



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

BRUNO DE PAULA OLIVEIRA SANTOS

**Avaliação do adjuvante Advax na formulação de vacina de
subunidade proteica contra *Mycobacterium tuberculosis***

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

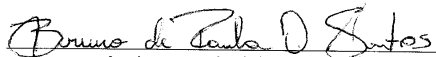
Nome completo do autor: Bruno de Paula Oliveira Santos

Título do trabalho: Avaliação do adjuvante Advax na formulação de vacina de subunidade proteica contra *Mycobacterium tuberculosis*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (ã)

Data: 16 / 03 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

BRUNO DE PAULA OLIVEIRA SANTOS

Avaliação do adjuvante Advax na formulação de vacina de subunidade proteica contra *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Ana Paula Junqueira-Kipnis
Coorientador: André Kipnis

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através
do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da
UFG.

de Paula Oliveira Santos, Bruno

Avaliação do adjuvante Advax na formulação de vacina de
subunidade proteica contra Mycobacterium tuberculosis
[manuscrito] / Bruno de Paula Oliveira Santos. - 2017.
110 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis; co-orientador
Dr. André Kipnis.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP),
Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde
Pública, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras.

1. Vacina. 2. Tuberculose. 3. Advax. I. Junqueira-Kipnis, Ana
Paula, orient. II. Título.

CDU 612.017



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE BRUNO DE PAULA OLIVEIRA SANTOS – Aos dez dias do mês de março do ano de 2017 (10/03/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS, IRMTRAUT ARACI HOFFMANN PFRIMER e JULIANA REIS MACHADO E SILVA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DO ADJUVANTE ADVAX NA FORMULAÇÃO DE VACINA DE SUBUNIDADE PROTEICA CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS”**, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **IMUNOLOGIA**, de autoria de **BRUNO DE PAULA OLIVEIRA SANTOS**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. **ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis

Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer

Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva

Aprovado / Reprovado

APROVADO

APROVADO

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato A PROVADO, (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **IMUNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 10 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer (PUC/GO)

Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva (IPTSP/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Kariny Vieira Soares e Silva

Assinatura

[Assinatura]
Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer
Juliana Reis Machado e Silva
[Assinatura]

AGRADECIMENTOS

Preciso começar essa carta, agradecendo primeiramente a Deus por ter me auxiliado nesses 19 anos de estudos e por todas as coisas boas que isso tem me proporcionado. Aprendi com Ele que nossas escolhas nem sempre são fáceis, mas que devemos persistir para atingir nossos objetivos. Sei que posso contar com o Senhor para meus futuros passos e que não preciso temer.

A primeira vez que eu escrevi essa carta foi para o meu trabalho de conclusão de curso. Eu agradeci aquela vez, mas não posso deixar de agradecer meus pais por todo o apoio. Deus sabe que eu só consegui tudo que eu tenho hoje graças a eles. Dedico essa dissertação à minha mãe, Mirian de Oliveira, e ao meu pai, Alaésio Antônio dos Santos. Não tem sido fácil, mas dias melhores virão. E tudo o que eu quero é poder retribuir o esforço à altura.

Por ter me tirado do mundo comum e me ingressado na carreira científica, quero agradecer à Prof^a Dr^a Ana Paula Junqueira-Kipnis. A senhora foi, e ainda é, peça fundamental no meu crescimento profissional. Agradeço pelo tempo que dedicou para me ensinar, corrigir meus trabalhos e instigar o espírito científico, mesmo tendo diversos compromissos. Sei que isso não é tarefa fácil, então me sinto lisonjeado pela oportunidade de aprender com a senhora. Aproveito a oportunidade para pedir desculpas se a desapontei em algum momento, mas saiba que nunca foi com más intenções. Espero ter contribuído com o laboratório e saiba que sempre terei boas lembranças dos dias que passei aqui. Ao professor André Kipnis, obrigado pelos momentos de ensinamento e pela paciência em conferir nossas contas (risos).

Uma parte desse trabalho, teve ajuda essencial da Prof^a Dr^a Mara Rúbia Nunes Celes, por ter contribuído com toda a parte de histologia dessa dissertação. A senhora teve muita paciência em sentar comigo, me ajudar a analisar lâminas, marcar reuniões semanais e dispor de seu tempo acadêmico. Sou muito grato por toda a ajuda e contribuição. Agradeço também a contribuição da banca de qualificação, as professoras Juliana Reis, Patrícia Nagib e Maria Cláudia. Cada comentário foi considerado na versão da dissertação para correção da banca da defesa. E também aos membros da banca de defesa, professora Ana Paula Kipnis, professora Irmtraut Araci, e novamente à professora Juliana Reis, como memória.

Esse trabalho não teria saído sem a ajuda da Monalisa Martins Trentini. Obrigado por se dispor a me ajudar com toda a parte experimental e por me ensinar o que aprendeu em todos esses anos de prática. Seu companheirismo e amizade foram essenciais para mim nesses anos de Mestrado. Nunca deixe que ninguém te faça sentir menos do que especial. A gente aprende e vive melhor escutando aqueles que querem nosso bem, não aqueles que tem inveja da gente. Lembre-se sempre de quão importante de você é para este laboratório e, mais ainda, para as pessoas que nele convivem. Você merece conseguir tudo aquilo que você sonha. E muito mais.

Nessa jornada, tive o apoio do pessoal do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas e de Bacteriologia Molecular. Tatiana Marlene Gálvez Sánchez, obrigado pelo companheirismo e pelas palavras de apoio nas horas difíceis. Nosso laboratório não seria o mesmo sem você. Prof^a Dr^a Adeliane Castro da Costa, você é especial para mim desde a iniciação científica e espero que você seja sempre assim: determinada, esforçada e inteligente. Danilo Pires Resende, você sempre me ajudou quando eu precisei, então obrigado por todo o apoio nesses anos de laboratório. Aline Machado, espero ter contribuído um pouco no seu crescimento acadêmico e me desculpe se não fui capaz de te ajudar mais. Espero que seu espírito científico só aumente com o tempo e que você seja uma Biomédica de muito sucesso. Lázaro Moreira Marques Neto, obrigado pelos pratos deliciosos que você cozinhou para a gente, mas ainda me deve um chaveiro de Maceió. Stella Franczy, obrigado pela amizade, pelos momentos de apoio e desabafo. Victor Procópio, Vanessa Sampaio, Ítalo Dorotheio, obrigado pela ajuda no laboratório. Rogério Neves, Rayanny Gomes, Rafaela Alves, Luma Fernandes, Eni Buma, Petain, obrigado pelo apoio no laboratório de Bacteriologia Molecular.

Algumas pessoas passaram pelo laboratório nesse período. Não posso deixar de agradecer à Carolina Eto, Puteri Anissatun, Adrielle Zigmignan e Danilova Sofia. Que eu tenha oportunidade de revê-las. Um agradecimento a equipe que torna o trabalho no IPTSP possível: Zezinho, Kariny, Zhara, Seu Fernando, Valéria, Zoraide, Iraci, Marco, Prof^a Dr^a Flávia e Prof^a Dr^a Delair.

Nos momentos de equilíbrio e de desespero, os amigos são essenciais nessa jornada. Pedro Henrique, obrigado por escutar meus relatos diários sobre minhas experiências no laboratório, me aconselhar e me ajudar a seguir em frente. Nunca saberei agradecer o suficiente por quanto você foi essencial nesse processo. Beatriz Oliveira, você foi parte do Laboratório de Bacteriologia Molecular, mas mesmo

partindo, se manteve amiga. Obrigado por tudo. Aos amigos, Andressa Caiado, Amanda Freitas, Bruna Daniela, Ludmilla Fernandes, Roberta Reila, Priscilla Castro, Paulianne Lima. Os melhores amigos do mundo. “Era uma pessoa igual a cem mil outras pessoas. Mas eu fiz dela um amigo, agora ela é única no mundo”.

SUMÁRIO

FIGURAS E ANEXOS.....	vii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
4 MÉTODOS	18
4.1 Ética.....	18
4.2 Animais	18
4.3 Construção da CMX e da ECMX.....	18
4.4 Produção da CMX e da ECMX.....	18
4.5 Preparação Vacinal.....	19
4.6 Vacinação	19
4.7 Análise dos Linfonodos.....	20
4.8 Coleta de sangue	21
4.9 Dosagem de anticorpos	21
4.10 Desafio	21
4.11 Resposta Imune Específica contra rCMX/rECMX no Pulmão e no Baço.....	22
4.12 Histopatologia	22
4.13 Análise Estatística	22
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	54

7 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética.....	73
ANEXO II – Comprovante de Submissão do artigo.....	77

FIGURAS E ANEXOS

Figura 1 – Desenho experimental.....	20
Figura 2 – As formulações contendo Advax não induzem inflamação local.....	25
Figura 3 – As formulações Advax3 e Advax4 contendo CMX são capazes de ativar células endoteliais nos linfonodos drenantes.....	27
Figura 4 – Resposta Imune Humoral (IgG1) anti-CMX induzida por formulações vacinais contendo CMX.....	29
Figura 5 – Resposta Imune Humoral (IgG2a) anti-CMX induzida por formulações vacinais contendo CMX.....	30
Figura 6 – Razão entre os níveis de IgG2a e IgG1 após cada uma das vacinações.....	31
Figura 7 - Resposta imune específica celular induzida pelas formulações vacinais 45 dias após o desafio.....	33
Figura 8 – Células CD4 ⁺ IL-17 ⁺ induzidas por estimulação <i>ex vivo</i> com rCMX.....	35
Figura 9 – Resposta imune específica celular induzida pelas formulações vacinais 90 dias após o desafio com Mtb.....	37
Figura 10 – Histopatológico representativo do pulmão de camundongos BALB/c 45 dias após o desafio com Mtb.....	40
Figura 11 – Histopatológico representativo do pulmão de camundongos BALB/c 90 dias após o desafio com Mtb.....	43

Figura 12 – Carga bacilar em camundongos BALB/c previamente vacinados e desafiados com H37Rv.....	45
Figura 13 – Curva de Mortalidade.....	46
Figura 14 – Resposta imune humoral (IgG2a e IgG1) anti-ECMX induzida durante a vacinação.....	48
Figura 15 – Resposta imune específica celular induzida por Advax4 + ECMX 45 dias após o desafio.....	50
Figura 16 – Histopatológico representativo de pulmão de camundongos BALB/c 45 dias após a infecção.....	52
Figura 17 – Carga bacilar em camundongos BALB/c 45 dias após o desafio com Mtb.....	53
Quadro 1 – Resumo dos resultados.....	53
Anexo I – Parecer do Comitê de Ética.....	73
Anexo II – Manuscrito.....	77

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

7H11 – Meio ágar para cultura de *Mycobacterium tuberculosis* com adição caseína

7H9 – Meio líquido para cultura de espécies de *Mycobacterium*

Advax™ - Adjuvante derivado da Delta inulina

AG – Arabinogalactana

Ag85c – Antígeno 85 C

AP-1 – Fator de transcrição Proteína Ativadora 1 (Do inglês *Activator Protein 1*)

APC – Aloficocianina (Do inglês *Allophycocyanin*)

APC – Célula Apresentadora de Antígeno (Do inglês *Antigen-Presenting Cell*)

AS03 – Sistema Adjuvante 03 (Do inglês *Adjuvant System 03*)

BCG – Bacille Calmette-Guérin

BEC – Células Endoteliais Vasculares Sanguíneas (Do inglês *Blood Vascular Endothelial Cells*)

CCL – Ligante de quimiocina com motivos C-C (Do Inglês *Chemokine (C-C motif ligand)*)

CD4 – Células do grupo de diferenciação 4 (Do inglês *Cluster of differentiation 4*)

CD8 – Células do grupo de diferenciação 8 (Do inglês *Cluster of differentiation 8*)

CFS3 – Fator Estimulador de Colônia 3 (Do inglês *Colony Factor Stimulator 3*)

CMX – Proteína recombinante contendo epítomos imunodominantes do HspX, MPT51 e Ag85c;

ConA – Concanavalina A

CpG-DNA – DNA contendo dinucleotídeos motivos de Citosina e Guanina não-metilados

CXCL5 – Quimiocina de motivos C-X-C 5 (Do inglês *C-X-C motif chemokine 5*)

DC – Células Dendríticas (Do inglês *Dendritic Cells*)

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (Do inglês *Fluorescein isothiocyanate*)

H37Rv – Cepa de *Mycobacterium tuberculosis*

HE – Hematoxilina – Eosina

HEPLISAV – Vacina contra Hepatite B

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida (Do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)

HspX – Proteína de choque térmico X (Do inglês *Heat Shock Protein X*)

IFN- γ – Interferon-gamma

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IPTG – Isopropil beta-D-1-tilgalactopiranosídeo (Do inglês *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*)

KO – Nocaute (Do inglês *Knockout*)

LAM – Lipoarabinomanana

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (Do inglês *Low-density lipoprotein*)

LECs – Células Endoteliais Linfáticas (Do inglês *Lymphatic Endothelial Cells*)

MDR – Multidroga resistente

MF59 – Adjuvante utilizado em vacina contra Influenza derivado do óleo natural Esqualeno.

MPT51 – Proteína do *Mycobacterium tuberculosis* 51

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B (Do inglês *Nuclear Factor κ B*)

NK – Células Assassinas Naturais (Do inglês *Natural Killer cells*)

NKT – Células Assassinas Naturais T (Do inglês *Natural Killer T cells*)

NLRP3 – Receptor do tipo *Nod* contendo domínio Pirina 3 (Do inglês *Nod Like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3*)

NO – Óxido Nítrico (Do inglês *Nitric Oxid*)

OADC – Ácido Oleico Dextrose Catalase

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados ao patógeno (Do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*)

PBS – Tampão Fosfato Salina (Do inglês *Phosphate Buffer Solution*)

PDIM – Fitiocerol dimicocerosados (Do inglês *Phthiocerol Dimycocerosate*)

PE – Ficoeritrina (Do inglês *Phycoerythrin*)

PercP – Peridina Clorofila (Do inglês *Peridinin chlorophyll*)

PMN – Células Polimorfonucleares

RD – Região de Diferenciação

RSV – Vírus Respiratório Sincicial (Do inglês *Respiratory Syncytial Virus*)

SARS-Cov – Coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Severa (Do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus*)

TB – Tuberculose

T-bet – Fator de Transcrição T-box expresso em células Th1

TGF- β – Fator de Crescimento Tumoral β (Do inglês *Tumoral Growth Factor β*)

Th1 – Célula T auxiliar 1 (Do inglês *T helper cell 1*)

Th17 – Célula T auxiliar 17 (Do inglês *T helper cell 17*)

TLR – Receptor do tipo *Toll* (Do inglês *Toll Like Receptors*)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa (Do inglês *Tumoral Necrosis Factor α*)

Tregi – Células T reguladoras induzidas

UFC – Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

Tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A única forma de prevenção é a vacina BCG. Entretanto, essa vacina tem eficácia variável em diferentes populações e não protege indivíduos adultos. O objetivo desse trabalho foi desenvolver novas formulações vacinais de subunidade proteica testando um novo adjuvante: Advax e duas proteínas de fusão recombinante: CMX e ECMX. Foram utilizados três adjuvantes: Advax3, Advax4 e CpG-DNA. Primeiro foram testadas formulações vacinais contendo CMX. Camundongos BALB/c foram separados em grupos que receberam 3 doses de vacinas de subunidade proteica, além dos grupos controles (Salina, BCG, CMX, Advax3 e Advax4). Foram avaliadas as lesões induzidas no local da inoculação e os linfonodos drenantes. As vacinas estimularam aumento da celularidade no local da inoculação e conseguiram ativar células endoteliais vasculares e linfáticas nos linfonodos drenantes. Após a primeira dose, os camundongos vacinados com Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e CpG-DNA + CMX geraram resposta imune humoral do tipo IgG2a. Após a segunda dose, os camundongos vacinados com as formulações citadas também induziram resposta do tipo IgG1. As vacinas BCG, Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e CpG-DNA + CMX induziram respostas do tipo Th1 específicas tanto no baço quanto no pulmão. Entretanto, a resposta celular do tipo Th17 não foi observada. Nos cortes histológicos, foi possível observar que a formulação Advax4+CMX conseguiu reduzir o infiltrado inflamatório e manter a arquitetura tecidual. As formulações Advax3 + CMX e Advax4 + CMX conseguiram prolongar a sobrevida dos animais, mas nenhuma das vacinas, exceto a BCG, conseguiu reduzir a carga bacilar nos pulmões dos camundongos infectados. Utilizando Advax4 + ECMX observou-se o mesmo tipo de resposta imune celular e humoral que culminou com redução da carga bacilar do *Mycobacterium tuberculosis*. As formulações vacinais desenvolvidas são imunogênicas e a formulação vacinal contendo Advax4 + ECMX apresentou melhor eficácia e poderá ser testada como um candidato a vacina contra tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused mainly by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. The only way to prevent is to vaccinate with BCG, an attenuated *Mycobacterium bovis* strain. However, the vaccine has variable efficacy in different people and it does not protect adults. The aim of this study was to develop new subunit vaccine formulations, evaluating a new adjuvant: Advax and two recombinant fusion proteins: CMX and ECMX. To formulate the subunit vaccines three adjuvants were used: the Advax3, Advax4 and CpG-DNA. First we addressed the CMX protein. BALB/c mice were separated in experimental groups that received 3 doses of the vaccines, besides the control groups (Saline, BCG, CMX, Advax3 and Advax4). The vaccines induced increase the local inflammatory response and they were able to activate blood and lymphatic endothelial cells on draining lymph nodes. After the first dose, the mice vaccinated with Advax3 + CMX, Advax4 + CMX and CpG-DNA + CMX generate IgG2a humoral immune response. After the second dose, the vaccinated mice also induced an IgG1 response. After challenging with *M. tuberculosis* and after 45 days, the vaccines BCG, Advax3 + CMX, Advax4 + CMX and CpG-DNA + CMX showed specific Th1 responses. However, the Th17 cellular response was not observed. Evaluating the lung lesions induced by the infection, Advax4 + CMX group presented reduced inflammatory cell infiltrate and maintenance on the pulmonary architecture. The vaccines Advax3 + CMX e Advax4 + CMX were able to extend the animals life, but none, except the BCG, were able to reduce the bacillary load on the lungs of infected mice, forty five or ninety days after the challenge. To improve the vaccine, ECMX was tested with Advax4. This vaccine showed similar humoral and cellular responses and reduced *M. tuberculosis* bacillary load. The vaccine formulations developed were immunogenic and the formulations containing Advax4 + ECMX were more effective and may be tested as vaccine against tuberculosis.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em humanos. Noventa por cento da população infectada por Mtb não apresenta a doença ativa, mantendo o bacilo em granulomas em um estado não replicativo ou de baixa proliferação, conhecido por estado de latência. Esse estado permite uma exposição contínua aos antígenos do Mtb, responsável pela manutenção de resposta imunológica efetora frente ao Mtb (ANDERSEN; WOODWORTH, 2014).

