN STRIJEN, E.; RABIEE, O.; FRANKEN, K.; WILSON, L.; SAVAGE, N. D. L.; DZEROSKI, S.; HAKS, M. C.; OTTENHOFF, T. H. M. Combined chemical genetics and data-driven bioinformatics approach identifies receptor tyrosine kinase inhibitors as host-directed antimicrobials. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 358, 2018.

KOUASSI, B.; N'GOM, A.; HORO, K.; GODE, C.; AHUI, B.; EMVOUDOU, N. M.; KOFFI, N.; ANON, J. C.; KONATE, K. F.; ITCHI, M.; KOFFI, M. O.; ANO, A.; MANEWA, S. F.; GRO BI, A.; AKA-DANGUY, E.; GNAZE, A.; TOURE, K. [Correlation of the manifestations of tuberculosis and the degree of immunosuppression in patients with HIV]. **Rev Mal Respir**, v. 30, n. 7, p. 549-554, 2013.

KOVARIK, P.; CASTIGLIA, V.; IVIN, M.; EBNER, F. Type I Interferons in Bacterial Infections: A Balancing Act. **Front Immunol**, v. 7, n., p. 652, 2016.

LANKAT-BUTTGEREIT, B.; TAMPE, R. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 187-204, 2002.

LEAVY, O. Innate immunity: GBPs coordinate vesicular trafficking for host defence. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 6, p. 372-373, 2011.

LI, P.; JIANG, W.; YU, Q.; LIU, W.; ZHOU, P.; LI, J.; XU, J.; XU, B.; WANG, F.; SHAO, F. Ubiquitination and degradation of GBPs by a Shigella effector to suppress host defence. **Nature**, v. 551, n. 7680, p. 378-383, 2017.

LI, Y.; BANERJEE, S.; WANG, Y.; GOLDSTEIN, S. A.; DONG, B.; GAUGHAN, C.; SILVERMAN, R. H.; WEISS, S. R. Activation of RNase L is dependent on OAS3 expression during infection with diverse human viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 8, p. 2241-2246, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOETSCHER, M.; GERBER, B.; LOETSCHER, P.; JONES, S. A.; PIALI, L.; CLARK-LEWIS, I.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. **J Exp Med**, v. 184, n. 3, p. 963-969, 1996.

LU, N.; WANG, L.; CAO, H.; LIU, L.; VAN KAER, L.; WASHINGTON, M. K.; ROSEN, M. J.; DUBE, P. E.; WILSON, K. T.; REN, X.; HAO, X.; POLK, D. B.; YAN, F. Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis. **J Immunol**, v. 192, n. 3, p. 1013-1023, 2014.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG Vaccine. **Maedica (Buchar)**, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2013.

MACMICKING, J. D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 367-382, 2012.

MAEURER, M. J.; TRINDER, P.; HOMMEL, G.; WALTER, W.; FREITAG, K.; ATKINS, D.; STORKEL, S. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2962-2970, 2000.

MAGLIONE, P. J.; CHAN, J. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 3, p. 676-686, 2009.

MALAER, J. D.; MATHEW, P. A. CS1 (SLAMF7, CD319) is an effective immunotherapeutic target for multiple myeloma. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 8, p. 1637-1641, 2017.

MARTINEZ, A. N.; MEHRA, S.; KAUSHAL, D. Role of interleukin 6 in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Infect Dis**, v. 207, n. 8, p. 1253-1261, 2013.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, n., p. 13, 2014.

MARTINEZ, V.; CARCELAIN, G.; BADELL, E.; JOUAN, M.; MAUGER, I.; SELLIER, P.; TRUFFOT, C.; BRICAIRE, F.; AREND, S. M.; OTTENHOFF, T.; AUTRAN, B.; GICQUEL, B. T-cell and serological responses to Erp, an exported Mycobacterium tuberculosis protein, in tuberculosis patients and healthy individuals. **BMC Infect Dis**, v. 7, n., p. 83, 2007.

MEGE, J. L.; MEHRAJ, V.; CAPO, C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, n. 3, p. 230-234, 2011.

MEKALANOS, J. J.; SWARTZ, D. J.; PEARSON, G. D.; HARFORD, N.; GROVNE, F.; DE WILDE, M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. **Nature**, v. 306, n. 5943, p. 551-557, 1983.

MENDEZ-SAMPERIO, P. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease. **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. e366-371, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico, v. 49, n.37, 2018. Disponível em < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/setembro/05/2018-041.pdf>> Acesso em: Dezembro 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica Nº 66/CGPNI/DEVEP/SVS/MS, 2006. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_bcg_2006_nova.pdf> Acesso em: Setembro 2013.

MOGUES, T.; GOODRICH, M. E.; RYAN, L.; LACOURSE, R.; NORTH, R. J. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Exp Med**, v. 193, n. 3, p. 271-280, 2001.

MOHAN, V. P.; SCANGA, C. A.; YU, K.; SCOTT, H. M.; TANAKA, K. E.; TSANG, E.; TSAI, M. M.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1847-1855, 2001.

MONTAMAT-SICOTTE, D. J.; MILLINGTON, K. A.; WILLCOX, C. R.; HINGLEY-WILSON, S.; HACKFORTH, S.; INNES, J.; KON, O. M.; LAMMAS, D. A.; MINNIKIN, D. E.; BESRA, G. S.; WILLCOX, B. E.; LALVANI, A. A mycolic acid-specific CD1-restricted T cell population contributes to acute and memory immune responses in human tuberculosis infection. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2493-2503, 2011.

MUELLER, Y. M.; PETROVAS, C.; BOJCZUK, P. M.; DIMITRIOU, I. D.; BEER, B.; SILVERA, P.; VILLINGER, F.; CAIRNS, J. S.; GRACELY, E. J.; LEWIS, M. G.; KATSIKIS, P. D. Interleukin-15 increases effector memory CD8+ t cells and NK Cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **J Virol**, v. 79, n. 8, p. 4877-4885, 2005.

MUSA, M. Immune mechanism: a 'double-edged sword'. **Malays J Med Sci**, v. 20, n. 3, p. 61-67, 2013.

NASCIMENTO, I. P.; RODRIGUEZ, D.; SANTOS, C. C.; AMARAL, E. P.; ROFATTO, H. K.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; GONCALVES, E. D. C.; D'IMPERIO-LIMA, M. R.; HIRATA, M. H.; SILVA, C. L.; WINTER, N.; GICQUEL, B.; MILLS, K. H. G.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; LEITE, L. C. C. Recombinant BCG

Expressing LTAK63 Adjuvant induces Superior Protection against Mycobacterium tuberculosis. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2109, 2017.

NEMES, E.; GELDENHUYS, H.; ROZOT, V.; RUTKOWSKI, K. T.; RATANGEE, F.; BILEK, N.; MABWE, S.; MAKHETHE, L.; ERASMUS, M.; TOEFY, A.; MULENGA, H.; HANEKOM, W. A.; SELF, S. G.; BEKKER, L. G.; RYALL, R.; GURUNATHAN, S.; DIAZGRANADOS, C. A.; ANDERSEN, P.; KROMANN, I.; EVANS, T.; ELLIS, R. D.; LANDRY, B.; HOKEY, D. A.; HOPKINS, R.; GINSBERG, A. M.; SCRIBA, T. J.; HATHERILL, M.; TEAM, C. S. Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. **N Engl J Med**, v. 379, n. 2, p. 138-149, 2018.

NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A.; LATZ, E.; MILLS, K. H.; NATOLI, G.; STUNNENBERG, H. G.; O'NEILL, L. A.; XAVIER, R. J. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. **Science**, v. 352, n. 6284, p. aaf1098, 2016.

ORME, I. M.; MILLER, E. S.; ROBERTS, A. D.; FURNEY, S. K.; GRIFFIN, J. P.; DOBOS, K. M.; CHI, D.; RIVOIRE, B.; BRENNAN, P. J. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. **J Immunol**, v. 148, n. 1, p. 189-196, 1992.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010.

PERDOMO, C.; ZEDLER, U.; KUHL, A. A.; LOZZA, L.; SAIKALI, P.; SANDER, L. E.; VOGELZANG, A.; KAUFMANN, S. H.; KUPZ, A. Mucosal BCG Vaccination Induces Protective Lung-Resident Memory T Cell Populations against Tuberculosis. **MBio**, v. 7, n. 6, p., 2016.

PEREIRA, S. M.; DANTAS, O. M.; XIMENES, R.; BARRETO, M. L. [BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies]. **Rev Saude Publica**, v. 41 Suppl 1, n., p. 59-66, 2007.

PITT, J. M.; BLANKLEY, S.; MCSHANE, H.; O'GARRA, A. Vaccination against tuberculosis: how can we better BCG? **Microb Pathog**, v. 58, n., p. 2-16, 2013.

PIZZA, M.; FONTANA, M. R.; GIULIANI, M. M.; DOMENIGHINI, M.; MAGAGNOLI, C.; GIANNELLI, V.; NUCCI, D.; HOL, W.; MANETTI, R.; RAPPUOLI, R. A genetically detoxified derivative of heat-labile Escherichia coli enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. **J Exp Med**, v. 180, n. 6, p. 2147-2153, 1994.

PIZZA, M.; GIULIANI, M. M.; FONTANA, M. R.; MONACI, E.; DOUCE, G.; DOUGAN, G.; MILLS, K. H.; RAPPUOLI, R.; DEL GIUDICE, G. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2534-2541, 2001.

PYM, A. S.; BRODIN, P.; MAJLESSI, L.; BROSCHE, R.; DEMANGEL, C.; WILLIAMS, A.; GRIFFITHS, K. E.; MARCHAL, G.; LECLERC, C.; COLE, S. T. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. **Nat Med**, v. 9, n. 5, p. 533-539, 2003.

QIE, Y. Q.; WANG, J. L.; ZHU, B. D.; XU, Y.; WANG, Q. Z.; CHEN, J. Z.; WANG, H. H. Evaluation of a new recombinant BCG which contains mycobacterial antigen ag85B-mpt64(190-198)-mtb8.4 in C57/BL6 mice. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 2, p. 133-139, 2008.

QIE, Y. Q.; WANG, J. L.; LIU, W.; SHEN, H.; CHEN, J. Z.; ZHU, B. D.; XU, Y.; ZHANG, X. L.; WANG, H. H. More vaccine efficacy studies on the recombinant Bacille Calmette-Guerin co-expressing Ag85B, Mpt64 and Mtb8.4. **Scand J Immunol**, v. 69, n. 4, p. 342-350, 2009.

QIU, X.; GUO, H.; YANG, J.; JI, Y.; WU, C. S.; CHEN, X. Down-regulation of guanylate binding protein 1 causes mitochondrial dysfunction and cellular senescence in macrophages. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 1679, 2018.

RODRIGUES, L. C.; PEREIRA, S. M.; CUNHA, S. S.; GENSER, B.; ICHIHARA, M. Y.; DE BRITO, S. C.; HIJJAR, M. A.; DOURADO, I.; CRUZ, A. A.; SANT'ANNA, C.; BIERRENBACH, A. L.; BARRETO, M. L. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. **Lancet**, v. 366, n. 9493, p. 1290-1295, 2005.

RUCKERT, R.; BRANDT, K.; ERNST, M.; MARIENFELD, K.; CSERNOK, E.; METZLER, C.; BUDAGIAN, V.; BULANOVA, E.; PAUS, R.; BULFONE-PAUS, S. Interleukin-15 stimulates macrophages to activate CD4+ T cells: a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 63-73, 2009.

SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 559-568, 2008.

SHEN, H.; WANG, C.; YANG, E.; XU, Y.; LIU, W.; YAN, J.; WANG, F.; WANG, H. Novel recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and mouse TNF-alpha induces significantly enhanced cellular immune and antibody responses in C57BL/6 mice. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 8, p. 435-441, 2010.

SHI, C.; CHEN, L.; CHEN, Z.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z.; LU, J.; FU, R.; WANG, C.; FANG, Z.; FAN, X. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing HspX protein. **Vaccine**, v. 28, n. 32, p. 5237-5244, 2010.

SINHA, P.; GUPTA, A.; PRAKASH, P.; ANUPURBA, S.; TRIPATHI, R.; SRIVASTAVA, G. N. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. **BMC Infect Dis**, v. 16, n., p. 123, 2016.

SKEIKY, Y. A.; ALDERSON, M. R.; OVENDALE, P. J.; GUDERIAN, J. A.; BRANDT, L.; DILLON, D. C.; CAMPOS-NETO, A.; LOBET, Y.; DALEMANS, W.; ORME, I. M.; REED, S. G. Differential immune responses and protective efficacy

induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. **J Immunol**, v. 172, n. 12, p. 7618-7628, 2004.

SMIT, M. J.; VERDIJK, P.; VAN DER RAAIJ-HELMER, E. M.; NAVIS, M.; HENSBERGEN, P. J.; LEURS, R.; TENSEN, C. P. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 1959-1965, 2003.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. **Microb Cell Fact**, v. 4, n. 1, p. 1, 2005.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Microbiol Rev**, v. 56, n. 4, p. 622-647, 1992.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, n., p. 685-711, 2003.

STONIER, S. W.; MA, L. J.; CASTILLO, E. F.; SCHLUNS, K. S. Dendritic cells drive memory CD8 T-cell homeostasis via IL-15 transpresentation. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4546-4554, 2008.

SUGAWARA, I.; UDAGAWA, T.; TANIYAMA, T. Protective efficacy of recombinant (Ag85A) BCG Tokyo with Ag85A peptide boosting against Mycobacterium tuberculosis-infected guinea pigs in comparison with that of DNA vaccine encoding Ag85A. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 87, n. 2, p. 94-101, 2007.

TABETA, K.; GEORGEL, P.; JANSSEN, E.; DU, X.; HOEBE, K.; CROZAT, K.; MUDD, S.; SHAMEL, L.; SOVATH, S.; GOODE, J.; ALEXOPOULOU, L.; FLAVELL, R. A.; BEUTLER, B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 10, p. 3516-3521, 2004.

TASCON, R. E.; SOARES, C. S.; RAGNO, S.; STAVROPOULOS, E.; HIRST, E. M.; COLSTON, M. J. Mycobacterium tuberculosis-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. **Immunology**, v. 99, n. 3, p. 473-480, 2000.

TOLEDO PINTO, T. G.; BATISTA-SILVA, L. R.; MEDEIROS, R. C. A.; LARA, F. A.; MORAES, M. O. Type I Interferons, Autophagy and Host Metabolism in Leprosy. **Front Immunol**, v. 9, n., p. 806, 2018.

TRICCAS, J. A. Recombinant BCG as a vaccine vehicle to protect against tuberculosis. **Bioeng Bugs**, v. 1, n. 2, p. 110-115, 2010.

TRITTO, E.; MUZZI, A.; PESCE, I.; MONACI, E.; NUTI, S.; GALLI, G.; WACK, A.; RAPPUOLI, R.; HUSSELL, T.; DE GREGORIO, E. The acquired immune response to the mucosal adjuvant LTK63 imprints the mouse lung with a protective signature. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5346-5357, 2007.

VIGNALI, D. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nat Immunol**, v. 13, n. 8, p. 722-728, 2012.

VOSS, G.; CASIMIRO, D.; NEYROLLES, O.; WILLIAMS, A.; KAUFMANN, S. H. E.; MCSHANE, H.; HATHERILL, M.; FLETCHER, H. A. Progress and challenges in TB vaccine development. **F1000Res**, v. 7, n., p. 199, 2018.

VYNNYCKY, E.; FINE, P. E. Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. **Am J Epidemiol**, v. 152, n. 3, p. 247-263, 2000.

WAKSMAN, S. A. Streptomycin and neomycin: an antibiotic approach to tuberculosis. **Br Med J**, v. 2, n. 4679, p. 595-600, 1950.

WANG, C.; FU, R.; CHEN, Z.; TAN, K.; CHEN, L.; TENG, X.; LU, J.; SHI, C.; FAN, X. Immunogenicity and protective efficacy of a novel recombinant BCG strain overexpressing antigens Ag85A and Ag85B. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, n., p. 563838, 2012.

WANG, J.; QIE, Y.; ZHU, B.; ZHANG, H.; XU, Y.; WANG, Q.; CHEN, J.; LIU, W.; WANG, H. Evaluation of a recombinant BCG expressing antigen Ag85B and PPE protein Rv3425 from DNA segment RD11 of Mycobacterium tuberculosis in C57BL/6 mice. **Med Microbiol Immunol**, v. 198, n. 1, p. 5-11, 2009.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunol Rev**, v. 264, n. 1, p. 182-203, 2015.

WHO. Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention. **Indian J Med Res**, v. 70, n., p. 349-363, 1979.

WHO. Global Tuberculosis Report 2012. **WHO Press**, v., n., p., 2012.

WHO. Global Tuberculosis Report 2018. **WHO Press**, v., p., 2018.

WILSON, M. E.; FINEBERG, H. V.; COLDITZ, G. A. Geographic latitude and the efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccine. **Clin Infect Dis**, v. 20, n. 4, p. 982-991, 1995.

WU, K.; DONG, D.; FANG, H.; LEVILLAIN, F.; JIN, W.; MEI, J.; GICQUEL, B.; DU, Y.; WANG, K.; GAO, Q.; NEYROLLES, O.; ZHANG, J. An interferon-related signature in the transcriptional core response of human macrophages to Mycobacterium tuberculosis infection. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38367, 2012.


XU, Y.; ZHU, B.; WANG, Q.; CHEN, J.; QIE, Y.; WANG, J.; WANG, H.; WANG, B. Recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and mouse-IFN-gamma confers effective protection against Mycobacterium tuberculosis in C57BL/6 mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 480-487, 2007.

APÊNDICE – Artigos Publicados

- I. Ivan P. Nascimento, Dunia Rodriguez, **Carina C. Santos**, Eduardo P. Amaral, Henrique K. Rofatto, Ana P. Junqueira-Kipnis, Eduardo D.C. Gonçalves, Maria R. D'Império-Lima, Mario H. Hirata, Celio L. Silva, Nathalie Winter, Brigitte Gicquel, Kingston H.G. Mills, Mariagrazia Pizza, Rino Rappuoli and Luciana C.C. Leite. *Recombinant BCG Expressing LTAK63 Adjuvant induces Superior Protection against Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific Reports**, v.7, p. 2109, 2017.

OPEN

Recombinant BCG Expressing LTAK63 Adjuvant induces Superior Protection against *Mycobacterium tuberculosis*

Ivan P. Nascimento¹, Dunia Rodriguez¹, Carina C. Santos^{1,4}, Eduardo P. Amaral², Henrique K. Rofatto³, Ana P. Junqueira-Kipnis⁵, Eduardo D. C. Gonçalves⁶, Maria R. D'Império-Lima ², Mario H. Hirata⁷, Celio L. Silva⁸, Nathalie Winter⁹, Brigitte Gicquel¹⁰, Kingston H. G. Mills¹¹, Mariagrazia Pizza¹², Rino Rappuoli¹² & Luciana C. C. Leite¹

Received: 7 December 2016

Accepted: 6 April 2017

Published: xx xx xxxx
Published online: 18 May 2017

In order to develop an improved BCG vaccine against tuberculosis we have taken advantage of the adjuvant properties of a non-toxic derivative of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT), LTAK63. We have constructed rBCG strains expressing LTAK63 at different expression levels. Mice immunized with BCG expressing low levels of LTAK63 (rBCG-LTAK63_{lo}) showed higher Th1 cytokines and IL-17 in the lungs, and when challenged intratracheally with *Mycobacterium tuberculosis* displayed a 2.0–3.0 log reduction in CFU as compared to wild type BCG. Histopathological analysis of lung tissues from protected mice revealed a reduced inflammatory response. Immunization with rBCG-LTAK63_{lo} also protected against a 100-fold higher challenge dose. Mice immunized with rBCG-LTAK63_{lo} produced an increase in TGF- β as compared with BCG after challenge, with a corresponding reduction in Th1 and Th17 cytokines, as determined by Real Time RT-PCR. Furthermore, rBCG-LTAK63_{lo} also displays protection against challenge with a highly virulent Beijing isolate. Our findings suggest that BCG with low-level expression of the LTAK63 adjuvant induces a stronger immune response in the lungs conferring higher levels of protection, and a novel mechanism subsequently triggers a regulatory immune response, which then limits the pathology. The rBCG-LTAK63_{lo} strain can be the basis of an improved vaccine against tuberculosis.