A infecção por Mtb é iniciada seguindo a inalação de aerossóis contendo um baixo número de bacilos. Uma vez no pulmão, a bactéria é internalizada por macrófagos alveolares. Entretanto, apenas 10% dos pacientes infectados desenvolvem a doença ativa, e nos indivíduos cujo sistema imune é considerado saudável, a resposta imune é suficiente para manter o Mtb em um estado não replicativo (WHO, 2016). Pacientes co-infectados com Mtb e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam riscos maiores de desenvolver a doença ativa. Por exemplo, ao eliminar células T CD4+, o HIV promove a quebra da barreira que impede o espalhamento do bacilo, denominado granuloma, e a infecção em indivíduos com TB latente tende a se reativar (PAWLOWSKI et al., 2012).

As manifestações clínicas são variadas, chamando atenção a febre moderada por mais de 15 dias, tosse, perda de peso e sudorese noturna. A hemoptise atualmente é rara. A suspeita de TB, vem de casos de pneumonia que não são tratados com antibióticos para gram positivos e negativos (TUBERCULOSE, 2004). O diagnóstico radiográfico que é sugestivo de TB são adenomegalias hilares, paratraqueais e pneumonia de evolução lenta (SANT'ANNA, 2006).

1.2 Epidemiologia

As taxas estimadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 10,4 milhões de novos casos de TB em 2015, e 1,4 milhão de mortes ocorreram ao redor do mundo. Em 2015 foram estimados 1,2 milhão de novos casos de TB em pacientes HIV-positivos (12% do total de casos de TB). Na África encontravam-se 75% dos pacientes com TB e HIV-positivos. Na Europa a taxa de incidência é de 20 casos/100.000 pacientes e de 356 casos/100.000 habitantes a cada ano (WHO, 2016). Pacientes com Diabetes melito têm duas vezes mais chances que pacientes saudáveis de adquirir TB, associação que aumenta em sujeitos HIV-positivos (FAURHOLT-JEPSEN et al., 2011).

De acordo com Bergonzoli et al. (2016), atualmente existe mais TB no mundo do que em qualquer outro tempo. Em 1993, quando eram estimados 7-8 milhões de casos e 1,3 – 1,6 milhão de mortes ocorrendo anualmente, a OMS declarou que a TB é uma epidemia de impacto global. Em 2010, os números foram maiores, com uma estimativa 8,5-9,2 milhões de casos e 1,2-1,5 milhões de morte anualmente, incluindo aqueles coinfectados HIV. A mortalidade da TB caiu 47% desde 1990 até 2014 (WHO, 2015), sendo que as medidas aplicadas nos países em desenvolvimento para prevenção e tratamento da doença salvaram 43 milhões de vidas entre 2000 a 2014. Apesar das melhorias, algumas populações humanas são mais vulneráveis à doença como os indígenas nos países da América Latina, que inclusive apresentam número elevado de casos de TB causada por bacilo multidrogarresistente (MDR) (BERGONZOLI et al., 2016).

No Brasil, foram registrados 68.000 novos casos de TB em 2015. A taxa de incidência foi de 33,6 para cada 100 mil habitantes para todas as formas de TB. Dos casos novos, 10,1% eram coinfectados TB-HIV. Foram diagnosticados 503 casos novos de TB MDR no mesmo ano (SINAN/SES, 2016). Na região centro-oeste, os maiores coeficientes de mortalidade por TB estão registrados no Mato-Grosso e Mato-Grosso do Sul, entre 1990 e 2015. Goiás e o Distrito Federal estão logo abaixo. Em 2015 foram registrados 950 novos casos de TB em Goiás, ficando atrás apenas do Mato Grosso, com 1175 casos novos da doença (SINAN/SES, 2016). O coeficiente de mortalidade em Goiás foi de 1,1, o Distrito Federal 0,5, o Mato Grosso 2,2 e o Mato Grosso do Sul 1,9, respectivamente.

1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

O bacilo Mtb é um patógeno cuja existência é mais longa que a do ser humano, sendo datado a mais de 70.000 anos (COMAS et al., 2013). Sua composição inclui uma camada mais interna de membrana plasmática, comum a maioria das bactérias. Logo abaixo, tem uma camada massiva de parede celular composta por peptídeoglicano covalentemente ligado à um heteropolissacarídeo arabinogalactano (AG) finalizados em cadeias de ácido micólico (HOFFMANN et al., 2008). O peptídeoglicano está situado fora da membrana plasmática, com uma estrutura semelhante a uma malha, o que confere sua rigidez. A rigidez da parede permite manter integridade celular frente a alta pressão osmótica. O peptídeoglicano micobacteriano forma uma camada basal do complexo micolil-arabinogalactana-peptídeoglicano e é composto por unidades de N-acetilglucosaminas alternantes e resíduos de ácido murâmico modificados, ligado em configuração $\beta(1\rightarrow4)$ (ALDERWICK et al., 2015).

Os lipídeos da parede celular constituem aproximadamente 40% da massa seca celular, apesar dessa porcentagem poder variar dependendo da espécie ou isolado, além das condições de crescimento. Diversos componentes lipídicos de Mtb (ex: lipídeos isoprenoides, glicerofosfolipídeos, lipoarabinomanana, ácidos micólicos, fosfatidilinositol manosídeos e micolatos trealose) são produzidos por todas as espécies de micobactérias. Lipídeos de cadeia longa, como ácidos graxos de ramo polimetil, não são essenciais para o crescimento mas são únicos em micobactérias e tem sido envolvidos em sua patogênese (JACKSON, 2014). Cerca de 99 genes de lipoproteínas estão presentes no genoma de Mtb. Elas estão presentes na membrana plasmática ou na membrana externa, com funções como transporte de nutrientes, exportação de drogas, homeostasia da parede celular e adesão à células do hospedeiro (BECKER; SANDER, 2016).

Fitiocerol dimicocerosados (PDIMs) são lipídeos localizados na membrana externa de Mtb e que tem papel na virulência do bacilo, ao impedir a acidificação do fagossoma, ao alterar as propriedades físico-químicas do citosol dos macrófagos (ASTARIE-DEQUEKER et al., 2009). Estes lipídeos são responsáveis por mascarar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ativadores de TLR em Mtb, impedindo o recrutamento de macrófagos ativados para o local e possível destruição do patógeno (CAMBIER et al., 2014).

Uma hipótese para as modificações N-glicolil é de que esses resíduos adicionais têm o potencial para adicionar pontes de hidrogênio, tornando mais forte a estrutura

semelhante a malha da camada de peptídeoglicano, além de proteger a bactéria contra a ação dos lisossomos (ALDERWICK et al., 2015). Os resíduos de ácido murâmico atuam como domínios de ligação para domínios de arabinogalactana, onde o 6-OH de alguns resíduos de ácido murâmico formam uma ligação fosfodiéster e são ligados à α -L-ramnopiranos-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GlcNAc (1 $\rightarrow$ P) da arabinogalactana (McNEIL; DAFPE; BRENNAN, 1990).

Intercalado dentro deste meio lipídico, estão os lipídeos “livres” e lipoglicanos que tem intrigado pesquisadores por mais de oito décadas: os fosfatidilinositol manosídeos, ftiocerol dicomicocerosatos, glicolipídeos fenólicos, acetiltrealoses, lipoarabinomananas. Esses componentes formam a chamada “micomembrana”, uma bicamada altamente impermeável e assimétrica (HOFFMANN et al., 2008). Estudo realizado por Meroueh et al. (2006) utilizando ressonância magnética, mostraram que o peptídeoglicano está em uma conformação ortogonal ao plano da membrana, diferente daquela sugerida por Brennan e Nikaido (1995), onde a fração de peptídeoglicana e galactana estariam paralelas à membrana plasmática.

1.4 Aspectos imunopatológicos da Tuberculose

Mtb co-evoluiu para sobreviver e se adaptar às defesas do ser humano, sendo hoje um patógeno intracelular obrigatório. Entre os mecanismos desenvolvidos para sobreviver no interior das células eucarióticas ressalta-se o retardamento na geração de células T específicas ao Mtb. O tardamento da resposta começa ao impedir que os macrófagos alveolares, primeiras células que entram em contato com o patógeno, morram e, assim, os bacilos conseguem persistir nessas células por até sete dias (BEHAR, DIVANHAHI, REMOLD, 2010). Entre os mecanismos de patogenicidade ressalta-se o impedimento da maturação do fagossomo e de sua fusão com os lisossomos (VERGNE et al., 2004) e consequentemente prevenção da apresentação de antígenos, presença de componentes em sua parede celular que mascaram seus peptídeos antigênicos (STENGER; NIAZI; MODLIN, 1998); e pela modulação das vias de morte das células em que se instala (SRINIVASAN; AHLBRAND; BRIKEN, 2014).

Neutrófilos, células dendríticas (BLOMGRAN, 2012), monócitos (SAMSTEIN, 2013), células T $\gamma\delta$ e NK (KANG et al., 2011) migram para o local de infecção atraídos pela quimiocina CXCL5, expressa pelo epitélio pulmonar, quando o bacilo Mtb estimula a expressão de TLR2 pelas células locais. Os leucócitos atraídos pela CXCL5 passam a

expressar CXCR2 até chegar ao local da infecção, e assim fagocitam e transportam o patógeno para linfonodos drenantes pulmonares (ABADIE et al, 2005). Os leucócitos expressando CCR7 chegam aos linfonodos, que expressam CCL19 e CCL21, e o patógeno é transferido para células dendríticas locais não infectadas (SRIVASTAVA; ERNST, 2014). A transferência de Mtb das células migrantes para as células locais permite a geração de uma resposta específica eficiente, uma vez que as células migratórias não conseguem induzir boas respostas (SRIVASTAVA; ERNST, 2014).

No linfonodo, esses bacilos conseguem evitar a geração de células efectoras pela indução de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (REDFORD; MURRAY; O'GARRA, 2011), TGF- β (TOOSSI; ELLNER, 1998) e mediadores lipídicos como a lipoxina A4 (BAFICA et al., 2005). Esses fatores culminam na diferenciação de células T reguladoras induzidas (Tregi), 15 dias após a instalação inicial da infecção, que favorecem a replicação do Mtb, pois controlam a formação de linfócitos T efetores (URDAHL, 2014). Na quarta semana após o contato inicial com o patógeno, há uma redução da população de células Tregi e começa então a ser formada resposta de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ . Essas células aumentam a expressão de CXCR3 e CCR5 e adentram no parênquima pulmonar, formando os chamados folículos linfóides, compostos principalmente de células T CCR5⁺ (PITZALIS et al., 2014) que são atraídas pela CXCL13 produzida pelas células estromais do pulmão em contato com o Mtb.

O bacilo Mtb pode se disseminar para qualquer órgão através do sistema linfático e é comumente encontrado nos linfonodos. Lerner et al. (2016) observaram que as células endoteliais linfáticas (LECs), gp38⁺CD31⁺, são um nicho para o crescimento do Mtb em humanos, e que seu crescimento ocorre em grandes agregados nessas células. Esse crescimento é dependente da não ativação das LECs, uma vez que essas células ativadas inibem o crescimento bacteriano. LECs, por outro lado, demonstraram capacidade de armazenar antígenos virais e estimular células T, potencial alvo de estímulo vacinal (TAMBURINI; BURCHILL; KEDL, 2014).

No parênquima pulmonar, os linfócitos T CCR5⁺ são T-bet intermediários, IFN- γ^{low} (Th1), apresentam alta capacidade proliferativa e vida longa, no entanto, têm pouca capacidade de impedir o controle de Mtb. No processo inflamatório desenvolvido em resposta ao Mtb, os linfócitos T perivasculares são T-bet⁺, IFN- γ^{hi} , se proliferam muito pouco e têm vida curta (SAKAI et al.; 2014, REILEY et al.; 2010). Sabe-se que essas células devido à localização e a incapacidade de adentrar o parênquima pulmonar não apresentam efeito direto sobre Mtb (URDAHL, 2014). Este fato, contribui para a

incapacidade de controlar a infecção, que culminará com a formação de um granuloma (ZUMLA et al., 2013). Entretanto, as células Th1 parênquimais apresentam ação direta contra o Mtb, enquanto as células Th1 vasculares, incapazes de adentrar no parênquima, não apresentam ação direta nos bacilos, mesmo com maior capacidade de produzir IFN- γ .

Macrófagos reconhecem Mtb por meio do TLR2. Este receptor de reconhecimento de padrões de patógenos (PRR) reconhece as seguintes estruturas de Mtb: proteína de choque térmico 65 e 70, lipoproteínas (LpqH, LprA, LprG, PhoS1), lipoarabinomanana, lipomanana, manosídeos fosfatidil-mio-inositol e trealose dimicolato (TDM) (KORB; CHUTUTGOON; MOODLEY, 2016). Um estímulo baixo do TLR2 confere ativação da resposta inata e adaptativa, entretanto um estímulo prolongado promove o recrutamento de células Treg e aumento da produção de IL-10.

A formação do granuloma no pulmão em humanos contém um centro de macrófagos infectados pelos bacilos circundados por macrófagos com diferentes morfologias (células gigantes multi-nucleadas, células epitelioides, macrófagos xantomatosos ricos em gotas lipídicas), granulócitos e outros fagócitos mononucleares. Nas fases iniciais da formação do granuloma, ocorre uma neovascularização, precedida do recrutamento de linfócitos, DCs e macrófagos. Com a maturação do granuloma, forma-se uma camada fibrosa de colágeno ao redor do centro de macrófagos (KORB; CHUTUTGOON; MOODLEY, 2016).

Camundongos não conseguem formar a estrutura granulomatosa como observado em humanos (SILVA MIRANDA et al., 2012). Camundongos C3HeB/FeJ (HARPER et al., 2012) e camundongos nocaute Nos 2^{-/-} (REECE et al., 2010) são os únicos reportados que formam estruturas semelhantes ao granuloma humano. Entretanto, devido a facilidade do estudo e de obtenção, modelos de camundongos BALB/c são utilizados em diversos estudos de fisiopatologia do Mtb (DA COSTA et al., 2014; JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2013). Dormans et al. (2004), ao estudar a patologia do Mtb em camundongos BALB/c, 23 dias após infecção com a cepa Beijing-2, observou a presença no pulmão de alveolite, perivasculite e peribronqueolite, com a presença de linfócitos e histiócitos, além da formação de estruturas semelhantes a granulomas. A cepa H37Rv só foi capaz de causar lesão pulmonar após 4 semanas de infecção.

Os macrófagos espumosos, células que fagocitam e retêm lipídios, são agravantes da infecção por Mtb e conseqüentemente, do estímulo bacteriano persistente. A presença dessas células está ligada à cavitação pulmonar e transmissão dos bacilos (RUSSELL et al., 2009). Esses macrófagos produzem altos níveis de TGF- β , que pode culminar com a

apoptose das células efetoras imunes, e NO, que suprimem as células T em infecção por Mtb em murinos (NABESHIMA et al., 1999). A formação dessas células está diretamente ligada à desregulação dos níveis de LDL nos macrófagos. Os componentes triacilglicerol e os fosfolipídeos são metabolizados (RUSSEL et al., 2009; KORB; CHUTUTGOON; MOODLEY, 2016). Entretanto, o colesterol é transportado para o citosol e é sequestrado para os corpos lipídicos. A associação entre os macrófagos espumosos e a necrose caseosa são os achados histológicos relevantes associados à presença de triacilglicerol e colesterol nas regiões de necrose (RUSSEL et al., 2009). Peyron et al. (2008) demonstrou que a formação de macrófagos espumosos está ligada a liberação de formas oxigenadas de ácidos micólicos liberados por micobactérias virulentas internalizadas.

1.5 BCG

O *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) é a única vacina atualmente licenciada e utilizada mundialmente contra TB (ZWERLING et al. 2011). Foi produzida inicialmente por Albert Calmette e Camille Guérin, a partir de uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis*, entre 1908 e 1919 (CALMETTE et al., 1927). Os bacilos foram atenuados após treze anos de passagem *in vitro*, somando mais de 200 passagens em meio de bile-batata glicerinado. Os bacilos atenuados foram utilizados pela primeira vez como vacina para humanos em 1921 (LIENHARDT & ZUMLA, 2005; BASTOS et al., 2009). As passagens *in vitro* forçaram as micobactérias a passar por processos de mutação que levaram a perda de 17 regiões de diferenciação genômicas (RD-1 a RD-16 mais nRD-18) codificantes de antígenos relevantes na virulência dessas bactérias (DA COSTA et al., 2014; ANDERSEN & WOODEWORTH, 2014). A OMS recomendou o seu uso a partir do ano 1950 (ANDERSEN & DOHERTY, 2005). Entretanto, sua eficácia em crianças varia de 0 a 80% em países subdesenvolvidos, não sendo capaz de proteger indivíduos adultos (FINE, 1995). Com isso surge a necessidade de novos métodos de prevenção contra a TB.