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) the causative agent of tuberculosis remains a major worldwide health problem, responsible for over 10.4 million cases and 1.8 million deaths annually¹. The difficulty of timely diagnosis and the requirement of many months of treatment, leads to interruptions in treatment and generates antibiotic resistance. The increasing frequency of multidrug-resistant (MDR) isolates of tuberculosis and others^{2,3}, has resulted in infections extremely difficult to treat and has been a major concern for health authorities worldwide².

The current vaccine against tuberculosis, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), is the only vaccine available. It is a safe and low cost vaccine administered to more than 4 billion individuals since its licensing in 1921. It can protect children efficiently against early manifestations of Mtb. However, the protective

¹Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. ²Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil. ³Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. ⁴ Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP, SP, Brazil. ⁵Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil. ⁶Easytech Soluções em Biotecnologia Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ⁷Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, SP, Brazil. ⁸Farmacore Biotecnologia Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ⁹INRA, Université de Tours, UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique SP, Nouzilly, France. ¹⁰Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur, Paris, France. ¹¹Immune Regulation Research Group, School of Biochemistry and Immunology, Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland. ¹²GlaxoSmithKline, Siena, Italy. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.C.C.L. (email: luciana.leite@butantan.gov.br)

memory response induced by BCG immunization wanes in 10–20 years and it induces limited protection against adult pulmonary Mtb³. Hence, immunization strategies to either replace or supplement BCG are urgently needed.

Several challenges remain in Mtb vaccine development, such as the lack of immune markers and correlates of protection or the definition of mechanisms of protective immunity against Mtb. Nonetheless, some aspects of the immune response that can control the infection have been identified, such as the essential role for CD4+ Th1 and CD8+ T cells that produce IFN- γ and TNF- α and more recently, a protective role for IL-17. There is also evidence that multifunctional T cells that produce IFN- γ , TNF- α and/or IL-2 simultaneously may correlate with protection^{4–6}.

Over the last decades, there have been substantial efforts towards the development of new tuberculosis vaccines, some of which have reached clinical trials³. Current vaccine approaches have focused on a variety of strategies, such as: (1) recombinant proteins that include dominant T cell antigens from Mtb or BCG; (2) viral vectors such as MVA, adenovirus or even DNA vaccines expressing the same T cell antigens; (3) recombinant BCG (rBCG) overexpressing T cell antigens (including phagosome -escape mutants); or (4) vaccines based on rationally attenuated Mtb or other mycobacterial species, such as *M. vaccae* and *M. smegmatis*^{3, 7–10}. There are also prime-boost strategies being tested with BCG or rBCG prime and boost with recombinant proteins, viral vectors and DNA vaccines. Most of these strategies attempt to induce the class I MHC pathway of antigen presentation by cross-priming and increase CD4+ Th1 and CD8+ T cell response against the mycobacteria¹¹. More than 100 Mtb vaccine candidates have been tested in different animal models, including non-human primates, with some promising candidates currently in clinical trials^{12, 13}. However, efficacy in humans has not yet been demonstrated.

We have investigated an alternative strategy for improvement of the BCG vaccine. It is well known that bacterial toxins and toxin derivatives have adjuvant properties^{14, 15}. We have previously generated rBCG strains expressing tetanus toxin fragment C (FC), the mutated diphtheria toxin derivative, CRM197, and the genetically detoxified subunit S1 of pertussis toxin – S1PT- 9K/129G, demonstrating that BCG expressing FC and CRM197 modulates the immune response towards Th2, whereas BCG expressing S1PT promoted a shift towards Th1 responses in several animal models^{16–21}. Although it is still not clear what kind of immune responses are necessary for protection against Mtb infections, it is generally accepted that induction of potent Th1 responses will be important. Therefore, we have investigated the expression of a potent Th1-driving toxin derivative – a genetically detoxified mutant of *E. coli* heat labile enterotoxin, LTK63¹⁵, in BCG, to develop a candidate vaccine against Mtb.

LT is a very potent toxin that promotes antibody and broad T cell responses, similar to cholera toxin. When used as vaccine adjuvant, LT has been shown to enhance antigen presentation, stimulate T cell proliferation and cytokine production, and promote strong mucosal IgG and IgA antibody responses²². Genetic detoxification in the A subunit transforms it into a potent non-toxic mucosal adjuvant with increasing ability to induce Th1 responses¹⁵. Broad pre-clinical testing as mucosal adjuvant showed no toxicity in mice²³, guinea pigs²⁴ and macaques²⁵, and it has an extensive clinical safety record of oral and percutaneous administration, although nasal administration has not been recommended²⁶. The A subunit of LTK63 has not yet been evaluated as adjuvant and it is not expected to have the potential toxic properties ascribed to the binding B subunit when delivered intranasally.

Here we have developed new rBCG constructs expressing LTK63 derivatives at different levels using promoters with varying strengths to optimize the immune response and obtain higher protective levels against Mtb challenge. The rBCG-LTAK63 strain was shown to induce protection in several mouse models (different challenge doses and times after challenge), including challenge with a highly virulent Beijing strain.

Results

Construction and characterization of protection by rBCG-LTK63 and rBCG-LTAK63.

Initially,

the whole *ltk63* gene was placed under control of the *P_{blaF*}* promoter. Immunization with the rBCG-LTK63 strain induced a 2.0 log reduction in CFU in the lungs of immunized mice following a challenge with virulent *M. tuberculosis* H37Rv (recovered 30 days later) when compared with control animals and a 1.0 log reduction when compared with BCG-immunized animals (Fig. 1). However, the rBCG-LTK63 strain was not stable upon passaging. We considered the hypothesis that the expression of the whole molecule could be toxic to the bacteria.

Therefore, in another construct only the *ltak63* subunit was placed under control of the *P_{blaF*}* promoter, resulting in a rBCG strain displaying high level of expression of LTAK63 (Supplementary Fig. 1). BALB/c

mice immunized with this strain and challenged intratracheally with Mtb displayed a 1.4–2.0 log lower CFU count (recovered 30 days later) when compared with control animals and 0.3–0.4 log reduction when compared with BCG (Supplementary Fig. 2a,b).

Construction and protective immunity of rBCG expressing lower levels of LTAK63. In order to evaluate if the expression levels of LTAK63 would affect the immune response and protection, the *ltak63* gene was codon optimized for expression in mycobacteria and placed under control of the P_{AN} promoter, considered a weaker promoter as compared to P_{blaF^*} . The resulting strain displayed lower expression levels of LTAK63, as compared to the original construct, generating rBCG-LTAK63_{lo} (Fig. 2a). By comparison, the construct containing

the P_{blaF^*} promoter was named rBCG-LTAK63_{hi} (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Fig. 2a and b). Immunization of BALB/c mice with rBCG-LTAK63_{hi} or rBCG-LTAK63_{lo} induced mycobacteria-specific

IFN- γ -secreting spleen cells; TNF- α production was also detected in splenocytes from mice immunized with rBCG-LTAK63_{hi} (Fig. 2b,c). Furthermore, both constructs induced significantly higher production of IFN- γ /IL-2 double positive CD4⁺ T cells and rBCG-LTAK63_{lo} induced higher levels of IFN- γ /TNF- α double positive CD4⁺ T cells (Fig. 2d,e). On the other hand, lung cells from mice immunized with rBCG-LTAK63_{lo} displayed higher production of IFN- γ , IL-6, and IL-17 when compared with lung cells from mice immunized with BCG or rBCG-LTAK63_{hi} (Fig. 2f-i).

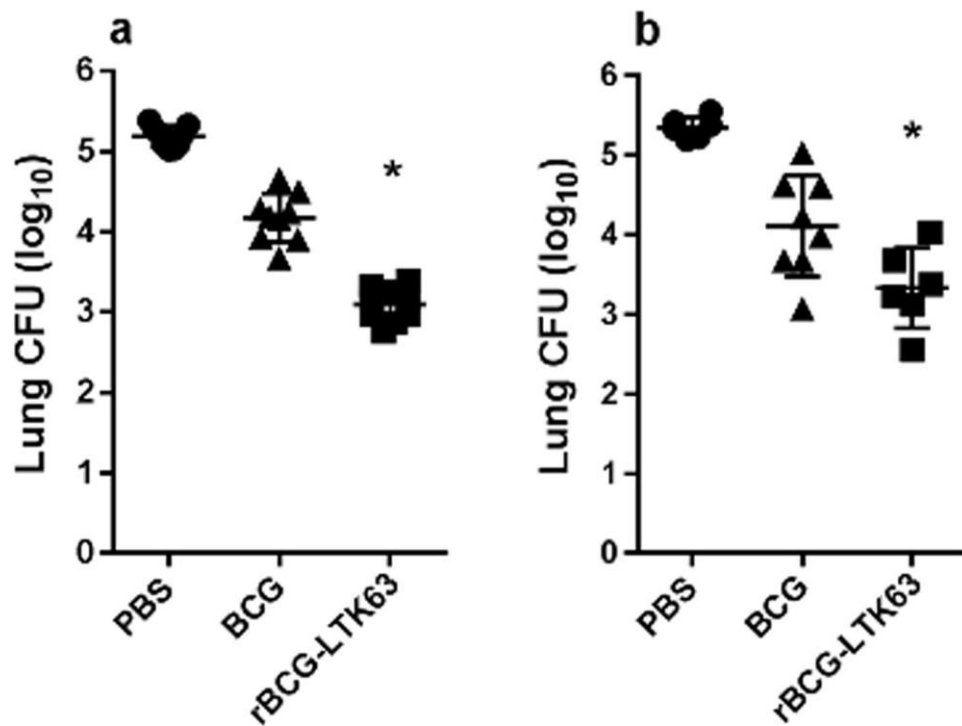


Figure 1. Protection of mice immunized with rBCG-LTK63 from Mtb challenge. BALB/c mice were immunized with BCG or rBCG-LTK63 (1×10^6 CFU) (s.c.) and challenged intratracheally 8 weeks later with a dose of Mtb H37Rv (1×10^5 CFU). Recovery of Mtb was evaluated in the lungs 30 days after challenge. (a) Experiment 1 (n = 10 animals) and (b) Experiment 2 (n = 6–8 animals). Bars are mean \pm S.D. (*) Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$ as compared to the BCG group (one-way ANOVA).