Apesar dos problemas de indução de memória imunológica e variação na proteção de crianças, a BCG consegue induzir níveis de células T produtoras de IFN- γ e reduzir em escala logarítmica a carga bacteriana em modelos murinos. Faz-se necessário entender em quais aspectos a BCG consegue gerar proteção e o que seria necessário para prover uma imunidade duradoura (ANDERSEN; WOODEWORTH, 2014). Sabe-se que os níveis de IFN- γ induzidos pela BCG são devidos a indução de células T efetoras terminalmente diferenciadas (LINDENSTROM et al., 2013), que pode ser um reflexo da incapacidade de

gerar células T centrais de memória de vida longa (ORME, 2010). Nem a BCG nem a infecção prévia por Mtb promovem resposta imune suficiente para prevenir reativação ou reinfeção com Mtb na vida adulta.

A esperança de uma nova vacina contra TB gira em torno de uma vacina que permita a geração de células específicas de vida longa contra Mtb e que residam nas vias aéreas ou nos linfonodos pulmonares, para que possam atuar assim que o bacilo se instalar; que consiga impedir a geração de células Treg durante a fase inicial da infecção, para evitar a multiplicação do patógeno. As vacinas em fase clínica atuais conseguem induzir células produtoras de IFN- γ que são capazes de reconhecer epítomos imunodominantes de Mtb (EVANS et al., 2013). Além do mais, as melhoras em potenciais vacinas contra TB estão voltadas para a geração de vacinas indutoras de células Th1 intermediárias, presentes no parênquima do pulmão, do que aquelas que induzem células Th1 diferencialmente terminadas, presentes apenas na circulação sanguínea pulmonar (SAKAI et al., 2014). Junqueira-Kipnis et al. (2013) e Monin et al. (2015) ressaltam a importância de uma vacina contra TB em gerar células Th1 e Th17 para proteção contra o Mtb. Portanto, vários critérios devem ser levados em consideração para o desenvolvimento de formulação vacinais novas contra Mtb.

1.6 Vacinas em Estudo Clínico

São 13 vacinas em teste clínico, atualmente, de acordo com a instituição Aeras (AERAS, 2017).

Em fase I temos as vacinas: MTBVAC, Ad5 Ag85a, ChAdOx1.85A/MVA85A, MVA85A/ MVA85A e TB/FLU-04L. MTBVAC é uma cepa atenuada de Mtb com os genes *phoP* e *fadD26* desenvolvido por TBVI, na Universidade de Zaragoza, Países baixos e Biofabri, Espanha. A vacina apresenta segurança e biodistribuição similares à BCG e confere proteção superior em estudos pré-clínicos (AHSAN, 2015). Ad5 Ag85a é o sorotipo 5 do adenovírus recombinante deficiente em replicação, desenvolvido pela McMaster University no Canadá em colaboração na companhia CanSino, que expressa o Ag85a de Mtb (China) (SMALL; XING, 2014). Vacinação com Ad5 Ag85a demonstrou proteção maior do que a BCG em modelos animais. Os estudos de fase I demonstraram segurança e imunogenicidade. MVA85A, um vetor viral, é uma cepa recombinante de *Vaccinia* expressando os antígeno 85A (MC SHANE et al., 2005). Estudos de fase I demonstraram efeito imunogênico e foram bem toleradas em adultos com HIV no Senegal

apresentando poucos efeitos adversos locais e sistêmicos. Em um estudo em primatas não-humanos, MVA85A mostrou efeito imunogênico quando utilizada por via aerossol (WHITE et al., 2013). Estudos de fase IIb em 2797 crianças mostrou ser bem tolerada e imunogênica mas a proteção contra TB foi fraca.

Na fase IIa estão: RUTI, H1/H56:IC31, H4/IC31, ID93 + GLA-SE. RUTI é uma vacina terapêutica produzida a partir de fragmentos de Mtb encapsulados em lipossoma, com a capacidade de estimular células Th1, Th2, Th3, T CD8⁺ e induzir forte resposta imune humoral (CARDONA, 2006). A vacina H1/IC31 é constituída de uma proteína de fusão entre o Ag85B e o ESAT-6 (H1), formulada em conjunto com o adjuvante IC31. Em um estudo de fase II, demonstrou-se segura e bem tolerada em pacientes HIV-positivos, além de induzir uma resposta Th1 específica e duradoura (REITHER et al., 2004). H56/IC31 contém a proteína de fusão H56, que contém um terceiro antígeno ao H1, o antígeno de latência Rv2660c (RUHWALD et al., 2014). H4:IC31 é uma vacina que contém uma proteína de fusão com os antígenos imunodominantes TB10.4 e Ag85b, junto com o adjuvante IC31. Essa vacina se mostrou segura em adultos da África do Sul, e capaz de induzir células IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ IL-2⁺ ou TNF- α ⁺ IL-2⁺ (GELDENHUYS et al., 2015).

Em fase IIb estão: DAR-901, VPM 1002 e M72 + AS01E. DAR901 é uma cepa de *M. obuense* inativada por calor. Ela foi capaz de induzir a geração de células Th1 em camundongos, e aumentou a quantidade dessas células quando utilizada como reforço à BCG, além de induzir anticorpos específicos (LAHEY et al., 2016). A VPM 1002 é uma BCG recombinante expressando listeriolisina e deficiente em urease (KAUFMANN et al., 2014). Ela foi produzida para secretar listeriolisina, afim de perfurar a membrana fagossomal, permitindo o transporte de antígenos para o citosol e sua apresentação por via de MHC de classe I (GRODE et al., 2005). Essa vacina conseguiu induzir células T CD8⁺, Th1 e Th17 (FARINACCI; WEBER; KAUFMANN, 2012). M72+AS01E é uma vacina de subunidade contendo proteínas de fusão 32A e 39A em adjuvante. Estudos de fase II demonstraram que essa vacina induz células T CD4⁺ e respostas imunes humorais. M72/AS01 tem um perfil de segurança aceitável clinicamente e alta imunogenicidade em adultos saudáveis e infectados com Mtb (DAY et al., 2013).

A única vacina em fase III é a *M. vaccae*. *M. vaccae* é um agente imunoterapêutico morto por calor em TB desenvolvido pela Anhui Zhifei Longcom, China. Apresentou-se segura e imunogênica em adultos que eram HIV positivos e induziu células T CD4⁺ expressando IFN- γ e IL-10 (YANG et al., 2010).

1.7 CMX

CMX é uma proteína de fusão que contém os epítomos imunodominantes Ag85c, MPT51 e toda a proteína HspX, expressos em diferentes etapas da infecção por Mtb. A proteína já foi utilizada como parte de outras formulações vacinais do grupo. MPT51 e Ag85c são expressos durante a fase ativa da doença, enquanto o HspX é altamente expresso durante a latência (DE SOUSA et al., 2012; KASHYAP et al., 2013).

O complexo Ag85 é uma família de três proteínas (Ag85a, Ag85b e Ag85c) que têm atividade micoliltransferase, por ligar o ácido micólico à arabinogalactana da parede celular, e também são responsáveis pela formação da trealose dimicolato, lipídio virulento do Mtb (HUYGEN, 2014). Estudo realizado por Kumar et al. (2008) demonstrou o papel de antígenos secretados e constituintes da parede celular no diagnóstico de Mtb e o Ag85c teve sensibilidade de 89,77% e especificidade de 92%, quando utilizado em ELISA para diagnosticar indivíduos doentes. O soro de infantes também reagiu com o Ag85c. Ag85a e Ag85b são secretados, mas o Ag85c é parte integrante da parede celular. Jain et al. (2008) expressaram o Ag85c em uma BCG recombinante, e observaram redução na carga bacilar em cobaias, associado a baixos níveis de citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α . As proteínas do complexo Ag85 têm grande potencial como antígenos de vacina, aliado a imunogenicidade comprovada do Ag85c.

MPT51, secretado na fase ativa da doença, tem uma similaridade de 40% na estrutura primária aos componentes da família Ag85 e os anticorpos que se ligam ao MPT51 tem reação cruzada com os membros dessa família (WANG et al., 2010). O papel do MPT51 na micobactéria é o de ligação da fibronectina, mas não possui a atividade de micoliltransferase (WILSON et al., 2004). A importância desse antígeno é ressaltada por ser um marcador precoce de TB em indivíduos com HIV (RAMALINGAM; UMA DEVI; RAJA, 2003) e distinguir pacientes com a doença ativa de saudáveis (ACHKAR et al., 2006; SILVA et al., 2014). Nosso grupo demonstrou que o MPT51, quando usado como vacina com o adjuvante CpG-DNA, aumentou os níveis de células Th1 em camundongos BALB/c e reduziu a carga bacilar de Mtb em camundongos, demonstrando-se um ótimo candidato vacinal (SILVA et al., 2009).

HspX é um antígeno encontrado em algumas micobactérias que é altamente expresso por Mtb durante a fase de latência. É responsável por uma resposta imune humoral e celular específica. A latência é induzida por condições de estresse quando o microrganismo encontra-se dentro do macrófago, tais como a presença de óxido nítrico,

baixa concentração de nutrientes e de oxigênio. Foram constatados 48 genes que são superexpressos durante a fase de latência, sendo a proteína HspX de 16 kDa, a mais superexpressa. O perfil de resposta imune encontrado para o HspX envolve os linfócitos B, células CD4⁺ Th1 e CD8⁺ CTL, além de ser responsável por gerar células CD8⁺ de memória (SIDDIQUI; AMIR; AGREWALA, 2011; REIS et al., 2011).

Com relação a proteína de fusão CMX, nosso grupo demonstrou que a mesma poderia ser útil para fins diagnósticos, identificando portadores da doença em qualquer fase (DE SOUSA et al., 2012). Essa proteína foi utilizada em formulação vacinal com lipossomos em camundongos e mostrou-se indutora de citocinas do perfil Th1 pelos esplenócitos e de anticorpos IgG1 e IgG2a, característicos de respostas CD4⁺ Th1 e Th2.

ESAT-6 é uma molécula do Mtb, codificada pelo gene Rv3875, que auxilia o patógeno à reduzir as taxas de apoptose dos macrófagos nos quais estão instalados (GUO et al., 2012). Além do mais, o complexo ESAT6/CFP10 inibe macrófagos de produzir TNF- α e IL-12, alterando a resposta imune inata (PATHAK et al., 2007). Devido a importância dessa molécula ao Mtb, sua utilização em uma vacina, a fim de bloqueá-la no patógeno é vital para o mesmo. Pensando nisso, nosso grupo adicionou o gene do ESAT6 ao plasmídeo contendo a sequência da CMX e foi criada uma nova proteína recombinante, a ECMX. Sua eficácia vacinal não foi previamente testada.

Quando a CMX foi expressa em um vetor vivo, a mc²-CMX, induziu respostas IgG1 e IgG2a específicas ao CMX, além de respostas Th1 e Th17. Após desafio com Mtb, a mc²-CMX demonstrou proteção superior à BCG. Uma alteração no vetor, gerou a IKE-CMX induziu uma proteção superior mc²-CMX (JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2013). A variabilidade na proteção da BCG e em induzir células de memória de vida longa, levou pesquisadores não somente a procurar novas vacinas, como também melhorar a eficácia da BCG, uma vez que ela protege contra as formas severas de TB em crianças, a TB miliar e a TB meníngea (FINE, 1995). Nosso grupo produziu uma BCG recombinante que expressa a CMX, desenvolvendo a vacina rBCG-CMX. Essa vacina induziu respostas maiores de células Th1 e Th17 do que em camundongos vacinados com BCG, ambas específicas para a proteína CMX (DA COSTA et al., 2014). Apesar dos esforços conseguidos até o momento, as vacinas desenvolvidas pelo grupo ainda não podem ser testadas em primatas não humanos pois necessitam de testes em animais deficientes. Além do mais, este fato, motivou o grupo, a desenvolver novas formulações vacinais utilizando proteínas e um adjuvante aprovado para uso em humanos, evitando a necessidade de testes de segurança em camundongos imunodeficientes.

1.8 Adjuvantes

Antígenos proteicos são fracamente imunogênicos. Para ter efeito como vacina, esses peptídeos precisam ser inoculados juntamente com adjuvantes, substâncias que aumentam a resposta imune contra os antígenos. Adjuvantes podem aumentar a imunogenicidade de antígenos, reduzir o esquema vacinal em crianças e idosos, e pode atuar como um sistema de entrega de antígenos em mucosas (PETROVSKY & AGUILAR, 2004). Glenny et al. (1926) notaram que o toxoide de difteria, quando inoculado com alumínio, culminava com maior recrutamento celular do que quando inoculado puro. Algum tempo depois, quando estudos tornaram o método de adição de alumínio padronizado, ele passou a ser utilizado como adjuvante em vacinas (LINDBLAD, 2004). Hoje sabe-se que adjuvantes de alumínio são estimuladores de células Th2, exceto quando os esquemas vacinais são preparados com IL-12 e IL-18 exógeno, que leva a um perfil Th1 (KENNEY et al. 1999).

O “immunologists dirty little secret”, como os adjuvantes foram primariamente chamados, podem atuar de diversas maneiras. Quando liberam o antígeno de forma lenta e contínua no local da inoculação, são conhecidos por “efeito de depósito”. Adjuvantes que agem dessa forma estimulam continuamente o sistema imune e geram altos níveis de anticorpos. São exemplos, alumínio (GLENNEY et al., 1926), emulsões água em óleo, micro e nanopartículas.

O alumínio adsorve o antígeno e a forte interação eletrostática entre eles, permite a união, que resulta em uma alta fagocitose do antígeno por polimorfonucleares (PMN) e aumento da apresentação para APCs (BURREL et al., 2000; AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013). O alumínio atrai monócitos para os linfonodos drenantes pela liberação de ácido úrico (KOOL et al., 2008). Células dendríticas ao fagocitarem o alumínio, liberam IL-1 β (LI; NOOKALA; RE, 2007) pela ativação do inflamassoma NLRP3 ao entregar o ácido úrico ao citosol (FRANCHI; NÚÑEZ, 2008). CAF01 é conhecido por seu efeito de depósito duradouro e é componente de uma vacina em fase clínica (HENRIKSEN-LACEY et al., 2010).

Alguns adjuvantes são classificados pela sua capacidade de aumentar os níveis de citocinas e recrutamento celular. O alumínio estimula a produção de CCL2, CXCL1 e CCL11 (KOOL et al., 2008) que culmina com o recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, monócitos, DCs, células assassinas naturais (NK) e assassinas naturais T (NKT) (MCKEE

et al., 2009). É classicamente um indutor de células Th2 (GRUN; MAURER, 1989; AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013), devido ao estímulo de eosinófilos Gr1⁺ produtores de IL-4 (JORDAN et al., 2004). As células Th2 atuam estimulando a proliferação de células B e em uma alta produção de anticorpos, como IgM (WANG; WELLER, 2008).

MF59 suprarregula a expressão de CCR2, que recruta monócitos para o local de inoculação. Outras células, como células B e neutrófilos, também são recrutadas (CALABRO et al., 2011) e engolfam tanto o antígeno quanto o adjuvante, para serem levados para linfonodos drenantes. O AS03 junto com o antígeno ativa CFS3 e IL-6, além das quimiocinas recrutadoras de leucócitos, CCL2, CCL3 e CCL5, sendo responsáveis pelo influxo de neutrófilos, eosinófilos e monócitos (MOREL et al., 2011).

CpG-DNA são oligonucleotídeos imunomodulatórios encontrados em bactérias e vírus; moléculas agonistas específicos de TLR-9. Este ativa uma resposta protetora que aumenta a eliminação de patógenos (SHIROTA & KLINMAN, 2014). Quando oligonucleotídeos contendo motivos CpG são reconhecidos por TLR9 presente nas membranas de vesículas de APC, estas são ativadas e produzem citocinas que favorecem resposta imune específica com perfil Th1 (KLINMAN, 2004). A localização intracelular do TLR contribui para que ocorra o encontro com o DNA patogênico, que geralmente se encontram encapsulados e protegido de DNAses.

A ligação do CpG-DNA ao TLR9 induz clivagem proteolítica do receptor. Depois de sair do retículo endoplasmático, o ectodomínio TLR9 é clivado pela asparagina endopeptidase e/ou catepsinas. Esta forma truncada recruta MyD88, IRAK, TRAF6, e envolve a ativação de diversos MAPK e fatores de transcrição (como NF- κ B e AP-1) culminando na transcrição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α (AKIRA & TAKEDA, 2004; KLASCHICK; TROSS; KLINMAN, 2009; SHIROTA & KLINMAN, 2014). Mais de cem vacinas utilizando CpG DNA foram utilizadas em testes clínicos. A vacina atual contra hepatite B falha em induzir soroproteção em 5-10% de indivíduos imunocompetentes. A vacina com inclusão de CpG DNA em fase III, HEPLISAV, aumentou a indução de resposta imune humoral e respostas mediadas por células contra o HBV (COOPER & MACKIE, 2011).

AdvaxTM é um adjuvante pertencente à uma nova classe, por sua composição polissacarídica e por seu mecanismo de ação. É um adjuvante derivado do polímero inulina (polifrutanosil-D-glicose), uma estrutura de poli-frutose que termina com uma cadeia única de glicose (PETROVSKY; COOPER, 2015). As formas solúveis da inulina (cadeias α e β) não têm atividade imune, mas as formas cristalinas (cadeias δ e γ) conseguem ativar a via

alternativa do complemento, o que lhes conferem capacidade adjuvante (KEREKES et al., 2001). Kerekes et al. (2001) conseguiram demonstrar que a capacidade adjuvante da γ -inulina é através da alta deposição de C3 na superfície de macrófagos, que culmina no aumento da ativação de células T.