BALB/c mice immunized with the rBCG-LTAK63₁₀ construct and challenged with Mtb had a 3.0–4.0 log reduction in CFU (recovered 30 days later) when compared with control animals and 2.5–3.0 log reduction when compared with BCG-immunized mice (Fig. 3a,b). Histopathology analysis of lung tissues from non-immunized and challenged mice shows intense infiltration of inflammatory cells. The lung tissues of mice immunized with rBCG-LTAK63₁₀ display decreased inflammation as compared to those immunized with BCG (Fig. 3c–f). These findings demonstrate that immunization with rBCG-LTAK63₁₀ induces protective immunity against Mtb and that this may be associated with reduced infection-induced inflammation in the lungs.

Challenge of rBCG-LTAK63 immunized mice with a higher dose of Mtb. BALB/c mice immunized with the rBCG-LTAK63₁₀ construct were challenged after 12 weeks with a 100-fold higher dose of Mtb (1×10^7 CFU of H37Rv) and the bacteria were quantified in the lungs of mice 30 and 60 days after challenge. At 30 days, immunization with BCG provided no protection, while rBCG-LTAK63₁₀ induced a significant reduction of ~3.0 logs CFU in the lungs of immunized mice compared with PBS or BCG-immunized mice (Fig. 4a). All mice immunized with rBCG-LTAK63₁₀ survived, whereas 40% of control or BCG immunized mice died 2 weeks after the Mtb challenge (not shown). At 60 days, mice immunized with rBCG-LTAK63₁₀ still displayed ~1.0 log reduction in CFU in the lungs, while BCG was comparable to control mice (Fig. 4b).

In another experiment, groups of BALB/c mice were immunized with either BCG, rBCG-LTAK63_{hi} or rBCG-LTAK63_{lo}, and challenged after 90 days with a high dose of Mtb, and bacteria recovered from the lungs after 120 days. Mice immunized with PBS or BCG had comparable CFU levels, while mice immunized with r-BCG-LTAK63₁₀ showed a 1.1 log reduction when compared with BCG-immunized mice (Fig. 4c).

Histopathology analysis of lung tissues from mice immunized with rBCG-LTAK63₁₀ and challenged with Mtb display decreased inflammation when compared with non-immunized or BCG-immunized mice, which showed intense infiltration of inflammatory cells (Fig. 4d–f).

Quantitative mRNA expression of cytokines was determined in the lungs of mice immunized with rBCG - LTAK63₁₀ and challenged with either 1×10^5 CFU (from Fig. 3a) or the higher dose of Mtb, 1×10^7 CFU (from Fig. 4a). When challenged with the higher dose of Mtb, an increased expression of the regulatory molecule, TGF- β , was observed in the rBCG- LTAK63₁₀ group when compared with the BCG group (Fig. 5b), but comparable levels were detected in the low dose challenge (Fig. 5a). On the other hand, expression of the inflammatory cytokines, IL-12, IFN- γ , TNF- α , and IL-17, together with NF- κ B2, were decreased in the rBCG-LTAK-63₁₀-immunized mice when compared with those immunized with BCG (Fig. 5b), and the same trend was observed for most of the cytokines in the low challenge dose, although not statistically significant (Fig. 5a). In contrast, the expression of TGF- β and the inflammatory cytokines, IL-12, IFN- γ , TNF- α or NF- κ B2 were not altered in the BCG group when compared with the PBS group at either challenge dose (Fig. 5a and b). The

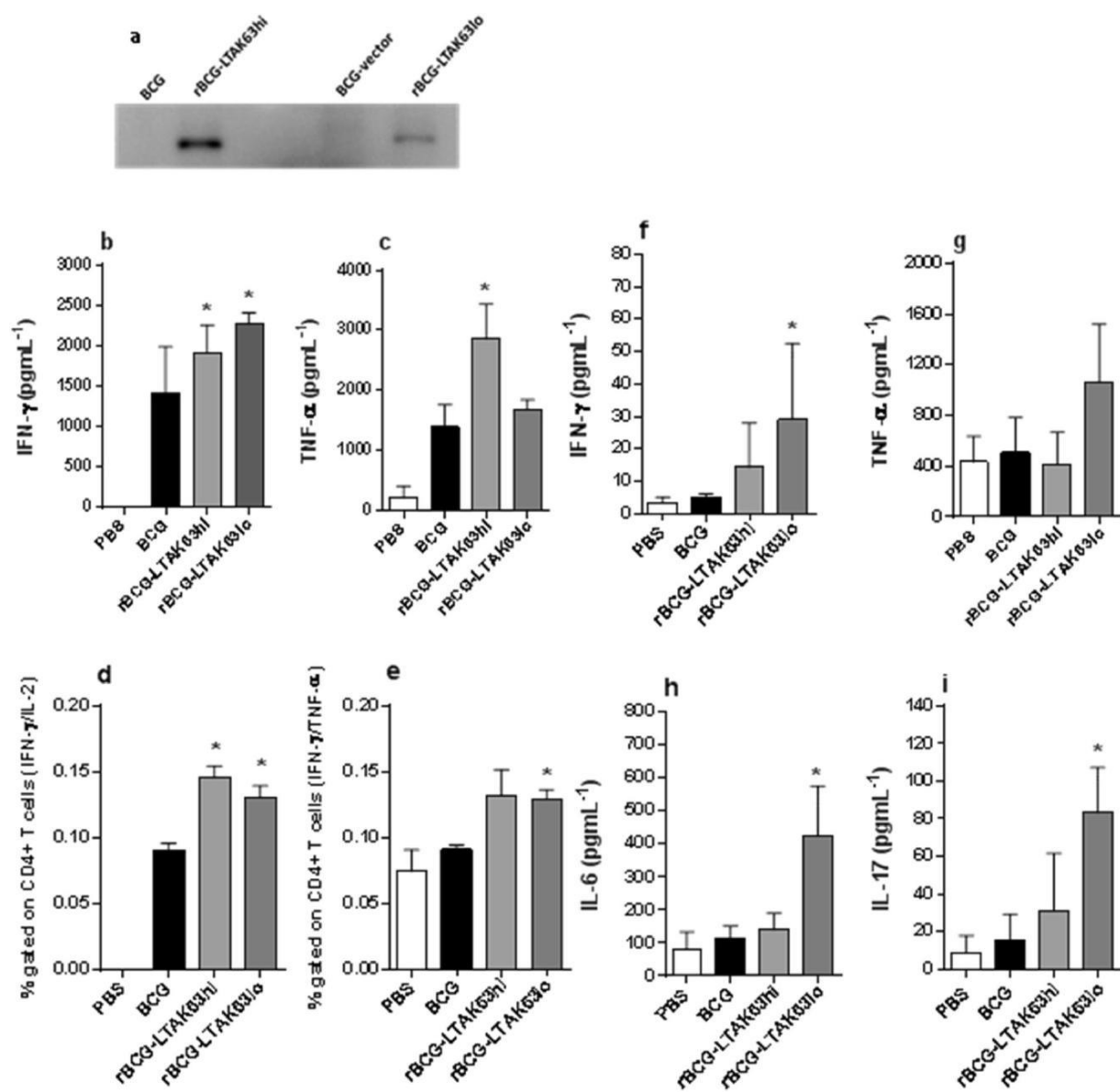


Figure 2. Western blot of different rBCG-LTAK63 constructs and cytokine production in the splenocytes and lungs of mice immunized with these constructs. **(a)** Western blot of total soluble protein extracts from BCG, rBCG-LTAK63_{hi}, BCG-vector (BCG transformed with the empty pMIP12 expression vector) or rBCG-LTAK63_{lo} (10 µg) analyzed using a polyclonal anti-LTAK63 antibody (1:500). BALB/c mice were immunized with either BCG, rBCG-LTAK63_{hi} or rBCG-LTAK63_{lo} (1×10^6 CFU). Splenocytes were isolated after 60 days and *in vitro* re-stimulated with CFP to produce **(b)** IFN- γ , and **(c)** TNF- α as determined by ELISA, or **(d)** CD4⁺ T cells doubly positive for IFN- γ /IL-2 and **(e)** CD4⁺ T cells doubly positive for IFN- γ /TNF- α . Lung cells were separated and re-stimulated with CFP to produce **(f)** IFN- γ , **(g)** TNF- α , **(h)** IL-6 and **(i)** IL-17. Results are mean \pm S.D. (*) Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$ as compared to the BCG group (one-way ANOVA).

expression of IL-17 was lower in the BCG group than in the PBS group in the high dose challenge, although IL-17 levels in the rBCG-LTAK63_{lo} were even lower (Fig. 5b).

Challenge of rBCG-LTAK63 immunized mice with a highly virulent Beijing clinical isolate.

In order to assess the efficacy of rBCG-LTAK63_{lo} vaccine against a clinical isolate, BALB/c mice immunized with rBCG-LTAK63_{lo} or BCG, were challenged 90 days later with the Mtb Beijing strain 1471. The dose chosen (1×10^3 CFU/animal) was previously determined as a lethal dose in C57BL/6 mice²⁷. An examination of lung bacterial load 30 days later showed that mice immunized with rBCG-LTAK63_{lo} had 1.5–2.2 logs reduction in bacterial burden when compared to mice immunized with BCG or PBS ($P < 0.05$) (Fig. 6).

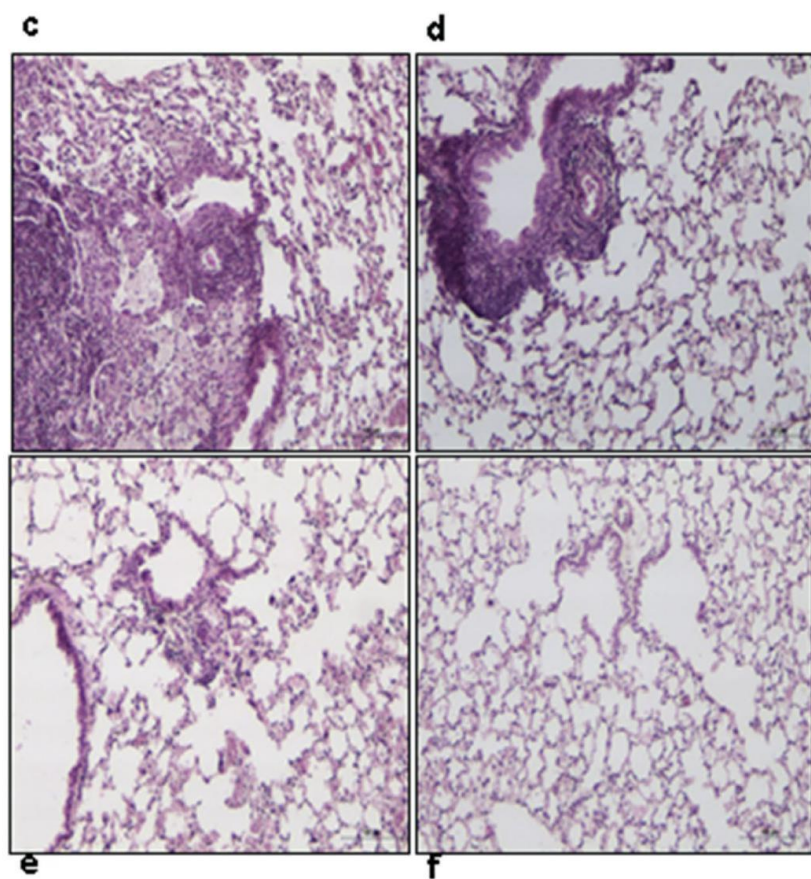
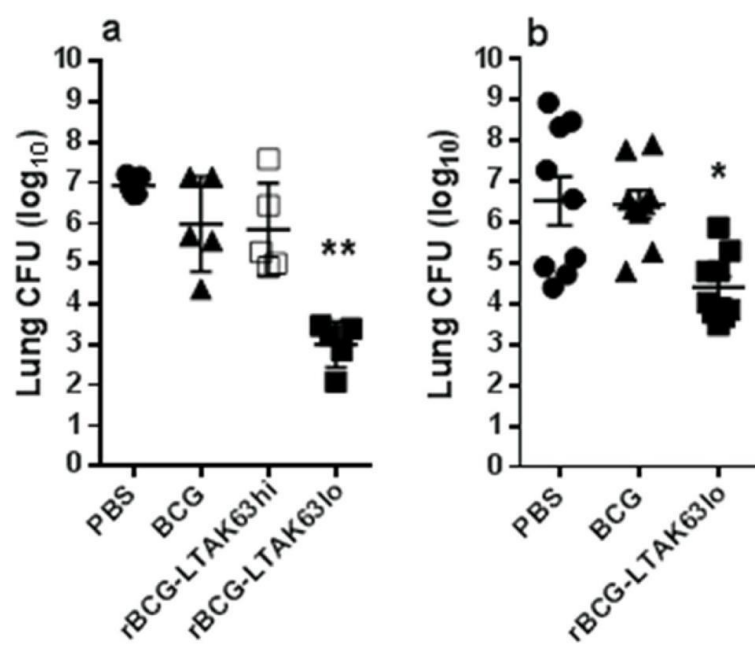


Figure 3. Protection against challenge with Mtb induced by immunization with rBCG-LTAK63_{lo}. BALB/c mice were immunized with BCG, rBCG-LTAK63_{hi} or rBCG-LTAK63_{lo} (1×10^6 CFU) and a group received PBS; they were challenged intratracheally 12 weeks later with a dose of Mtb H37Rv (1×10^5 CFU). Bacteria were recovered from the lungs 30 days after challenge. **(a)** Experiment 1 (n = 5 animals) and **(b)** Experiment 2 (n = 8–10 animals). Bars are mean \pm S.D. (*) Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$ or (**) $P \leq 0.01$ as compared to the BCG group (one-way Anova). Histological analysis was performed on the lungs of challenged mice from Experiment 1: that received **(c)** PBS, **(d)** BCG, **(e)** rBCG-LTAK63_{hi} or **(f)** rBCG-LTAK63_{lo} and challenged with Mtb 90 days post immunization. Tissues were collected 30 days post challenge, sectioned, stained with H&E, and examined by optical microscopy. Bars indicate 100 μ m scale.

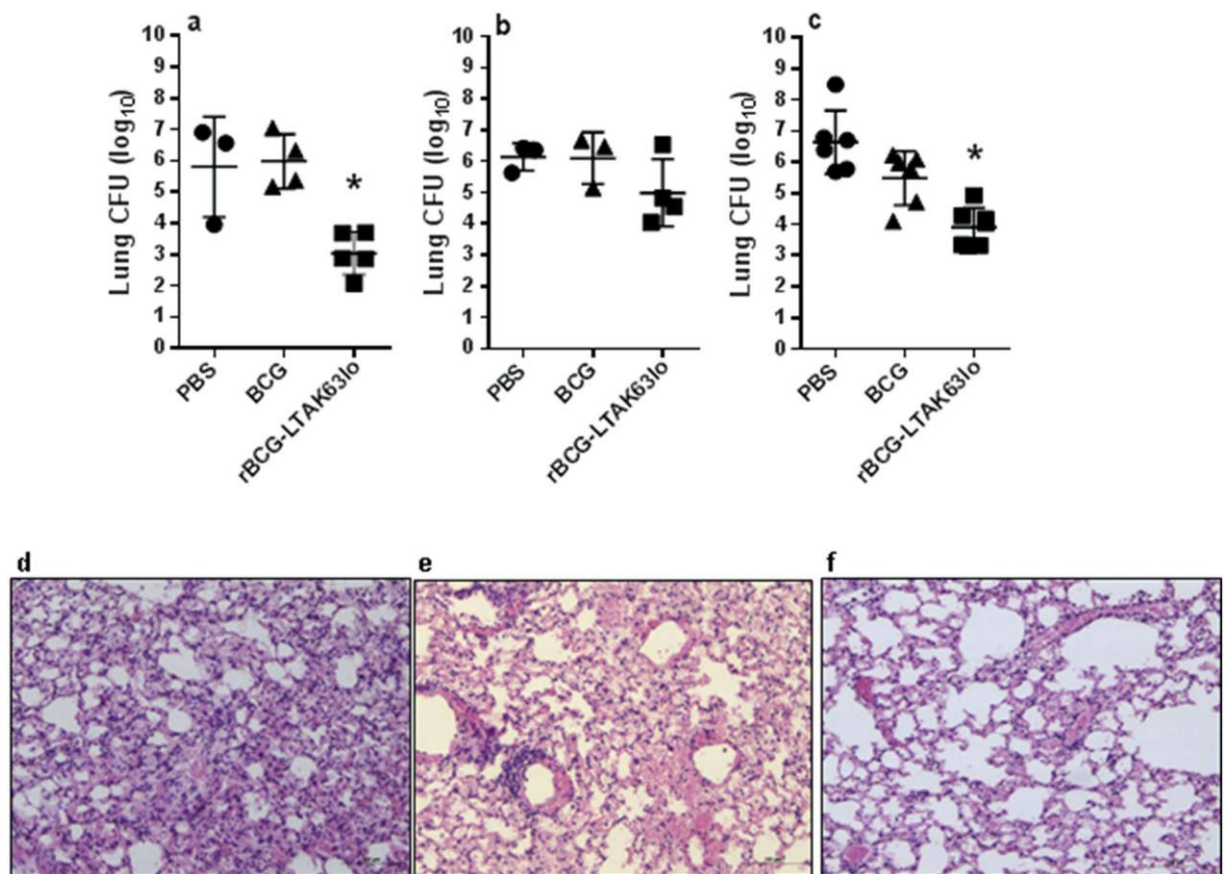


Figure 4. Immunization of mice with rBCG-LTAK631₀ induces protection against challenge with a higher dose of Mtb. BALB/c mice were immunized with BCG or rBCG-LTAK631₀ (1×10^6 CFU) and a group received PBS and challenged 12 weeks later with a high intratracheal dose of Mtb H37Rv (1×10^7 CFU). Bacteria were recovered from the lungs of challenged mice after (a) 30 days or (b) 60 days. In a second experiment under the same conditions bacteria were recovered from the lungs of challenged mice after (c) 120 days. (*) Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$ as compared to the BCG group (one-way Anova). Histological analysis was performed on the lungs of challenged mice that received: (d) PBS, (e) BCG or (f) rBCG-LTAK631₀. Tissues were collected 30 days post challenge, sectioned, stained with H&E and examined by optical microscopy. Bars indicate 100 μm scale.