Entretanto, a isoforma δ -inulina é insolúvel até 40°C e apresenta melhor atividade no organismo humano. Além do mais, a δ -inulina ativa reguladores do complemento, como clusterina, que bloqueia a produção de anafilotoxinas e MAC (do inglês “*membrane cell attack*”) (PETROVSKY; COOPER, 2015). Assim a δ -inulina tornou-se o princípio do Advax, que conhecidamente consegue ativar a imunidade inata e não induz inflamação, por não ser capaz de ativar NF- κ B. Hayashi et al., (2017) demonstraram que a ação do Advax é dependente de macrófagos MARCO⁺ e independente de células dendríticas.

O coronavírus responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV) é responsável por uma doença respiratória marcada por infiltrado celular inflamatório com dano alveolar difuso (NICHOLLS et al., 2003). Quando o vírus foi inativado e utilizado como vacina, demonstrou uma pequena proteção (DARNELL et al., 2007). Em associação com o alúmen, a vacina agravou o quadro respiratório, cursando com patologia pulmonar eosinofílica grave (BOLLES et al., 2011). Afim de gerar uma vacina com maior proteção e que não gerasse as complicações citadas, Honda-Okubo et al. (2015), utilizaram uma proteína recombinante do SARS-CoV, rSP, em conjunto com os adjuvantes Advax1 e Advax2. Duas semanas após a imunização, a vacina utilizando Advax2 como adjuvante, gerou resposta Th1 nos camundongos e um perfil IgG1 e IgG2a específicos até um ano depois da vacinação. O adjuvante Advax1 gerou apenas resposta Th1 fraca, duas semanas após a imunização, mas que estava elevada um ano depois.

Na tentativa de reverter o quadro patológico induzido por vacinas contendo alúmen, devido a resposta predominante do tipo Th2, os adjuvantes Advax1 e Advax2 foram utilizados em conjunto com o Vírus Sincicial Respiratório (RSV), (DE SWART et al., 2002). O estudo de Wong et al. (2016), utilizando essas formulações, demonstrou que após seis semanas da imunização com Advax2 + RSV, os níveis de IgG2a foram superiores aos níveis de IgG1, perfil correspondente a resposta Th1. Quando utilizado Advax1 os níveis de ambas classes de anticorpos foram semelhantes.

Em um teste recente em humanos, o Advax foi adicionado ao vírus Influenza inativado, como uma forma de reduzir os custos da vacinação contra o vírus sazonal Influenza. Os níveis de IgM e IgG observados foram similares àqueles encontrados com a

vacina inativada inteira que necessitava de altas concentrações virais. Além do mais, a formulação se mostrou segura e eficaz (GORDON et al., 2016).

A adição de CpG-DNA ao Advax, Advax^{CpG}, e sua formulação com proteínas da plataforma MultiTEP, foi testada como vacina para doença de Alzheimer em murinos. Nestes animais, a formulação vacinal conseguiu induzir níveis maiores de IgG2a do que outros adjuvantes, como alúmen e o próprio Advax, além de uma resposta Th1 e Th2 equilibrada, oito vezes maior que as induzidas com outros adjuvantes já testados (DAVTYAN et al., 2016). Advax4 é uma nova composição do Advax, contendo CpG-DNA, que pode potenciar as respostas do Advax como vacina contra microrganismos intracelulares, como bactérias, e o próprio Mtb. Assim, nos perguntamos se o Advax4 junto às proteínas do grupo, CMX e ECMX seriam capazes de estimular respostas imunes específicas aos antígenos e culminar com proteção contra TB.

2 JUSTIFICATIVA

A TB é uma doença re-emergente que permanece como um dos maiores problemas de saúde pública mundial, agravado depois de 1980 pelo surgimento de casos de infecção com HIV 1/2 e o aumento da multi-droga resistência (MDR). São notificados aproximadamente 10 milhões e 400 mil de novos casos e 1 milhão e 900 mil de mortes por ano, sendo que 98% destes casos se encontram nos países em desenvolvimento. O Brasil encontra-se em 18º lugar no “ranking” dos 22 países com maior índice de prevalência de TB.

A BCG é a única vacina licenciada pela OMS para o combate da TB. Entretanto sua eficácia é variável (0 a 80%) e não atinge adultos. A BCG também não pode ser utilizada em indivíduos imunossuprimidos, como pacientes HIV-positivos, por se tratar de um microrganismo vivo atenuado, podendo causar BCGite. A OMS tem como objetivo reduzir a incidência da TB em 80% e reduzir as mortes por TB em 90% até o ano de 2030. Este trabalho se justifica pela necessidade do desenvolvimento de novas formulações vacinais contra a TB, uma vez que aquelas em estudo clínico não se mostraram melhores do que a BCG na capacidade de proteção.

Vacinas de subunidade proteica quando utilizadas com adjuvantes seguros, permitem a sua utilização na maioria dos indivíduos. Portanto, nesse trabalho pretendeu-se desenvolver formulações vacinais contendo duas proteínas de fusão recombinante nunca testadas antes contra Mtb (vacina de subunidade proteica) associadas ao Advax um adjuvante seguro para uso em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes formulações do adjuvante Advax na formulação de vacinas de subunidade proteica contendo CMX e ECMX contra *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a inflamação local no músculo quadríceps (sítio de inoculação das vacinas).
- Verificar as células endoteliais linfáticas e células endoteliais sanguíneas e a ativação dos macrófagos nos linfonodos drenantes após vacinação.
- Avaliar a resposta imune humoral contra CMX e ECMX no soro dos camundongos vacinados.
- Analisar a indução de linfócitos T efetores específicos para CMX e ECMX: Th1 e Th17.
- Avaliar as alterações histopatológicas dos pulmões dos camundongos vacinados e posteriormente infectados.
- Calcular a carga bacilar dos pulmões dos camundongos vacinados e infectados com Mtb.
- Determinar a sobrevida dos camundongos imunizados com as formulações contendo CMX.

4 MÉTODOS

4.1 Ética

Os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética 0153/10 (anexo I). Todo o manuseio animal foi realizado sob orientação de médico veterinário, responsável pelo treinamento.

4.2 Animais

Para este estudo, foram utilizados 93 animais BALB/c fêmeas provenientes do Biotério da Unicamp (Universidade de Campinas – São Paulo), de 6 - 8 semanas, que foram climatizados e isolados em cabines no biotério do IPTSP com dieta *ad libitum*. Camundongos receberam cilindros de papel para reduzir as condições de estresse e ocasionalmente receberam alimentação com suplemento de sementes de girassol. A umidade foi controlada em torno de 40 à 70% e o ciclo de luz/escuridão de 12 horas. Temperatura foi mantida em 24°C.

4.3 Construção da CMX e da ECMX

De Sousa et al. (2012) descreveram a construção do plasmídeo pET23a/CMX. Para a construção do gene de fusão ECMX, o gene da ESAT-6 foi amplificado do DNA do Mtb, cepa H37Rv e clonado em um plasmídeo pGEM-T easy (Promega) com a criação dos sítios de restrição enzimática para as enzimas NdeI e BamHI nas regiões aminoterminal e carboxiterminal do gene. O gene ESAT-6 foi removido do pGEM-T-ESAT-6 por digestão com as enzimas referidas e inserção no plasmídeo pET23a/CMX previamente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo recombinante nomeado pET23a/ECMX foi confirmado pelos perfis de restrição das enzimas bem como pelo sequenciamento da construção completa. Esta construção apresenta patente depositada: BR 10 2014 032352 0.

4.4 Produção da CMX e da ECMX

Para produção da proteína recombinante CMX e ECMX em larga escala, dois microlitros do plasmídeo pet23a foram transferidos para 50 µL de *E. coli* e eletroporados para transformação das bactérias. Após uma hora de incubação em meio SOC, as células foram plaqueadas com os antibióticos cloranfenicol e ampicilina em meio LB ágar por 12

horas. Foram selecionadas 10 colônias, que foram adicionadas em duas placas com réguas, uma com IPTG e outra sem o indutor. Após 12 horas, as colônias maiores da placa com IPTG foram selecionadas e retiradas da placa sem IPTG para crescimento em meio LB líquido. As colônias foram cultivadas em meio líquido e 10% de IPTG foi adicionado, afim de estimular a produção da CMX, primeiro em pequena escala, e após confirmação da produção, em grande escala. As induções foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm, 4°C. A purificação foi feita em condição desnaturante. Foi adicionado 10 mL do tampão de lise, que agiu por 2 horas. O lisado foi centrifugado por 45 minutos, 10.000g a 22°C. A proteína, presente no sobrenadante, foi transferida para uma coluna de purificação (His-Tag Protein Purification Ni-NTA - QIAGEN), separada de outros constituintes por um tampão de lavagem e isolada em um tampão de eluição, para posterior utilização da proteína.

4.5 Preparação Vacinal

Os adjuvantes Advax3 e Advax4 foram fornecidos pela empresa Vaxine PTY LTD, em soluções polissacarídicas à 50 mg/mL, armazenadas à 2-8 °C. As formulações vacinais contendo CMX/ECMX incluíram 20 ug da proteína e 1 mg dos adjuvantes citados. As vacinas contendo CpG-DNA foram utilizadas contendo 20 µg do adjuvante e 20 ug da proteína recombinante, por camundongo. Os controles vacinais continham grupos contendo: BCG (10^7 CFU/camundongo), CMX sem adjuvante (20 µg/cdg), Advax3 sem proteína (1 mg/camundongo) e Advax4 sem proteína (20 µg/cdg). As formulações vacinais foram preparadas no momento da inoculação para correta homogeneização.

4.6 Vacinação

As vacinas CpG-DNA + CMX, Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e Advax4 + ECMX foram administradas em três doses, por via intramuscular, com intervalos de 30 dias cada, além dos grupos controles Salina, BCG, CMX, Advax3 e Advax4. Os grupos controle receberam uma única dose subcutânea das formulações (Figura 1).

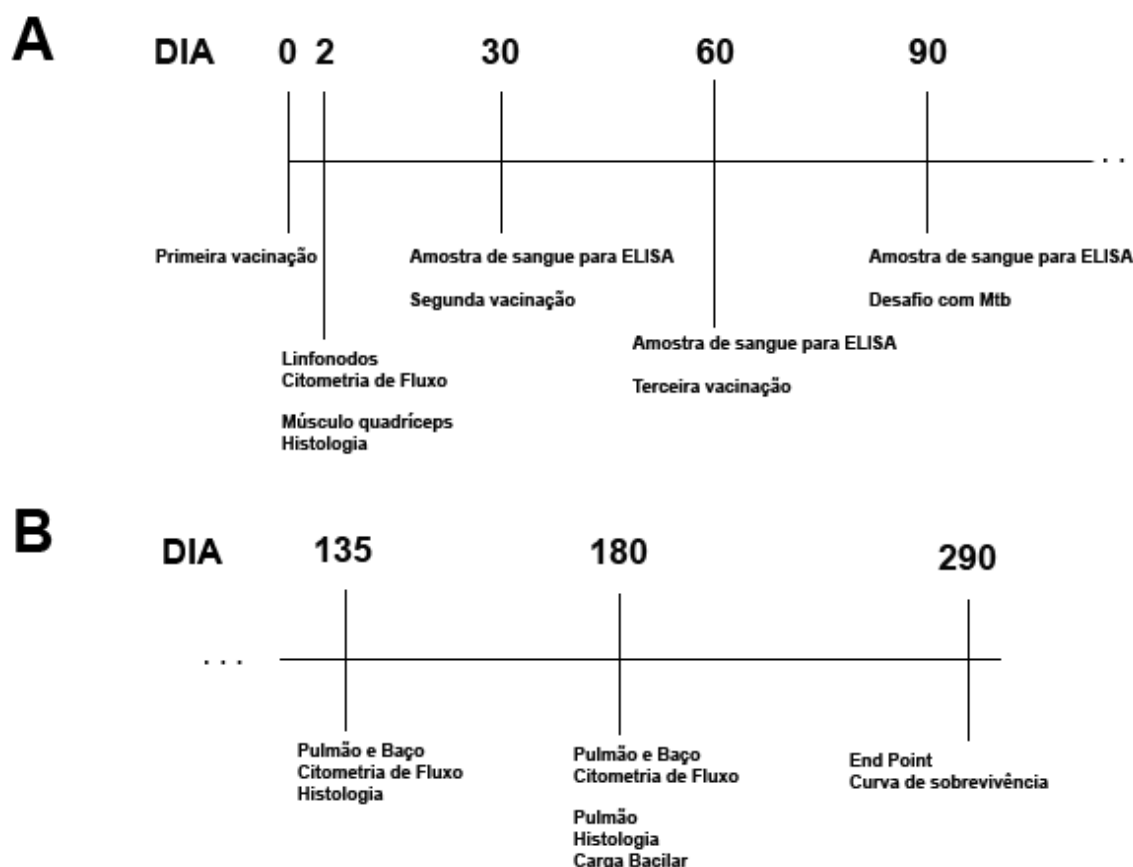


Figura 1 – Desenho experimental. Os animais foram vacinados com intervalos de 30 dias. A: Dois dias após a vacinação um grupo de animais (n=6) foi eutanasiado para avaliação dos linfonodos drenantes e local de vacinação (quadríceps). Entre as três vacinações, o sangue foi coletado de todos os animais para obtenção de soro e análise da imunogenicidade. Os animais foram desafiados com Mtb trinta dias após a última vacinação. B: Quarenta e cinco dias depois, os órgãos (pulmões e baços) foram processamento para determinação da UFC e avaliação das células por citometria de fluxo.

4.7 Análise dos Linfonodos

Para avaliar as LECs e BECs e macrófagos, os linfonodos inguinal e poplíteo de camundongos BALB/c foram coletados dois dias após a primeira vacinação no músculo quadríceps. As células foram processadas e incubadas com anticorpos anti-gp38-FITC (clone: 8.1.1 - Novus Biologicals), anti-CD31-PE-Cy7 (clone: 390 BD Pharmigen), anti-F4/80-FITC (clone: BM8 - Novus Biologicals) e anti-CD11b-PE (clone: M1-70 - eBioscience). As células foram adquiridas com o BD Biosciences FACSVerse citômetro de fluxo (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Comodato - UFG) e os dados foram analisados usando o software FlowJo 8,7.

4.8 Coleta de Sangue

Para dosar os níveis de anticorpos e avaliar a resposta imune humoral induzida pelas vacinas, foi coletado sangue do plexo retro-orbital dos camundongos 30 dias após cada imunização. As amostras foram incubadas por 1 h a 37°C, centrifugadas à 1200g a 4°C por 15 min para separar o soro, e estocadas a -20°C. Os grupos controles foram imunizados apenas no dia experimental 1 e tiveram o soro coletado após 30, 60 e 90 dias, como parâmetro para os grupos CpG-DNA + CMX, Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e Advax4 + ECMX.

4.9 Dosagem de anticorpos

Afim de avaliar os níveis de anticorpos IgG2a e IgG1, a técnica de ELISA descrita por De Sousa et al, (2012) com pequenas modificações foi utilizada. Placas de 96 poços foram incubadas com 10 µg/mL de rCMX (para soro de animais imunizados com CpG-DNA + CMX, Advax3 + CMX, Advax4 + CMX) ou 10 µg/mL de rECMX (para soro de animais imunizados com Advax4 + ECMX) diluído em 0,05M em tampão carbonato/bicarbonato, e incubado a 4°C por 16 hs. Os poços foram bloqueadas com salina contendo 1% de leite desnatado. As amostras de soro foram diluídas à 1:200, adicionados aos poços, e incubados por 2 hs a 37°C. Anticorpos conjugados a biotina (anti-IgG1 ou anti-IgG2a; Pharmingen®) diluídos 1:5000 foram adicionadas as placas, que foram então incubados por 1 h a 37°C. Depois da incubação com a solução substrato, a absorbância a 492 nm foi lida no espectrofotômetro de placas (Labsystems Multiskan Thermo ®).

4.10 Desafio

Para avaliar a eficácia das diferentes formulações vacinais, os camundongos foram desafiados com Mtb 30 dias após o último esquema vacinal. A cepa de Mtb utilizada foi a H37Rv, mantida em freezer -80°C. Uma alíquota foi retirada e diluída para uma concentração de 10⁶ CFU/mL diluindo com PBS contendo 0,05% de Tween 80. Noventa dias após a primeira imunização dos animais, eles foram desafiados com 100 µL do inóculo, por via intravenosa, injetado no plexo retro orbital. A carga bacteriana foi determinada pelo plaqueamento dos homogenatos pulmonares de um camundongo de cada grupo no dia seguinte à infecção em ágar 7H11 suplementado com OADC.

Quarenta e cinco e noventa dias após o desafio, os camundongos foram eutanasiados e os órgãos foram retirados para análise. Os lóbulos anterior e mediastinal

direito pulmonares foram coletados, homogeneizados, e plaqueados em ágar 7H11 suplementado com OADC. Após 21 dias de cultura, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e de acordo com a diluição foi determinado a carga bacteriana por mL.