Discussion

The significant new findings of this study are the demonstration that a modified BCG vaccine expressing a non-toxic mutant toxin of *E. coli*, with adjuvant properties, is highly immunogenic and can confer superior protection against *M. tuberculosis* and a subsequent regulatory mechanism after infection that prevents pathology in the lungs. We have previously demonstrated that BCG expressing bacterial toxin derivatives with known adjuvant properties can shift immune responses induced towards a Th1-type *in vivo*^{19, 20}. Although there is still considerable controversy over what kind of immune response is required for an effective vaccine against tuberculosis, the consensus view is that a shift towards a Th1 profile should be protective, with increased production of IFN- γ , TNF- α and IL-2. More recently there is evidence of a protective role for IL-17 and multifunctional CD4⁺ T cells^{4, 28}. In this study, we demonstrate significant protection against TB challenge in mice using a recombinant BCG expressing the mutated A subunit of LTK63, exploiting the known adjuvant properties of LT.

The rBCG-LTK63 was not stable, but using only the LTAK63 subunit expressed under the control of 2 different promoters (a strong and a weak mycobacterial promoter) it was possible to obtain different expression levels

– rBCG-LTAK63_{hi} and rBCG-LTAK63_{lo}. The level of antigen expression in BCG can affect the immune response induced²⁹ and this could influence the intensity of the adjuvant effect on the mycobacteria and possibly the level of protection. The expression of the A subunit through a high-strength promoter allowed stable expression, but induced lower protection levels against challenge. Higher protection levels were obtained through the use of a weaker mycobacterial promoter. Analysis of the antigen-specific immune response using spleen cells from immunized mice revealed IFN- γ and TNF- α production, even at 60 days after immunization, but this did not correlate with the protection. In contrast, evaluation of immune responses in the lungs revealed higher IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-17 production in rBCG-LTAK63_{lo}- immunized mice when compared with BCG or rBCG-LTAK63_{hi} groups and this correlated with better protection against challenge with *M. tuberculosis*. However, more complex mechanisms may be involved and other parameters should be investigated to serve as correlates of protection³⁰.

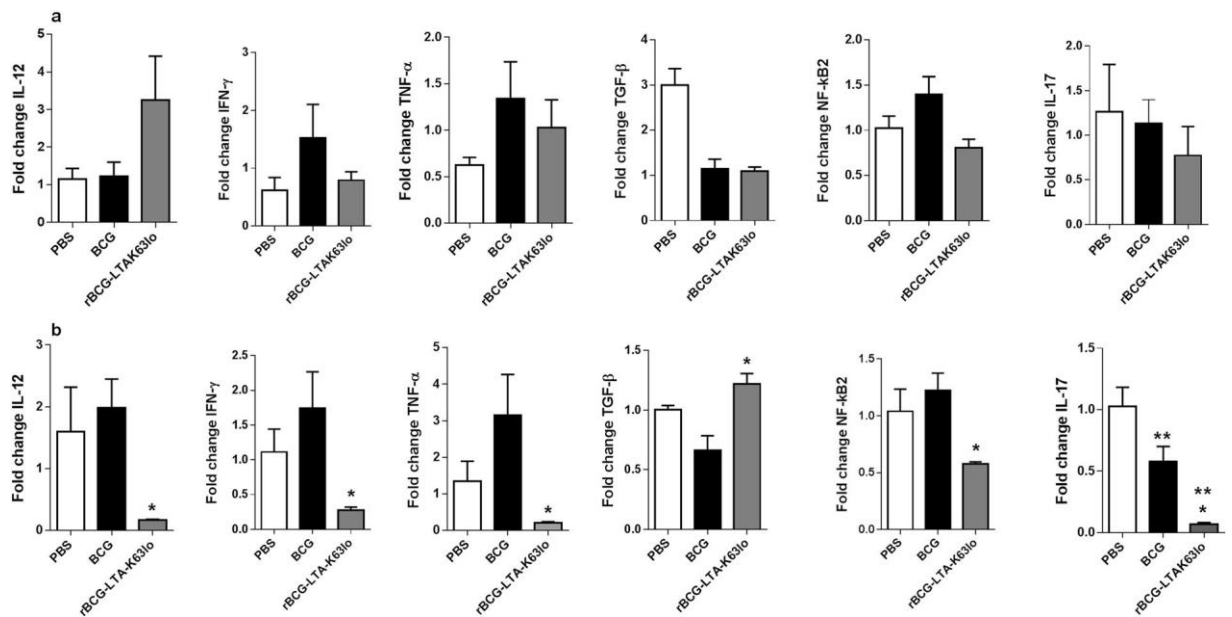


Figure 5. Cytokine production in the lungs of BALB/c mice immunized with rBCG-LTAK63₁₀ and challenged with Mtb as evaluated by Real-Time RT-PCR. Lung tissue from mice immunized with BCG or rBCG-LTAK63₁₀ were collected 30 days post-challenge with either (a) Mtb H37Rv (1×10^5 UFC) or (b) a higher dose of Mtb H37Rv (1×10^7 UFC) and cytokine mRNA expression fold changes of IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , NF- κ B2 and IL-17, were analyzed by Real-Time RT-PCR. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$ as compared to (*) BCG or (**) compared to PBS (one-way Anova). Target gene expression was normalized as compared to GAPDH and Actin levels.

Immunization of mice with either construct of rBCG-LTAK63 induced higher Th1 responses when compared to the BCG group, determined either by the higher concentrations of IFN- γ and/or TNF- α produced by splenocytes from immunized animals or by IFN- γ /IL-2 or IFN- γ /TNF- α double positive CD4⁺ T cells. The immune responses detectable in the spleen were comparable for both rBCG-LTAK63 constructs, and were not very different from those reported for other vaccine candidates based on recombinant BCG, or even other vaccine strategies³¹. It was only in the lungs that clear differences in the immune response could be observed between the different BCG vaccines, probably reflecting the importance of local cellular immune responses at the site of infection.

The two most widely used Mtb challenge models have been the aerosol and the intratracheal models, and authors have favored the first due to the fact that it would be a more physiological representation of infection. However, it has been hypothesized that, the low dose challenge may not represent the high and constant exposure of individuals to Mtb infection occurring in high burden settings³². This could account for the inability of the currently used challenge models to provide correlates of protection and predict efficacy in humans. Nonetheless, whichever model used, at 30 days after infection, mice usually have comparable numbers of bacteria in the lungs $\sim 10^6$ – 10^7 CFUs, showing a 1 log reduction due to BCG immunization. The current strategies being investigated for the development of vaccines against TB have shown variable results in terms of protection. Strategies based on live attenuated bacteria or viruses, expressing immunodominant antigens from Mtb, or BCG prime/Mtb protein boost have been shown to induce up to 1 log CFU reduction as compared to BCG⁷. The immunization of mice with rBCG - LTAK63₁₀ showed a protection level considerably higher than those described to date, inducing a 2.0–3.0 log reduction in CFU in the lungs of immunized and challenged mice. Furthermore, histopathological analysis indicated considerable reduction in lung injury as compared to BCG.

On the other hand, in these models BCG is protective in adult mice, which does not reflect what is observed in adult humans, usually not protected by immunization with the BCG vaccine. Rook *et al.*³² have proposed that populations living in areas with higher burden of disease such as developing countries, may be exposed to differ-ent

conditions of infection, which may not be reproduced by our animal challenge models. They hypothesize that probably due to overcrowding and delayed treatment much of TB occurring is due to high-dose challenge, and thus higher challenge doses should be investigated³². Therefore, we have used a more stringent model, inoculating higher doses of the Mtb H37Rv strain in a challenge condition in which BCG is not protective. Under these challenge conditions, wild type BCG showed no protection in terms of lung colonization by Mtb when compared with control animals. Since rBCG-LTAK63_{lo} was more immunogenic and protective, it was used for further characterization. Animals immunized with the rBCG- LTAK63_{lo} construct, displayed 100% survival following the high-dose challenge with 10⁷ CFU up to 120 days after immunization, while both BCG and non-immunized animals had a fatality rate of 40%, probably due to non-controlled inflammation as observed by histopathology analysis (not shown). The fact that mice immunized with rBCG-LTAK63_{lo} show a strong immune response in

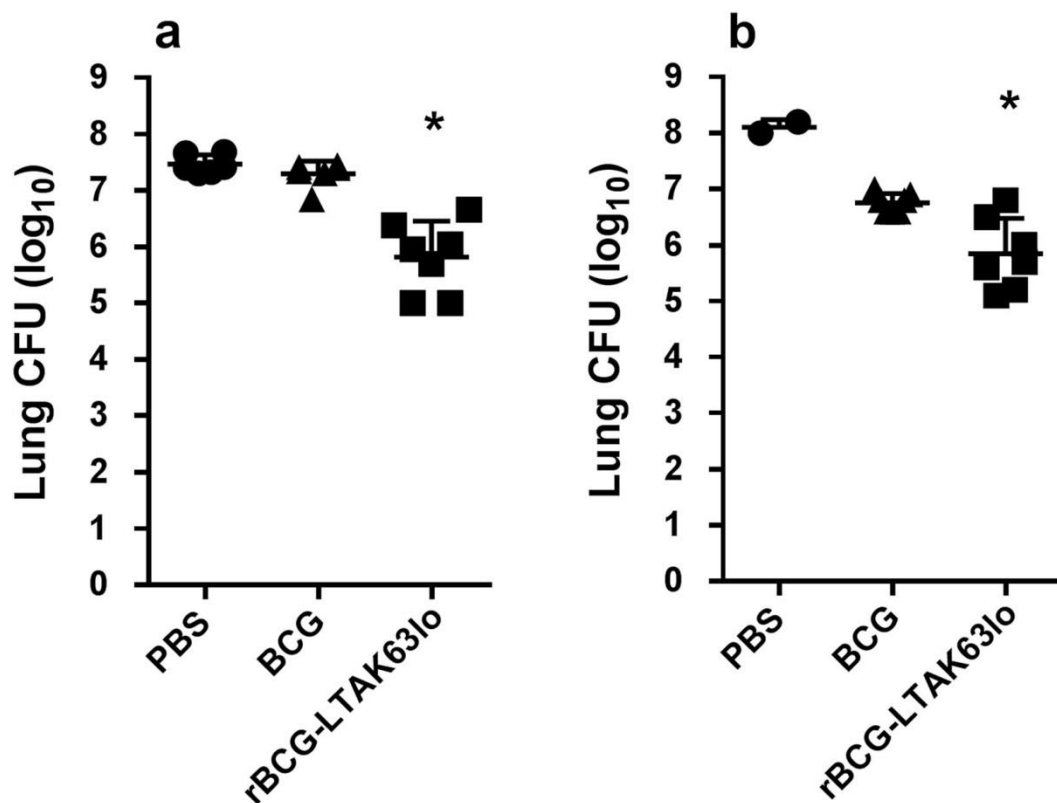


Figure 6. Protection induced by immunization with rBCG-LTAK631₀ against challenge with Mtb Beijing clinical isolate. BALB/c mice were immunized with BCG or rBCG-LTAK631₀ (1×10^6 CFU) and a group received PBS and they were challenged intratracheally 12 weeks later with a dose of Mtb Beijing clinical isolate (1×10^3 CFU). Bacteria were recovered from the lungs 30 days after challenge. (a) Experiment 1 ($n = 7$ animals) and (b) Experiment 2 ($n = 7$ animals). Bars represent mean \pm S.D. (*) Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$ as compared to the BCG group (one-way Anova).

the lungs at 60 days and significant protection at 90 days after immunization indicates induction of a long-term memory immune response. Induction of memory immune responses will be further investigated.

We investigated the immune response induced in the lungs of immunized animals after intratracheal challenge with 2 different challenge doses of Mtb, 10^5 CFU and 10^7 CFU. Mice that were immunized with rBCG-LTAK631₀ and challenged with the higher Mtb dose were shown to have a suppressive lung environment, with decreased levels of Th1 and IL-17 cytokines, as detected by real time PCR in the lungs, and a similar tendency was observed at the lower dose challenge. This effect seems to be regulated by TGF- β . This is contrary to what was observed in BCG-immunized animals. This cytokine has been shown to be up-regulated in inflammatory processes against bacterial infections³³. Furthermore, TGF- β has also been implicated in the inhibition of mycobacterial growth³⁴. Our results show that immunization with rBCG-LTAK631₀ induces a more intense Th1 response profile and IL-17 cytokine production in the lungs and suggests a mechanism of protection associated with limitation of the inflammatory response after challenge that prevents immunopathology. Whether it was the higher immune response or other mechanisms induced by the vaccine itself that triggered the regulatory response after infection is still to be determined. This regulatory response induced after challenge, with reduction in Th1 and inflammatory cytokines, is an effect that has not been observed with BCG or with other Mtb vaccine candidates.

Clinical Mtb isolates are useful to verify whether vaccine candidates can be effective towards MDR strains. Here we showed that rBCG-LTAK631₀ was protective against this hypervirulent Beijing strain, whereas BCG did not have any protective effect. Interestingly, it has been shown that BCG offers protection

against some Beijing strains, but not others, and the mechanisms are yet to be determined³⁵. The variability of virulence among Beijing strains could be crucial for effective host protection against Mtb infection mediated by BCG^{36, 37}. Furthermore, immunization with rBCG-LTAK63₁₀ induced a 1.0–2.0 log reduction in CFU of mice challenged with the Beijing strain as compared to BCG, which is lower than the 2.0–3.0 log reduction observed when mice are challenged with H37Rv, indicating that protection would be higher against the latter strain. It has been described that the mechanism of infection of H37Rv and Beijing strains can be different²⁷.

There are several strategies currently being pursued for the development of TB vaccines based on live mycobacterial strains (either recombinant BCG or attenuated *M. tuberculosis*)^{9, 38, 39}. Strategies based on BCG improvement by overexpression of MTB immunodominant antigens, such as Ag85B or the RD-1 locus, have been seriously considered for further development^{38, 40}. Phagosome-escape mutants incorporating Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* have been shown to be more effective in eliciting an immune response against TB,

progressing to Phase II clinical trials with promising results^{39, 41}. Recently, it has been shown that the deletion of *zmp1* gene from BCG improved protection in the guinea pig model of tuberculosis⁴². However, the lack of immune correlates of protection for MTB in validated animal models or in humans has hindered progress. Furthermore, the use of different immunization regimes and infection models has limited the comparison of protective efficacy between the different vaccine candidates. Nevertheless, considering the reduction in bacterial load recovered in the lungs after challenge, it is clear that rBCG-LTAK63_{lo} displays extremely high protection levels; some parameters support our conclusion: (1) the comparison with wild type BCG, (2) the histopathological analyses of the lungs after the challenge, which show preserved tissue even after a very high challenge dose and

(3) although the intratracheal challenge doses used are much higher than those used in aerosol challenges, the bacterial burden recovered from non-immunized and BCG control groups are comparable. This strain can be the basis for expression of other immunogenic TB antigens, in an attempt to further increase its protective properties. On the other hand, due to the high protection levels, it would be suitable for Systems Biology studies in search for much needed biomarkers of protection against TB⁴³.

The Geneva consensus in 2005 congregated the current experiences with live mycobacterial vaccines to identify essential steps in the development of new live TB vaccines⁴⁴. A set of quality and safety requirements were established to guide product development⁴⁴. The second Geneva Consensus in 2009 outlined regulatory requirements, manufacturing considerations and general criteria for clinical development towards Phase I, II and III trials⁴⁵. Both consider that it is essential to provide a complete characterization of the product and establish consistent protective efficacy in animal models. Here, we initiate the process, characterizing the immune response and protective efficacy of the rBCG-LTAK63_{lo} strain. Experiments to characterize the safety of the strain and the protective efficacy in other animal models in the aerosol challenge are underway.

In the current study, we have demonstrated the importance of promoter strength and level of expression of the LTK63 adjuvant derivatives expressed in recombinant BCG on the modulation of the immune response induced against mycobacteria. The superior immunogenicity and protection induced by this recombinant BCG strain against Mtb challenge revealed a novel mechanism of protection against pathology after infection.

Methods

Bacterial strains and Mtb challenge. The *Mycobacterium bovis* BCG Moreau strain (Instituto Butantan) was used to generate the recombinant BCG strains; *M. tuberculosis* H37Rv and Beijing clinical isolate 1471 were used in the challenge experiments (Supplementary Methods).

All animal experiments were performed according to Brazilian and international guidelines on animal experimentation and approved by the Ethics Committee at Instituto Butantan, São Paulo – SP (CEUAIB), (Permit Number 601/09). Mice were challenged by the intratracheal route with 1×10^5 CFU of Mtb per animal, as a dose previously established in the laboratory⁴⁶. Alternatively mice were challenged with a higher dose, 1×10^7 CFU of Mtb per animal, 60 or 90 days after a single immunization. Immunized mice were also challenged with 1000 CFU Beijing isolate, as previously described²⁷. Animals were euthanized 30, 60 or 120 days after the infection and the bacterial loads were determined by plating whole or partial lung homogenates on MB7H10/OADC agar plates.

Flow cytometry for cell-surface markers and intracellular cytokines.

Lung cells and/or splenocytes

(2×10^5) were isolated (Supplementary Methods) stimulated with CFP (5.0 µg/mL) for 12 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were then collected for intracellular cytokine staining with FITC, PE or PE-Cy7-conjugated monoclonal antibodies against CD4 and cytokines. The supernatant was collected for analysis by Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Diego, CA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit or by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD) and analyzed using the FlowJo 8.7 software.

Real-time reverse transcription- polymerase chain reaction (qPCR). Lung cell suspensions were recovered from immunized animals 30 days after challenge with Mtb. Total RNA was isolated using a Nucleospin

II kit, according to the manufacturer's directions (BD Biosciences). The mRNA was reverse transcribed using a ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA) for First-Strand cDNA Synthesis. Pre-designed gene expression and TaqMan Gene Expression Master Mix (Invitrogen) were used with the Applied Biosystems (Foster City, CA), 7300 Real-Time PCR apparatus. Target gene expression was normalized to GAPDH and actin levels.

Statistical analysis. Results were expressed as mean (\pm) SD of at least two independent experiments.

Significance of differences among groups was calculated by Student's *t* tests or ANOVA.

References

1. World Health Organization releases. 2015 global report on tuberculosis. *Breathe* **11**, 244–244 (2016).
2. Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R. & von Reyn, C. F. Tuberculosis. *The New England journal of medicine* **368**, 745–755, doi:[10.1056/NEJMr1200894](https://doi.org/10.1056/NEJMr1200894) (2013).
3. Aagaard, C., Dietrich, J., Doherty, M. & Andersen, P. TB vaccines: current status and future perspectives. *Immunol Cell Biol* **87**, 279–286, doi:[10.1038/icb.2009.14](https://doi.org/10.1038/icb.2009.14) (2009).
4. O'Garra, A. *et al.* The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology* **31**, 475–527, doi:[10.1146/annurev-immunol-032712-095939](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939) (2013).
5. Hokey, D. A. & Ginsberg, A. The current state of tuberculosis vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics* **9**, 2142–2146, doi:[10.4161/hv.25427](https://doi.org/10.4161/hv.25427) (2013).
6. Kaufmann, S. H. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. *Journal of internal medicine* **267**, 337–353, doi:[10.1111/j.1365-2796.2010.02216.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02216.x) (2010).
7. Sweeney, K. A. *et al.* A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **17**, 1261–1268, doi:[10.1038/nm.2420](https://doi.org/10.1038/nm.2420) (2011).