4.11 Resposta Imune Específica contra rCMX/rECMX no Pulmão e no Baço

Os lobos pulmonares anterior e posterior esquerdos e o baço dos animais eutanasiados aos 45 e 90 dias após o desafio com Mtb (H37Rv), três animais de cada grupo foram utilizados. As células foram separadas com um homogeneizador de tecidos Plotter (Corning, USA). As hemácias foram lisadas com tampão de lise (0,15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃) e as células remanescentes foram ajustadas para 1x10⁶ células/mL e plaqueadas na placa de 96 poços. O esplenócitos e células pulmonares foram estimuladas com ConA (10 µg/mL) ou CMX (10 µg/mL) ou ECMX (10 µg/mL) ou não estimulados (meio). Depois de incubar em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 2 h, uma solução de Monenzina (3 µM; BD Pharmingen) foi adicionada às células, e novamente incubadas por quatro horas. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD4⁺FITC (clone: RM4-5 - eBioscience) por 20 minutos. A marcação intracelular foi feita com tampão Perm Wash (BD Cytfix/Cytoperm Kit) usando anti-IFN-γPE (clone: XMG1.2 eBioscience) e anti-IL-17PERCP (clone: TC11-18H10 - BD Pharmingen). As células foram adquiridas com o BD Biosciences FACSVerse citômetro de fluxo (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Comodato - UFG) e os dados foram analisados usando o software FlowJo 8,7.

4.12 Histopatologia

Foram separados para avaliação histológica os músculos quadríceps dos animais vacinados com Salina, CMX, Advax3, Advax4, Advax3 + CMX e Advax4 + CMX e o lóbulo caudal direito dos animais desafiados com Mtb após 45 e 90 dias (n=3/grupo). Os pulmões foram perfundidos com heparina 0,05% através da inoculação no ventrículo direito do coração. O lóbulo pulmonar e o tecido muscular foram fixados em formaldeído tamponado a 10%. Os tecidos foram processados posteriormente e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica (Axio scope.A1 – Carl Zeiss).

4.13 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando os softwares Microsoft Office Excel 2013 e GraphPad Prism version 6.0. Os resultados representam a média e o desvio padrão para

cada grupo experimental. Os grupos experimentais foram comparados usando One-Way ANOVA seguido de pós teste não-paramétrico de Kruskal Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Formulações vacinais contendo Advax3 e Advax4 não causam inflamação

A formulação de novas vacinas deve levar em consideração: forma de entrega, segurança, eficácia, resposta imune gerada e proteção. Para avaliar a reatogenicidade dos adjuvantes Advax3 e Advax4, os mesmos foram inoculados com ou sem a proteína rCMX, e dois dias depois avaliou-se o sítio de inoculação (quadríceps direito de cada camundongo) (Figura 2). É possível perceber que o grupo que recebeu salina (Figura 2A), Advax3 (Figura 2C), Advax4 (Figura 2D) e Advax3 + CMX (Figura 2E) não sofreram alteração da estrutura morfológica do músculo esquelético. A rCMX não revelou alterações morfológicas importantes, mas observou-se um aumento sutil no número de células inflamatórias, não mostrando diferenças visíveis em relação ao grupo desafiado com salina (Figura 2B, seta). Entretanto, o grupo imunizado com Advax4 + CMX (Figura 2F, seta) apresentou aumento do infiltrado mononuclear, mas sem caracterizar um infiltrado inflamatório (HONDA-OKUBO; SAADE; PETROVSKY, 2012). Não foram observadas lesões macroscópicas.

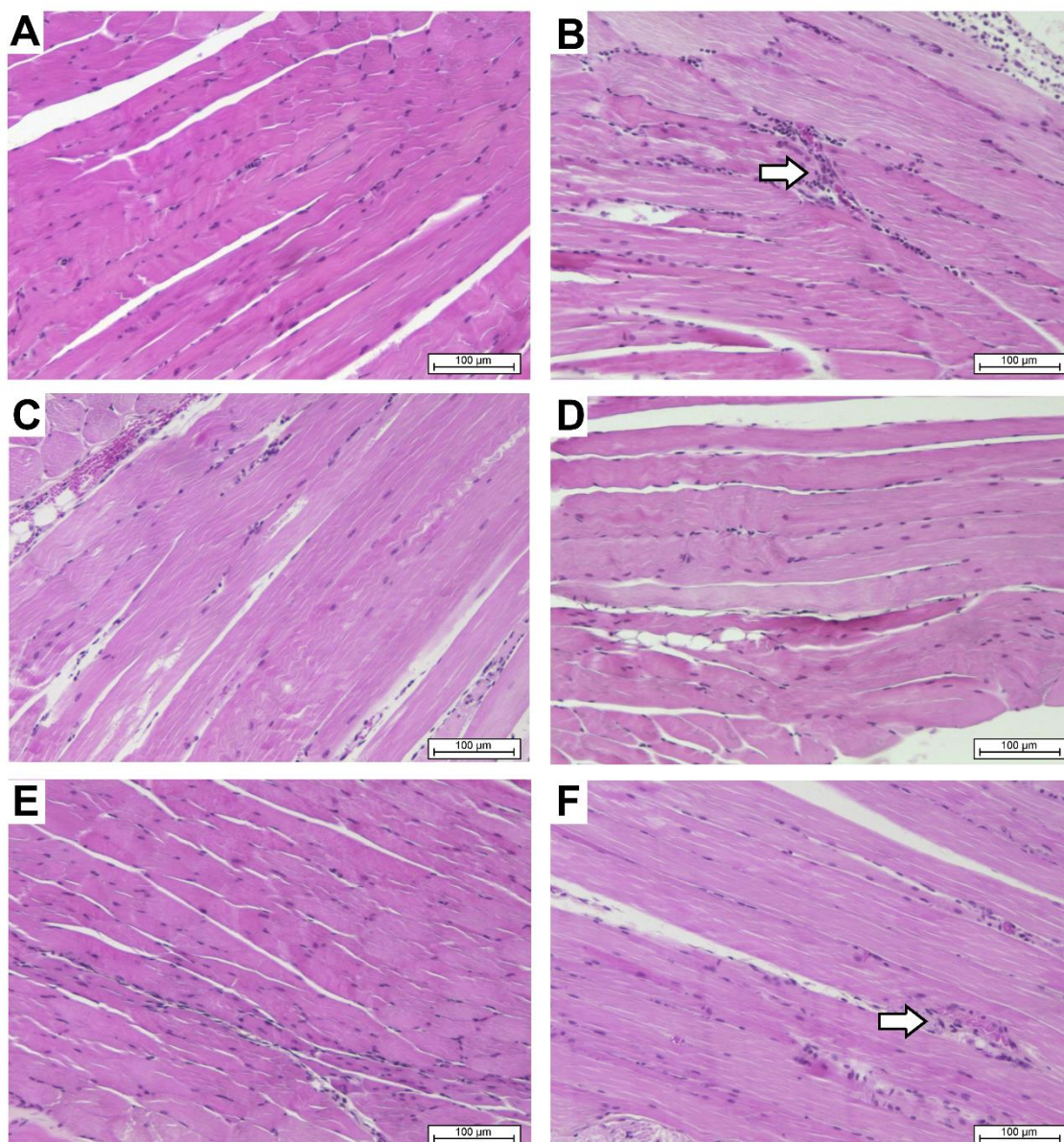


Figura 2 – As formulações contendo Advax não induzem inflamação local. Fotomicrografias (A – Salina, B – CMX, C – Advax3, D – Advax4, E – Advax3 + CMX, F – Advax4 + CMX) representativas de cortes histológicos do músculo quadríceps do local da inoculação, corado em HE. Barras representam 100 µm.

Formulações vacinais contendo Advax3 e Advax4 estimulam células endoteliais linfáticas e macrófagos

Uma vez que a vacina Advax4 + CMX não causou inflamação, mas foi capaz de recrutar células mononucleares para o local de inoculação, foi questionado se as formulações vacinais seriam capazes de serem drenadas para os linfonodos locais. Para responder essa pergunta, foram coletados os linfonodos inguinal e poplíteo direito de cada camundongo e foi avaliado as células endoteliais linfáticas (LECs; CD31⁺gp38⁺), células endoteliais sanguíneas (BECs; CD31⁺gp38⁻) e de macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺). Foi possível observar um aumento do número total de LECs (Figura 3A e B), BECs (Figura 3C e D) e de macrófagos ativados (Figura 3E), quando os animais foram vacinados com as vacinas Advax3 + CMX e Advax4 + CMX, comparando-se com o grupo salina. Com isso podemos concluir que o conteúdo vacinal de Advax3 + CMX e Advax4 + CMX foi carregado por células mononucleares (Figura 2) e induziu a proliferação de células nos linfonodos drenantes, as BECs, LECs e macrófagos (Figura 3).

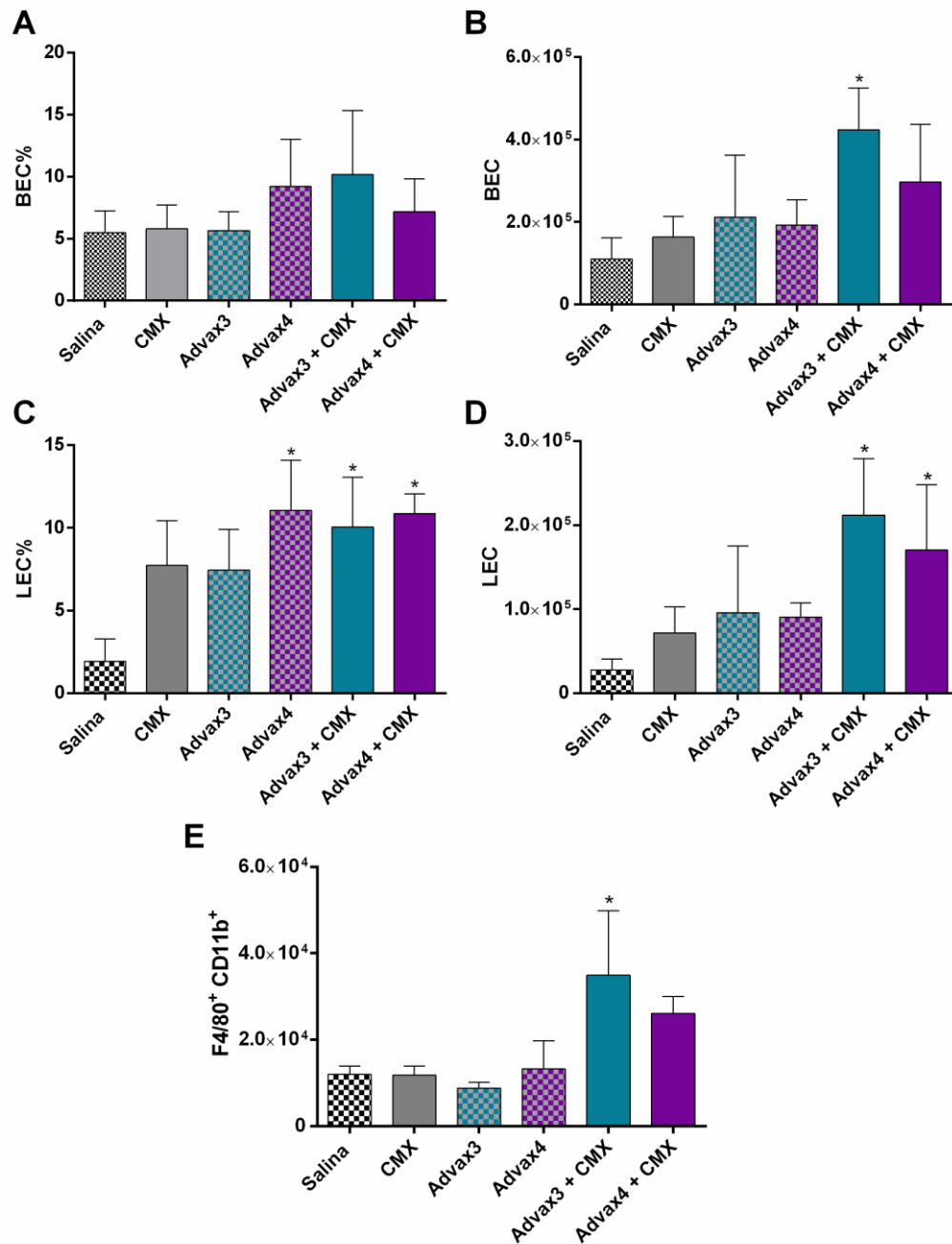


Figura 3 – As formulações Advax3 e Advax4 contendo CMX são capazes de ativar células endoteliais nos linfonodos drenantes. Camundongos BALB/c de 8 semanas foram imunizados com CMX, os adjuvantes sozinhos (Advax3 e Advax4) e as adjuvantes combinados à proteína CMX (Advax3 e Advax4 + CMX). Dois dias após a imunização os camundongos foram eutanaziados e os linfonodos inguinal e poplíteo foram coletados para avaliação das células estimuladas. Em A, as células endoteliais sanguíneas (BEC) foram avaliadas em porcentagem. Em B, as BEC estão apresentadas em número absoluto. Em C, as células endoteliais linfáticas (LEC) induzidas pelas diferentes formulações estão representadas em porcentagem. Em D, as LEC apresentadas em número absoluto. Em E, estão representados os macrófagos ativados. As diferenças estatísticas significativas comparadas ao grupo salina pelo teste de ANOVA, com $p < 0.001$.

Resposta imune humoral é altamente induzida pelas formulações vacinais

As formulações vacinais ativaram células locais no sítio de injeção e células dos linfonodos locais, podendo dar início à uma resposta imune específica à proteína rCMX. Para avaliar se as vacinas são imunogênicas, as mesmas foram inoculadas 3 vezes num intervalo de três dias, e o soro de cada camundongo foi coletado 30 dias depois, para detecção de anticorpos específicos. A Figura 4 demonstra que as formulações vacinais Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e CpG-DNA + CMX induziram níveis elevados de IgG1 a partir da segunda imunização (dia 60). Não houve diferença entre os níveis induzidos entre as três formulações. Quanto aos níveis de IgG2a, os níveis de anticorpos induzidos já estavam aumentados nos trinta primeiros dias e permaneceram altos durante as três imunizações (Figura 5). Esses resultados comprovam a imunogenicidade das formulações vacinais.

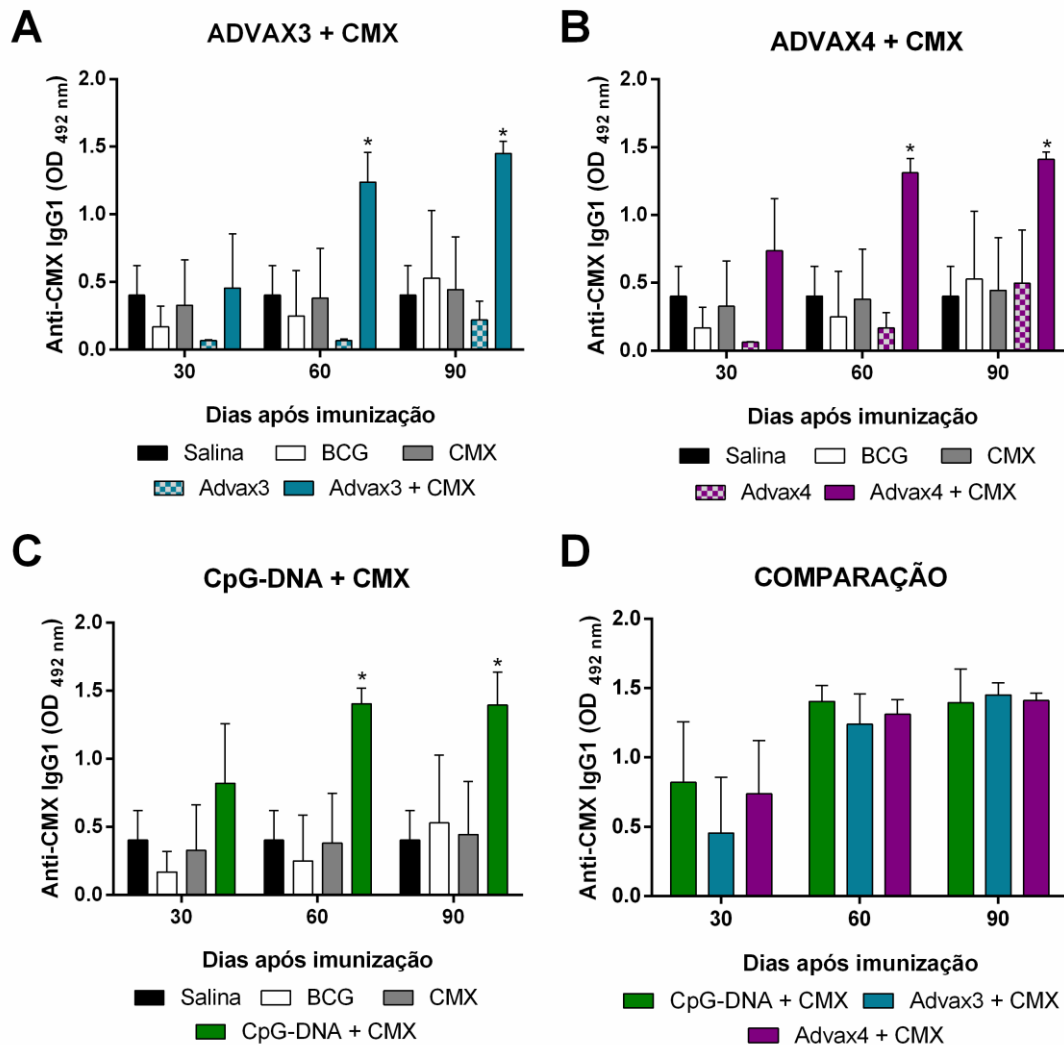


Figura 4 – Resposta Imune Humoral (IgG1) anti-CMX induzida por formulações vacinais contendo CMX. Camundongos BALB/c fêmeas de oito semanas foram vacinados com os adjuvantes Advax3, Advax4 e CpG-DNA em combinação com a proteína de CMX. Foram realizadas três imunizações em cada grupo vacinal, com um intervalo de trinta dias. Trinta dias após cada imunização, sangue foi coletado do plexo retro orbital de cada camundongo para separação do soro e detecção dos níveis de anticorpos por ELISA (A) A vacina Advax3 contendo CMX tem seus níveis de IgG1 comparados aos grupos controles: não imunizado (Salina), imunizados com BCG Moreau (10^7 cfu/animal), com a proteína CMX sem adjuvante (20 μ g/animal), o adjuvante Advax3 sem proteínas adicionais. Advax3 + CMX consegue induzir níveis mais altos de IgG1 a partir de 60 dias. (B) Níveis de IgG1 induzidos pela vacina Advax4 contendo CMX quando comparado aos grupos controles (Salina, BCG, CMX, Advax4). (C) CpG-DNA contendo CMX apresentou maiores níveis de IgG1 após a segunda e a terceira imunização quando comparado aos grupos controles (Saline, BCG e CMX). (D) Comparação entre os níveis de IgG1 induzidos pelas vacinas CpG-DNA + CMX, Advax3 + CMX e Advax4 + CMX trinta dias após a primeira, segunda e terceira imunizações. Não é possível observar diferenças entre os grupos vacinais. *($p < 0.0001$)