8. Gupta, U. D., Katoch, V. M. & McMurray, D. N. Current status of TB vaccines. *Vaccine* **25**, 3742–3751, doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.112 (2007).
9. Arbues, A. *et al.* Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated M. tuberculosis-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* **31**, 4867–4873, doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.051 (2013).
10. Lowrie, D. B. *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* **400**, 269–271, doi:10.1038/22326 (1999).
11. Wang, C. C., Zhu, B., Fan, X., Gicquel, B. & Zhang, Y. Systems approach to tuberculosis vaccine development. *Respirology* **18**, 412–420, doi:10.1111/resp.12052 (2013).
12. Kaufmann, S. H. Tuberculosis vaccine development at a divide. *Current opinion in pulmonary medicine* **20**, 294–300, doi:10.1097/MCP.0000000000000041 (2014).
13. Abebe, F. & Bjune, G. The protective role of antibody responses during Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical and experimental immunology* **157**, 235–243, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03967.x (2009).
14. Douce, G. *et al.* Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from Escherichia coli are able to act as oral adjuvants. *Infection and immunity* **67**, 4400–4406 (1999).
15. Pizza, M. *et al.* Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine* **19**, 2534–2541, doi:10.1016/S0264-410x(00)00553-3 (2001).
16. Nascimento, I. P. *et al.* Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live Bordetella pertussis in mice. *Infection and immunity* **68**, 4877–4883, doi:10.1128/iai.68.9.4877-4883.2000 (2000).
17. Miyaji, E. N. *et al.* Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing CRM(197), a mutant diphtheria toxin. *Infection and immunity* **69**, 869–874, doi:10.1128/IAI.69.2.869-874.2001 (2001).
18. Mazzantini, R. P. *et al.* Adjuvant activity of Mycobacterium bovis BCG expressing CRM197 on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* **22**, 740–746, doi:10.1016/j.vaccine.2003.08.017 (2004).
19. Christ, A. P. *et al.* Enhancement of Th1 lung immunity induced by recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin attenuates airway allergic disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **43**, 243–252, doi:10.1165/rcmb.2009-0040OC (2010).
20. Chade, D. C. *et al.* Immunomodulatory effects of recombinant BCG expressing pertussis toxin on TNF-alpha and IL-10 in a bladder cancer model. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* **27**, 78, doi:10.1186/1756-9966-27-78 (2008).
21. Andrade, P. M. *et al.* The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen SIPT in the intravesical treatment of bladder cancer. *Urol Oncol* **28**, 520–525, doi:10.1016/j.urolonc.2008.12.017 (2010).
22. Marinaro, M. *et al.* Mucosal delivery of the human immunodeficiency virus-1 Tat protein in mice elicits systemic neutralizing antibodies, cytotoxic T lymphocytes and mucosal IgA. *Vaccine* **21**, 3972–3981, doi:10.1016/S0264-410X(03)00295-0 (2003).
23. Dietrich, J. *et al.* Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with Mycobacterium tuberculosis and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. *J Immunol* **177**, 6353–6360, doi:10.4049/jimmunol.177.9.6353 (2006).
24. Badell, E. *et al.* Protection against tuberculosis induced by oral prime with Mycobacterium bovis BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN-gamma producing T-cells. *Vaccine* **27**, 28–37, doi:10.1016/j.vaccine.2008.10.034 (2009).
25. Barnett, S. W. *et al.* Protection of macaques against vaginal SHIV challenge by systemic or mucosal and systemic vaccinations with HIV-envelope. *Aids* **22**, 339–348, doi:10.1097/QAD.0b013e3282f3ca57 (2008).
26. Lewis, D. J. *et al.* Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of Escherichia coli heat labile toxin. *PLoS one* **4**, e6999, doi:10.1371/journal.pone.0006999 (2009).
27. Amaral, E. P. *et al.* Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS pathogens* **10**, e1004188, doi:10.1371/journal.ppat.1004188 (2014).
28. Zarate-Blades, C. R. *et al.* Evaluation of the overall IFN-gamma and IL-17 pro-inflammatory responses after DNA therapy of tuberculosis. *Human vaccines & immunotherapeutics* **9**, 1093–1103, doi:10.4161/hv.23417 (2013).
29. Dhar, N., Rao, V. & Tyagi, A. K. Skewing of the Th1/Th2 responses in mice due to variation in the level of expression of an antigen in a recombinant BCG system. *Immunol Lett* **88**, 175–184, doi:10.1016/S0165-2478(03)00043-9 (2003).
30. Weiner, J. 3rd & Kaufmann, S. H. Recent advances towards tuberculosis control: vaccines and biomarkers. *Journal of internal medicine* **275**, 467–480, doi:10.1111/joim.12212 (2014).
31. Montagnani, C., Chiappini, E., Galli, L. & de Martino, M. Vaccine against tuberculosis: what's new? *BMC infectious diseases* **14** (Suppl 1), S2, doi:10.1186/1471-2334-14-S1-S2 (2014).
32. Rook, G. A., Hernandez-Pando, R. & Zumla, A. Tuberculosis due to high-dose challenge in partially immune individuals: a problem for vaccination? *The Journal of infectious diseases* **199**, 613–618, doi:10.1086/596654 (2009).
33. Vizzini, A., Di Falco, F., Parrinello, D., Sanfratello, M. A. & Cammarata, M. Transforming Growth Factor beta (CtTGF-beta) gene expression is induced in the inflammatory reaction of Ciona intestinalis. *Developmental and comparative immunology* **55**, 102–110, doi:10.1016/j.dci.2015.10.013 (2015).
34. L'Abbate, C. *et al.* TGF-beta-mediated sustained ERK1/2 activity promotes the inhibition of intracellular growth of Mycobacterium avium in epithelioid cells surrogates. *PLoS one* **6**, e21465, doi:10.1371/journal.pone.0021465 (2011).
35. Marcus, S. A., Steinberg, H. & Talaat, A. M. Protection by novel vaccine candidates, Mycobacterium tuberculosis Delta mosR and Delta echA7, against challenge with a Mycobacterium tuberculosis Beijing strain. *Vaccine* **33**, 5633–5639, doi:10.1016/j.vaccine.2015.08.084 (2015).
36. Lasunskaja, E. *et al.* Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes and infection/Institut Pasteur* **12**, 467–475, doi:10.1016/j.micinf.2010.02.008 (2010).
37. Andrade, M. R. M. *et al.* Pathogenic Mycobacterium bovis strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *Bmc Microbiol* **12**, 166, doi:10.1186/1471-2180-12-166 (2012).
38. Hoft, D. F. *et al.* A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *The Journal of infectious diseases* **198**, 1491–1501, doi:10.1086/592450 (2008).
39. Hess, J. *et al.* Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of Listeria monocytogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5299–5304, doi:10.1073/pnas.95.9.5299 (1998).

40. Pym, A. S. *et al.* Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* **9**, 533–539, doi:[10.1038/nm859](https://doi.org/10.1038/nm859) (2003).
 41. Loxton, A. G. *et al.* Safety and Immunogenicity of the Recombinant Mycobacterium bovis BCG Vaccine VPM1002 in HIV-Unexposed Newborn Infants in South Africa. *Clinical and vaccine immunology: CVI* **24**, doi:[10.1128/CVI.00439-16](https://doi.org/10.1128/CVI.00439-16) (2017).
 42. Sander, P. *et al.* Deletion of *zmp1* improves Mycobacterium bovis BCG-mediated protection in a guinea pig model of tuberculosis. *Vaccine* **33**, 1353–1359, doi:[10.1016/j.vaccine.2015.01.058](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.058) (2015).
 43. Berry, M. P., Blankley, S., Graham, C. M., Bloom, C. I. & O'Garra, A. Systems approaches to studying the immune response in tuberculosis. *Current opinion in immunology* **25**, 579–587, doi:[10.1016/j.coi.2013.08.003](https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.08.003) (2013).
 44. Kamath, A. T. *et al.* New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. *Vaccine* **23**, 3753–3761, doi:[10.1016/j.vaccine.2005.03.001](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.001) (2005).
-

45. Walker, K. B. *et al.* The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine* **28**, 2259–2270, doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.083 (2010).

46. Morais Fonseca, D. *et al.* Experimental tuberculosis: designing a better model to test vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **90**, 135–142, doi:10.1016/j.tube.2010.01.005 (2010).

Acknowledgements

We acknowledge the support from Fundação Butantan and fellowships from FAPESP to I.P.N. and C.C.S. We thank Vania L.D. Bonato for advice and suggestions on immune response experiments.

Author Contributions

I.P.N. constructed vectors and bacterial strains, contributed to the design of most experiments, analyzed and interpreted data. D.R. performed and contributed to the design of most experiments on the evaluation of immune response. H.K.R. and C.C.S. performed and designed experiments of RT-PCR. A.P.P.-K. analyzed the histopathology samples. E.D.C.G., C.L.S., C.C.S. and I.P.N. carried out infection and challenge experiments and analyzed data. E.P.A., M.R.D.L. and M.H.H. designed and performed the experiments with the Beijing strain. N.W. and B.G. contributed to the conceptual design of expression vectors, especially promoters and analysis of data. K.H.G.M., M.P. and R.R. contributed to the conceptual design of the bacterial strains, especially the adjuvant contribution and analysis of data. L.C.C.L. contributed to the conceptual design of the project and the design of most experiments, analyzed and interpreted data. I.P.N., D.R., H.K.R., C.C.S., A.P.P.-K., N.W., B.G., K.H.G.M., M.P., R.R. and L.C.C.L. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02003-9

Competing Interests: I.P.N. and L.C.C.L. have a patent application involving the rBCG-LTK63 and rBCG-LTKA63 strains use as MTB vaccines. M.P. and R.R. are GlaxoSmithKline employees.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Cre-

ative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