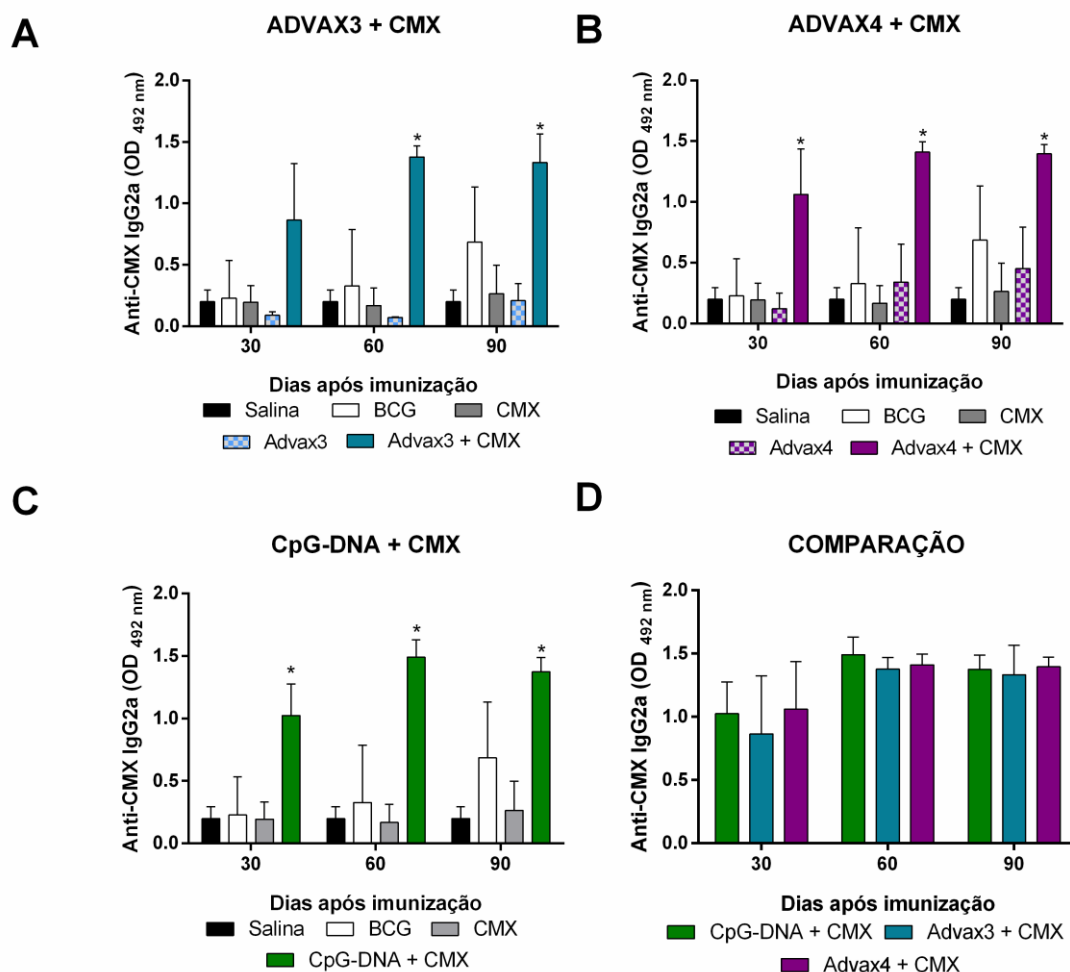


Figura 5 – Resposta Imune Humoral (IgG2a) anti-CMX induzida por formulações vacinais contendo CMX. Camundongos BALB/c fêmeas de oito semanas foram vacinados com os adjuvantes Advax3, Advax4 e CpG-DNA em combinação com a proteína de CMX. Foram realizadas três imunizações em cada grupo vacinal, com um intervalo de trinta dias. Trinta dias após cada imunização, sangue foi coletado do plexo retro orbital de cada camundongo para separação do soro e detecção dos níveis de anticorpos por ELISA (A) A vacina Advax3 contendo CMX tem seus níveis de IgG2a comparados aos grupos controles: não imunizado (Salina), imunizados com BCG Moreau (10^7 cfu/animal), com a proteína CMX sem adjuvante (20 μ g/animal), o adjuvante Advax3 sem proteínas adicionais. (B) Níveis de IgG2a induzidos pela vacina Advax4 contendo CMX quando comparado aos grupos controles (Salina, BCG, CMX, Advax4). É possível observar um aumento dos níveis de IgG2a a partir do 30 dias após a primeira vacinação, que se mantém após a segunda e terceira imunizações. (C) CpG-DNA contendo CMX apresentou maiores níveis de IgG2a após todas as imunizações quando comparado aos grupos controles (Salina, BCG e CMX). (D) Comparação entre os níveis de IgG1 induzidos pelas vacinas CpG-DNA + CMX, Advax3 + CMX e Advax4 + CMX trinta dias após a primeira, segunda e terceira imunizações. Não é possível observar diferenças entre os grupos vacinais. *($p < 0.0001$)

Para analisar qual perfil de anticorpo foi predominante, IgG2a ou IgG1, a proporção entre os anticorpos foi calculada utilizando a leitura da OD (Figura 6). A vacina BCG induziu maior proporção de anticorpos da classe IgG2a após a vacinação, durante todo o período estudado. No entanto, as vacinas compostas por CpG-DNA + CMX, Advax3 + CMX e Advax 4 + CMX apresentaram maiores proporções de IgG2a que IgG1, apenas durante a primeira vacinação. As taxas entre os dois tipos de anticorpos foram similares durante as vacinações consecutivas.

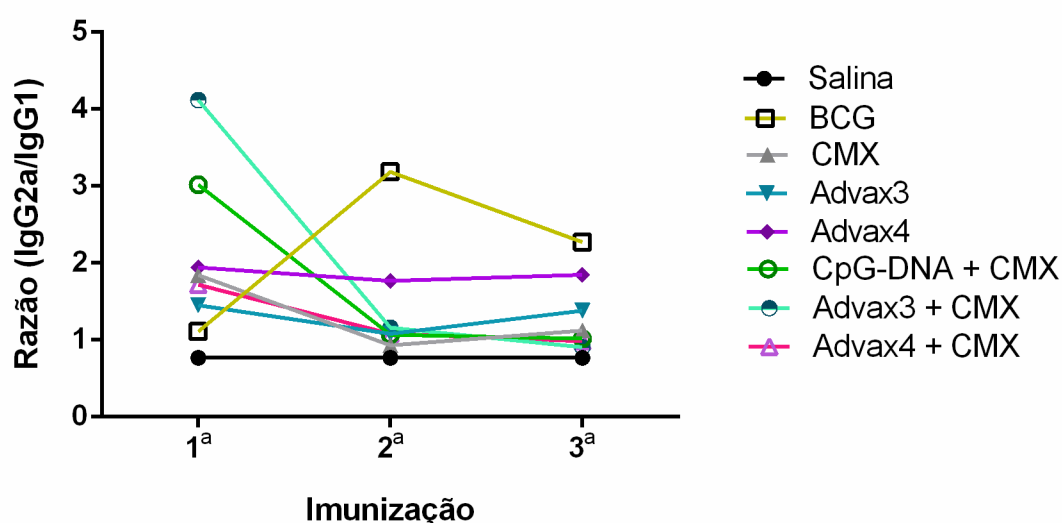


Figura 6 – Razão entre os níveis de IgG2a e IgG1 após cada uma das vacinações. As médias das densidades óticas obtidas na dosagem de IgG2a para cada um dos diferentes grupos foram divididas pelas médias das densidades óticas de IgG1 em cada um dos tempos experimentais.

As formulações vacinais CpG-DNA + CMX e o BCG induzem altos níveis de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ tanto no baço quanto no pulmão

Como as formulações vacinais contendo rCMX demonstraram ser imunogênicas, os camundongos foram então desafiados com 10^5 UFC (unidades formadoras de colônia) da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, para verificar se a resposta imune induzida pelas vacinas era protetora. Para verificar homogeneidade da infecção, um dia após o desafio, um camundongo de cada grupo vacinal foi eutanasiado e as UFC foram contadas

manualmente. Os animais apresentaram $5,75 \times 10^4 \pm 1,35 \times 10^4$ UFC/mL, um dia após a infecção.

Para verificar a resposta celular imune específica anti-rCMX induzida pelas vacinas, os camundongos foram eutanasiados 45 dias e 90 dias após o desafio. O baço e o pulmão foram coletados e as células foram reestimuladas com rCMX. Aos 45 dias após o desafio, a vacinação com BCG, rCMX, CpG-DNA + CMX e Advax3 + CMX induziram altos níveis de células T $CD4^+IFN-\gamma^+$ no baço, quando comparado ao grupo salina (Figura 7A). Os níveis de linfócitos T $CD4^+IFN-\gamma^+$ pulmonares foram maiores nos grupos vacinados com BCG, CpG-DNA + CMX e Advax4 + CMX (Figura 7B). Entretanto, os níveis não foram diferentes do grupo infecção (controle), o que pode sugerir que os níveis de células $CD4^+IFN-\gamma^+$ observados podem ter sido estimulados pelo Mtb.

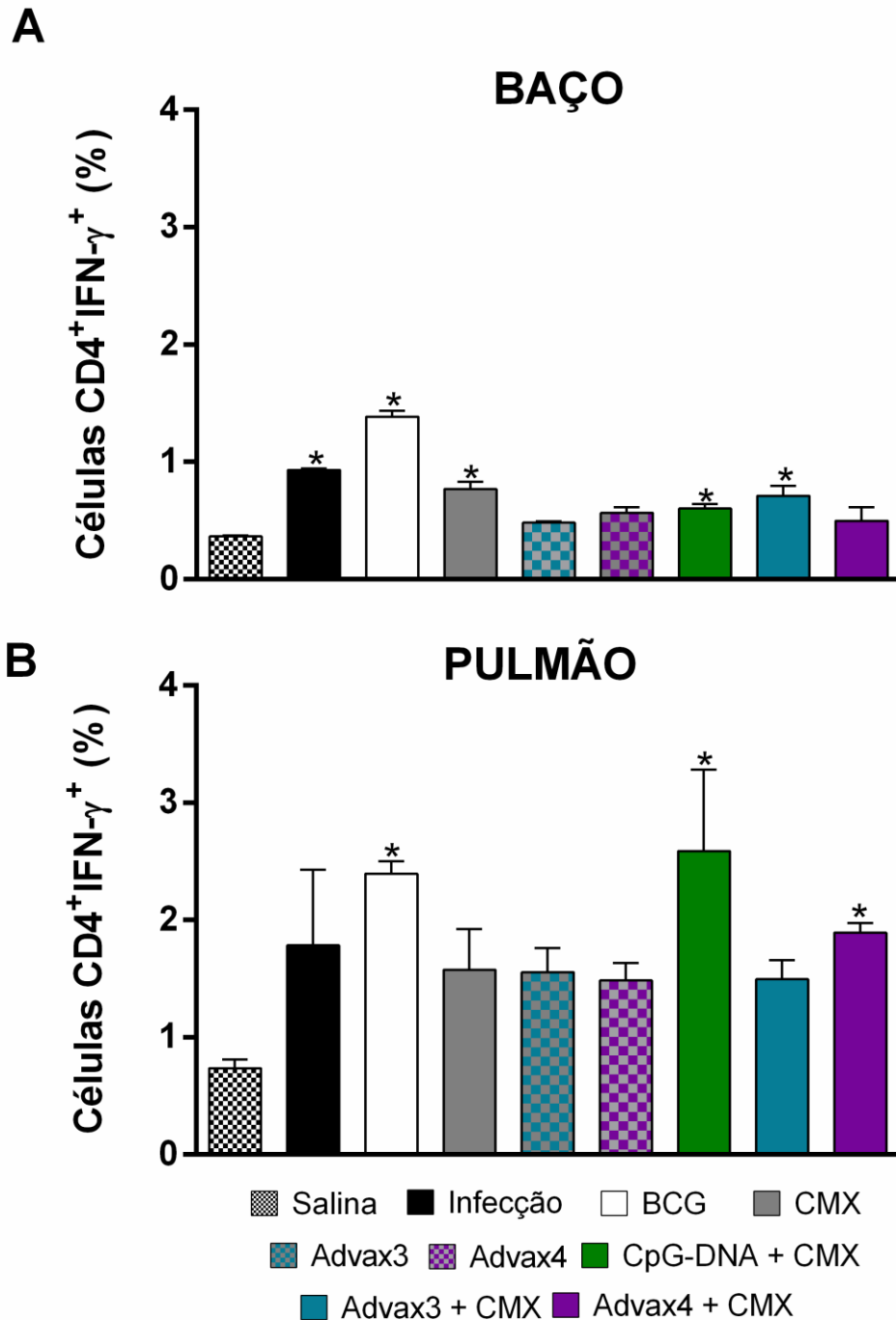
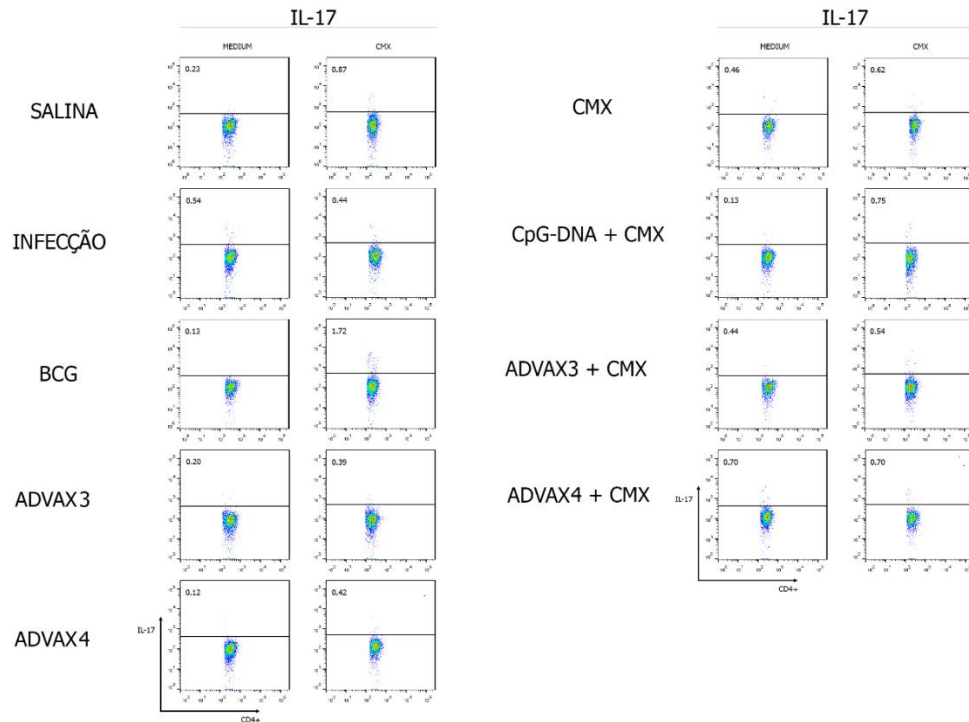


Figura 7 – Resposta imune específica celular induzida pelas formulações vacinais 45 dias após o desafio. Trinta dias após o terceiro esquema vacinal, os camundongos foram desafiados com H37Rv (10^5 UFC), exceto o grupo Salina. Quarenta e cinco dias depois, três animais de cada grupo foram eutanasiados e tiveram o baço e o pulmão coletados. As células foram cultivadas *ex-vivo* e reestimuladas com r-CMX. Células marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-IFN- γ foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de linfócitos CD4⁺ IFN- γ ⁺ específicos para a proteína rCMX encontradas no baço. (B) Porcentagem de linfócitos CD4⁺ IFN- γ ⁺ específicos para a proteínas rCMX presente no pulmão dos camundongos. Diferença estatística avaliada por *One way ANOVA* e pós teste *Kruskal Wallis*. *($p < 0.001$)

Questionou-se se as formulações vacinais seriam capazes de induzir células T $CD4^+IL-17^+$, que são importantes na proteção contra TB (MONIN et al., 2015). Quando as células T $CD4^+$ produtoras de IL-17 anti-CMX foram avaliadas aos quarenta e cinco dias após o desafio, não foi observada resposta específica para a proteína recombinante CMX (Figura 7), sendo as formulações vacinais fracas indutoras de células T $CD4^+IL-17^+$ específicas.

PULMÃO



BAÇO

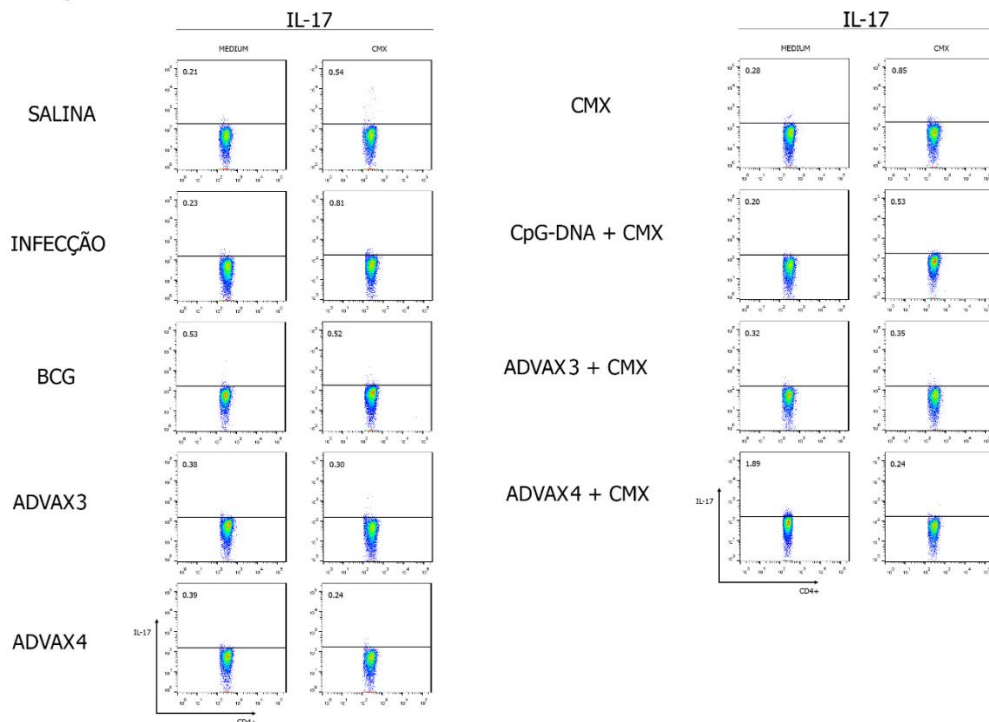
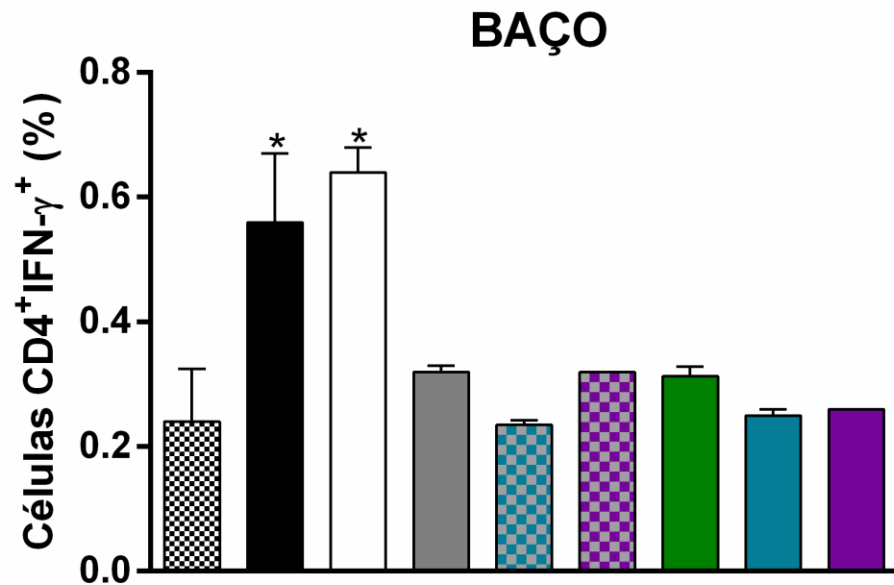


Figura 8 – Células CD4⁺ IL-17⁺ induzidas por estimulação *ex vivo* com rCMX. Baço e pulmão dos camundongos foram coletados 45 dias após desafio com H37Rv. Os órgãos foram processados e as células cultivadas e reestimuladas com rCMX. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-IL-17 e analisadas por citometria de fluxo. A imagem apresenta os plots de células CD4⁺ com a linha horizontal delimitando as células CD4⁺IL17⁺. Não é possível observar uma resposta específica desse perfil celular anti-CMX.

Para avaliar a resposta de células T $CD4^+IFN-\gamma^+$ no estágio crônico da infecção, noventa dias após o desafio, a quantidade de células T $CD4^+IFN-\gamma^+$ específicas para CMX foi avaliada. As formulações vacinais reduziram a níveis basais a quantidade de células Th1 e apenas os grupos infecção (controle) e vacinado com BCG induziram altos níveis de células T $CD4^+IFN-\gamma^+$ no baço (Figura 9A). No pulmão, somente o grupo vacinado com BCG conseguiu continuar estimulando células Th1 (Figura 9B).

A



B

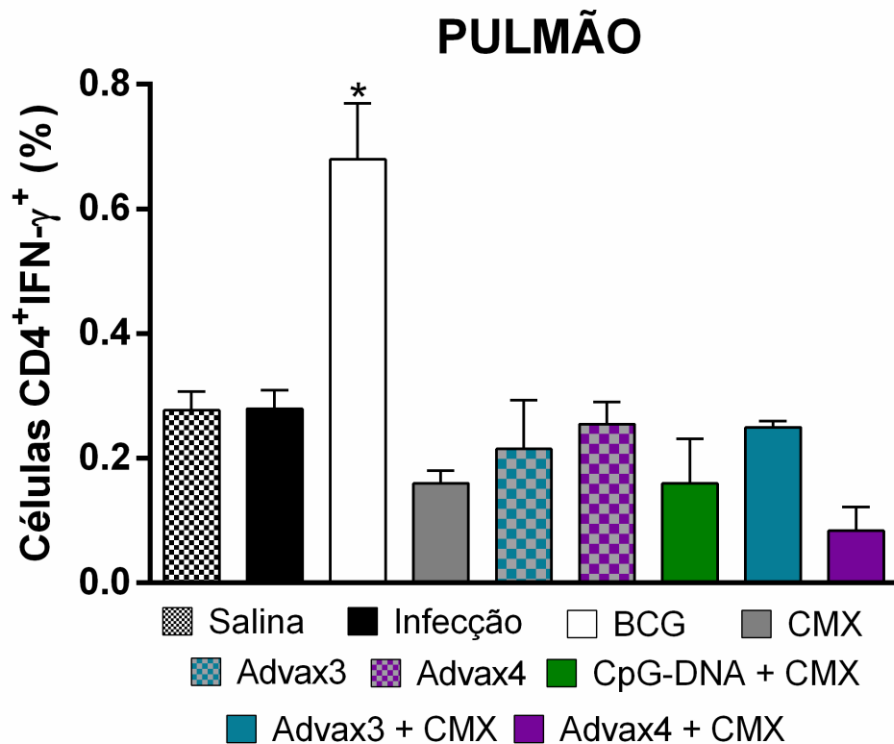


Figura 9 – Resposta imune específica celular induzida pelas formulações vacinais 90 dias após o desafio com Mtb. Três animais de cada grupo foram eutanasiados noventa dias após o desafio com H37Rv e tiveram o baço e o pulmão coletados. As células foram cultivadas *ex-vivo* e reestimuladas com r-CMX. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-IFN-γ e avaliadas por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de linfócitos CD4⁺ IFN-γ⁺ específicos para a proteína rCMX encontradas no baço. (B) Porcentagem de linfócitos CD4⁺ IFN-γ⁺ específicos para a proteínas rCMX presente no pulmão dos camundongos. Foram avaliados 6 animais por grupo. Diferença estatística avaliada por *One way ANOVA* e pós teste *Kruskal Wallis*. *(p<0.001)

Redução Parcial no Infiltrado Inflamatório Pulmonar

Para avaliar o comprometimento pulmonar causado pela infecção pelo Mtb, o lóbulo caudal direito de cada camundongo foi preparado para corte histológico e avaliado por HE. No primeiro ponto experimental (45 dias após o desafio), a análise do tecido pulmonar dos animais do grupo salina, 45 dias após o desafio, foi confirmado a preservação das estruturas do tecido funcional do pulmão, alvéolos, brônquios, bronquíolos, mostrando que o grupo não apresenta sinais de infecção (Figura 10A). O grupo infecção apresentou a parede dos septos alveolares espessas, parede das arteríolas espessas e presença de infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares e pequenos focos hemorrágicos (Figura 10B). O grupo CMX apresentou preservação da arquitetura pulmonar; leve infiltrado inflamatório moderado com predominância de células mononucleares e pequenos acúmulos de macrófagos com aspecto xantomatoso (Figura 10D). O grupo Advax3 apresentou focos de alteração da estrutura pulmonar devido à infiltração de células inflamatórias mononucleares, alguns pontos de colapso dos septos alveolares, presença de focos esparsos de hemorragia intra-alveolar e vasos congestos. (Figura 10E). O grupo Advax4 apresentou focos inflamatórios mais dispersos do que no grupo Advax3; espessamento dos septos alveolares e alguns pontos de colapso das estruturas alveolares, acúmulo discreto de macrófagos xantomatosos dispersos e vasos sanguíneos congestos. (Figura 10F).

O grupo CpG-DNA + CMX apresentou vasos sanguíneos congestos e regiões de hemorragia intra-alveolar; infiltrado inflamatório intenso com predomínio de células mononucleares e alguns focos de macrófagos com aspecto xantomatoso (Figura 10G). O grupo Advax3 + CMX apresentou regiões de colapso das estruturas alveolares com comprometimento funcional de algumas regiões dos lóbulos; infiltrado inflamatório intenso em algumas áreas e disperso em outras, com presença de alguns focos de macrófagos com aspecto xantomatoso; espessamento da parede de algumas arteríolas e vasos sanguíneos congestos (Figura 10H) e Advax4 + CMX (Figura 10I) apresentou focos de infiltrado inflamatório, mas em menor quantidade em comparação aos outros grupos; sem comprometimento da arquitetura do pulmão e regiões não afetadas; raros macrófagos com aspecto xantomatoso; presença de vasos sanguíneos congestos e regiões de hemorragia intra-alveolar. A vacina BCG foi a única que conseguiu reduzir significativamente o infiltrado inflamatório (Figura 10C) apresentou discretos focos

inflamatórios com predominância de células mononucleares, preservação das paredes dos septos alveolares, brônquios, bronquíolos, espessamento de arteríolas.

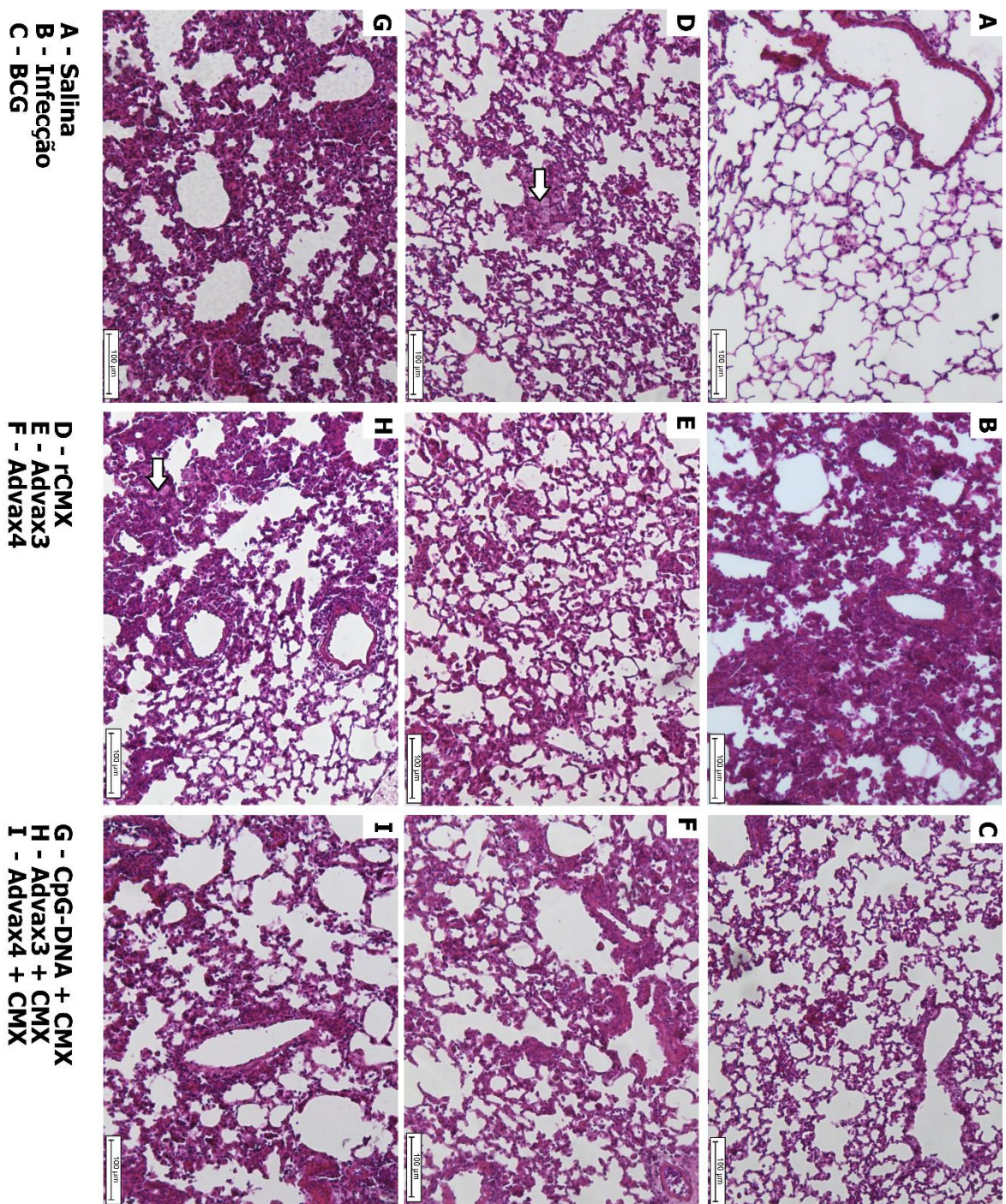


Figura 10 – Histopatológico representativo do pulmão de camundongos BALB/c 45 dias após o desafio com Mtb. Camundongos vacinados com as três doses vacinais foram desafiados com 10^5 UFC e quarenta e cinco dias após, animais de cada grupo experimental foram eutanasiados e tiveram um lóbulo do pulmão coletado. Foram avaliados 6 animais por grupo. Os tecidos foram corados com HE e as imagens (A a I) apresentam aumento de 10X. Barras representam 100µm. Seta branca indica macrófagos xantomatosos

O grupo salina teve preservação das estruturas do tecido funcional do pulmão, alvéolos, brônquios e bronquíolos, mostrando que o grupo não apresenta infecção (Figura 11A); ao contrário, o tecido pulmonar dos animais desafiados com Mtb (Figura 11B) apresentou sinais claros de infecção, apresentando colapso dos espaços alveolares devido à intensa aglomeração de células inflamatórias dispersas no tecido, com predomínio de células mononucleares. Além disso, observou-se grande acúmulo de macrófagos com aspecto xantomatoso.

A avaliação do tecido pulmonar dos animais vacinados com BCG (Figura 11C) mostrou espessamento das paredes dos septos alveolares e dos brônquios, acúmulo discreto de macrófagos xantomatosos, além de intensa infiltração de células inflamatórias mononucleares dispersas no tecido, entretanto em menor quantidade quando comparado ao grupo infectado. Na avaliação do grupo imunizados com CMX (Figura 11D), observou-se um o espessamento das paredes dos septos alveolares e dos brônquios, acúmulo moderados de macrófagos com aspecto xantomatoso, além de intenso infiltrado inflamatório, com predominância de células mononucleares.

A avaliação histológica do tecido pulmonar dos animais que foram inoculados apenas com o adjuvante Advax3 (Figura 11E) mostrou espessamento das paredes dos septos alveolares e dos brônquios, com colapso dos espaços alveolares devido ao intenso acúmulo de macrófagos com aspecto xantomatoso, além de intensa infiltração de células inflamatórias no tecido, maior do que os níveis observados no grupo infecção e no grupo CMX. Na avaliação do grupo inoculado com o adjuvante Advax4 (Figura 11F) observou-se a presença de pequenos focos de hemorragia intra-alveolar, espessamento das paredes dos septos alveolares e dos brônquios, acúmulo discreto de macrófagos xantomatosos, além da presença de infiltrado inflamatório moderado, com predomínio de células mononucleares, entretanto em menor intensidade que o observado nos grupos infecção (Figura 11B), CMX (Figura 11D) e Advax3 (Figura 11E).

Na avaliação histológica do tecido pulmonar dos animais submetidos à imunização com CpG-DNA + CMX (Figura 11G), observou-se o espessamento das paredes dos septos alveolares e dos brônquios, alguns vasos sanguíneos septais congestos e acúmulo moderado de macrófagos com aspecto xantomatoso dispersos no tecido, além da presença de infiltrado inflamatório moderado, com predomínio de células mononucleares, semelhante ao observado nos grupos CMX e Advax3. A avaliação do tecido pulmonar dos animais imunizados com Advax3 + CMX (Figura 11H) mostrou espessamento das paredes

dos septos alveolares e dos brônquios, acúmulo discreto de macrófagos com aspecto xantomatoso dispersos no tecido e presença de infiltrado inflamatório moderado, com predomínio de células mononucleares, quando comparado ao grupo Advax3. A avaliação do tecido pulmonar de camundongos imunizados com Advax4 + CMX permitiu observar a o espessamento das paredes dos septos alveolares, com preservação da arquitetura do órgão e infiltrado inflamatório reduzido, quando comparado aos grupo infecção, CMX, Advax3, Advax4 e Advax3 + CMX.

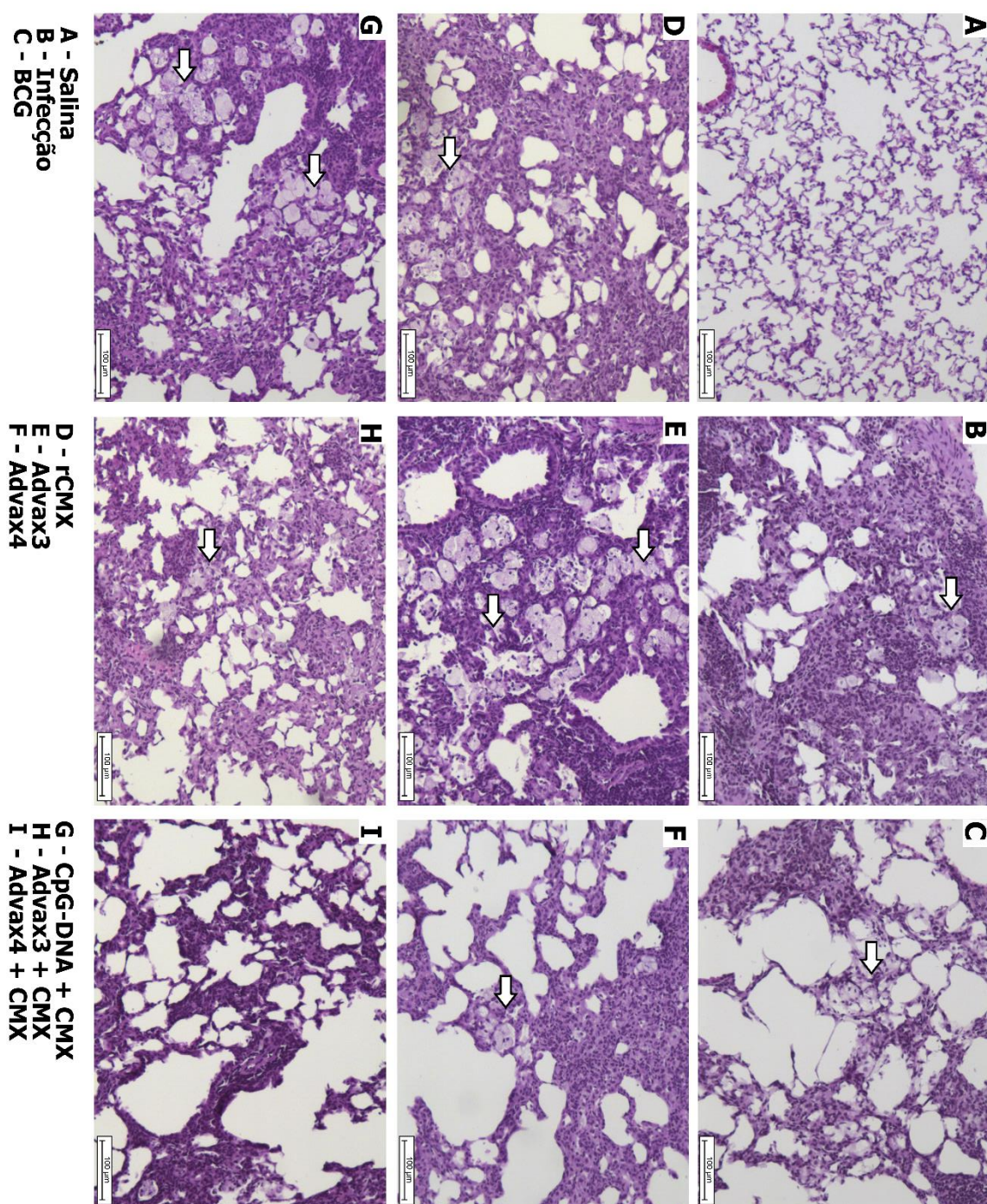


Figura 11 – Histopatológico representativo do pulmão de camundongos BALB/c 90 dias após o desafio com Mtb. Camundongos vacinados com as três doses vacinais foram desafiados com 10^5 UFC e noventa dias após, animais de cada grupo experimental foram eutanasiados e tiveram um lóbulo do pulmão coletado. Foram avaliados 6 animais por grupo. Os tecidos foram corados com HE e as imagens (A a I) apresentam aumento de 10X. Barras representam 100µm. Seta brancas indicam macrófagos xantomatosos.

As formulações Advax3 + CMX e Advax4 + CMX não conferem proteção

Para avaliar a proteção conferida pelas vacinas, foi determinada a carga bacilar presente nos pulmões (Figura 12). Quarenta e cinco dias após o desafio, apenas o grupo vacinado com BCG conseguiu reduzir a carga bacteriana no pulmão, em três escalas logarítmicas, que se manteve aos noventa dias após o desafio. Nenhuma das formulações vacinais conseguiu reduzir a carga bacteriana e não conferiu, assim, proteção. Deste modo, apesar das vacinas serem imunogênicas (Figura 4 e 5), a resposta imune humoral e a celular gerada (Figura 7 e 9) foi insuficiente para combater o Mtb no pulmão dos camundongos.

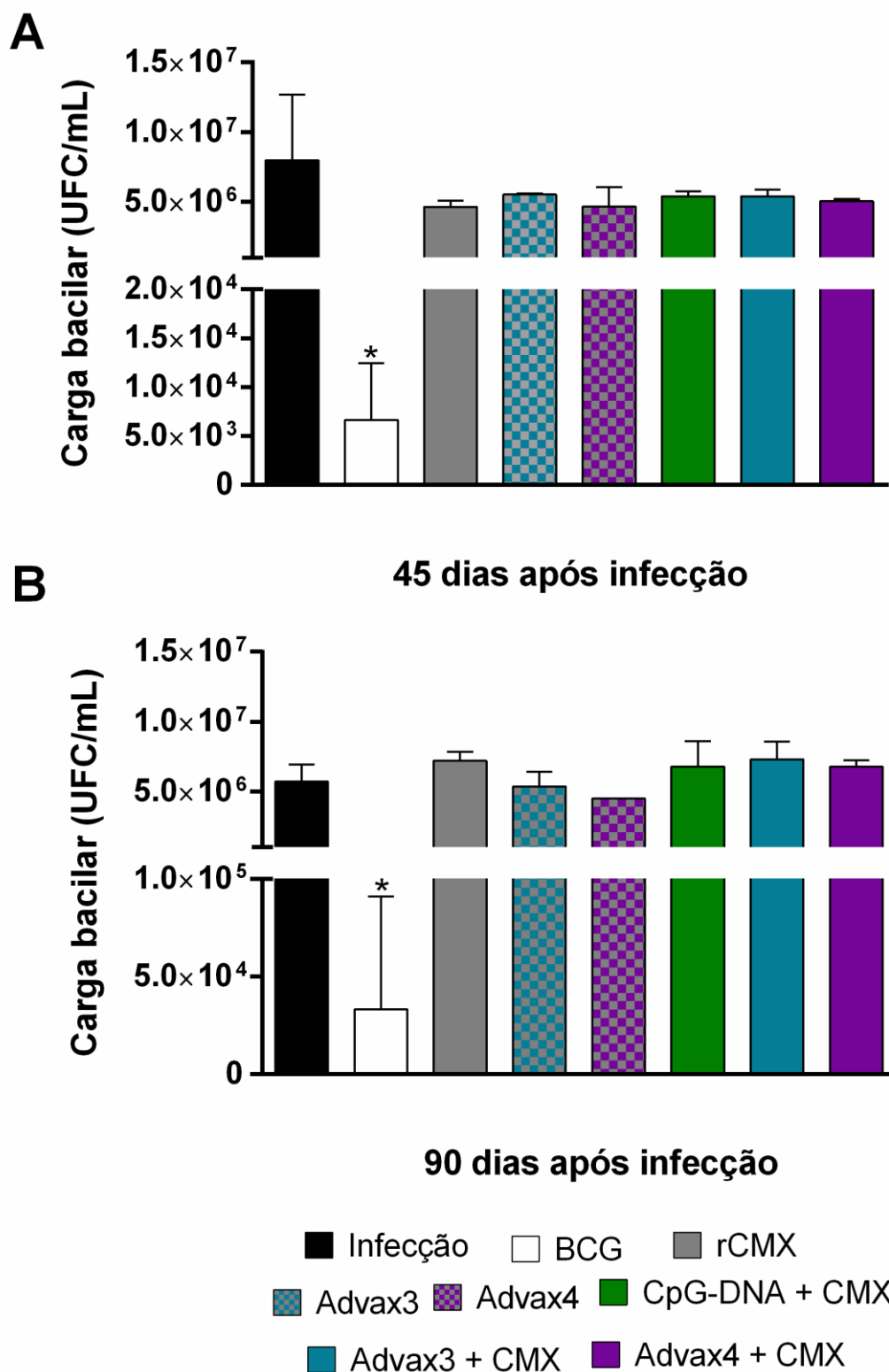


Figura 12 – Carga bacilar em camundongos BALB/c previamente vacinados e desafiados com H37Rv. Camundongos foram desafiados com H37Rv e quarenta e cinco (A) e noventa (B) dias após a infecção, três animais de cada grupo foram eutanasiados e tiveram um lóbulo destinado a contagem da carga bacilar. O pulmão foi diluído 10^{-3} vezes e o homogenato plaqueado em meio 7H11. Diferença estatística avaliada por *One way ANOVA* e pós teste *Kruskal Wallis*. *($p < 0.001$).

Como o intuito do trabalho era avaliar a proteção vacinal das novas formulações vacinais, Advax3 + CMX e Advax4 + CMX, e portanto a sobrevivência dos animais após a infecção foi acompanhada. Um grupo de animais vacinados e desafiados com *Mtb* foram avaliados durante 200 dias após o desafio. Os grupos vacinados com Advax3 + CMX e Advax4 + CMX foram aqueles que apresentaram maior porcentagem de sobrevivência quando comparados ao grupo vacinado GPG-DNA+ CMX e o grupo infecção (controle) (Figura 13). Portanto, apesar de não terem causado a redução da carga bacilar dos animais, as formulações vacinais aumentaram a sua sobrevivência.

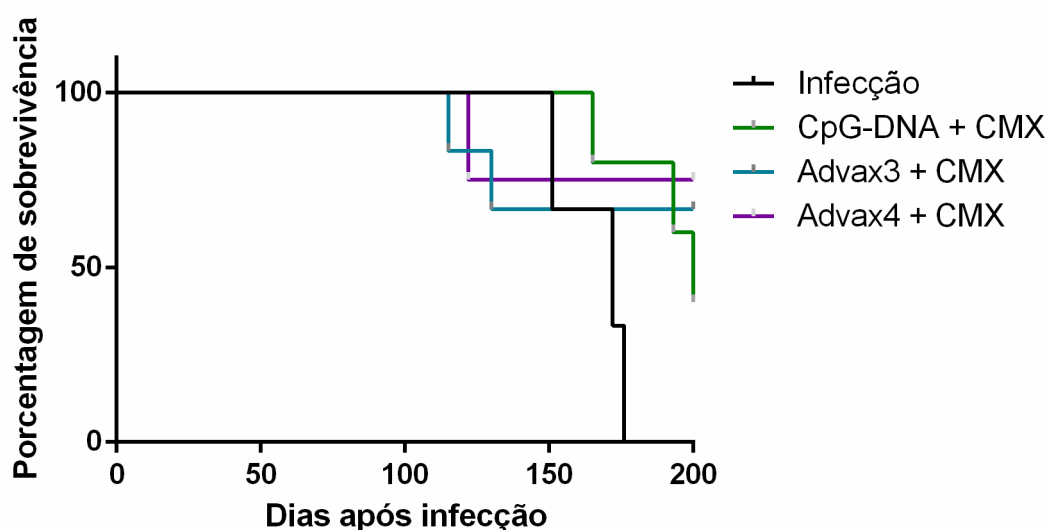


Figura 13 – Curva de Mortalidade. Os animais desafiados com *Mtb* imunizados com as três formulações vacinais foram observados até 200 dias após a infecção. O gráfico demonstra a porcentagem de sobrevivência.

Ensaio vacinal com a proteína rECMX

Como as formulações Advax3 + CMX e Advax4 + CMX não foram capazes de proteger camundongos infectados com *Mtb*, nosso grupo questionou se o problema poderia ser a proteína em estudo, a rCMX. Para retirar essa dúvida, foi escolhida outra proteína de fusão, a rECMX, que contém o gene da CMX fundido com o gene do ESAT6, supondo que aumentando os epítomos imunodominantes do antígeno poderíamos amplificar a resposta imune gerada. Como o ensaio com Advax4 demonstrou melhor resposta, levando

em consideração a redução do infiltrado inflamatório pulmonar e o aumento da sobrevida, a nova formulação foi composta de Advax4 + ECMX.

Para avaliar a capacidade da vacina Advax4 + ECMX em estimular células do sistema imune adaptativo de modo específico à rECMX, foi dosado os níveis de anticorpos anti-ECMX no soro dos camundongos, trinta dias após cada imunização. Foram observados altos níveis de anticorpos IgG2a e IgG1 anti-ECMX após a segunda vacinação, quando comparado com o grupo salina (Figura 14), e quando comparado com os níveis de anticorpos gerados após a primeira imunização, evidenciou-se a necessidade do esquema triplo de vacinação para manter os altos níveis de anticorpos observados.

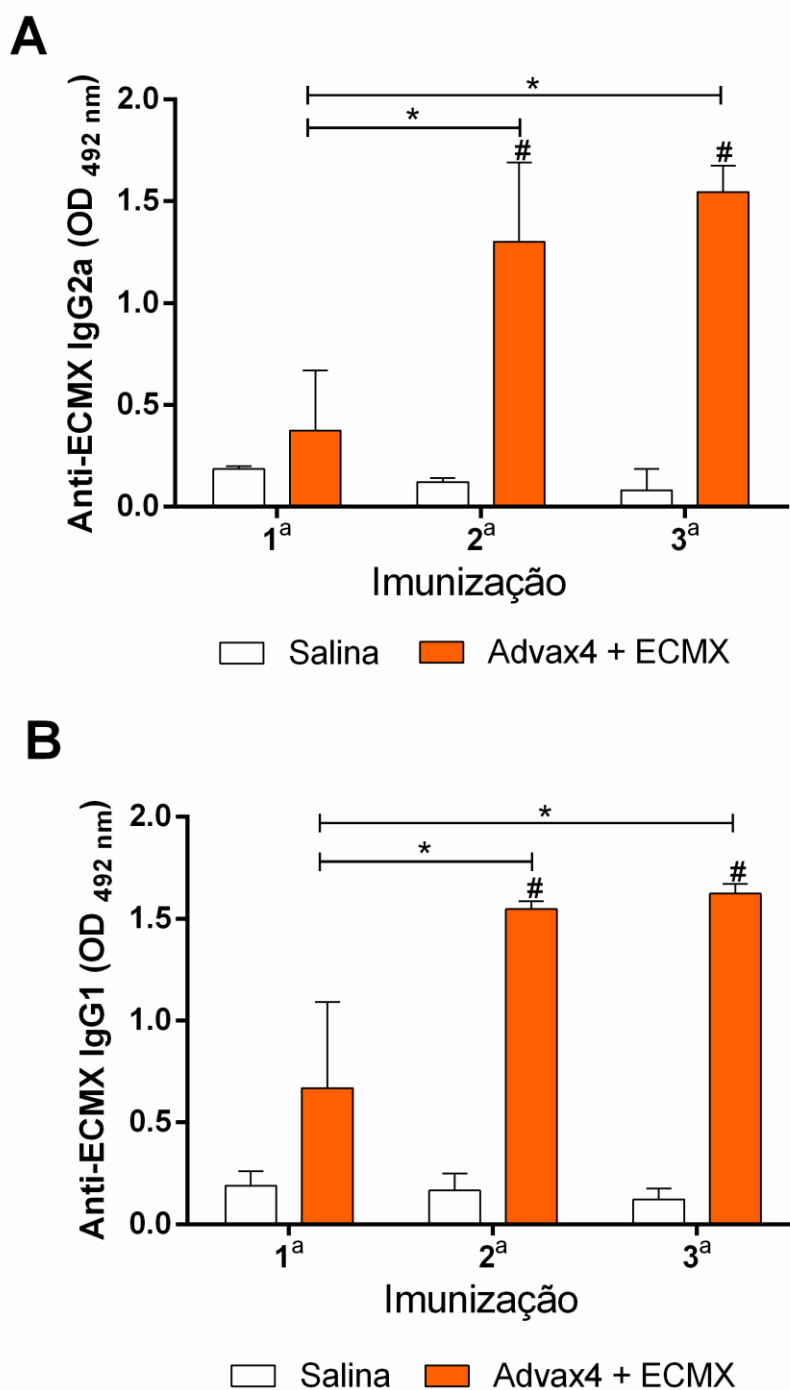


Figura 14 – Resposta imune humoral (IgG2a e IgG1) anti-ECMX induzida durante a vacinação. Camundongos BALB/c fêmeas de oito semanas foram vacinados com o adjuvante Advax4 em combinação com a proteína de ECMX. Foram realizadas três imunizações em cada grupo vacinal, com um intervalo de trinta dias. Trinta dias após cada imunização, sangue foi coletado do plexo retro orbital de cada camundongo para separação do soro e detecção dos níveis de anticorpos por ELISA (A) A vacina Advax4 contendo ECMX tem altos níveis de anticorpos IgG2a induzidos a partir da segunda imunização. (B) A vacina Advax4 + ECMX induz altos níveis de anticorpos IgG1 após a segunda imunização. # Diferença estatística entre as OD dos animais vacinados e as ODs do grupo salina; * Diferença entre a DO obtida 30 dias após a primeira imunização e as DOs obtidas aos 60 e 90 dias após a vacinação ($p < 0.005$)

Para avaliar a resposta Th1 gerada nos grupos vacinados com Advax4 + ECMX após a infecção por Mtb, os camundongos foram desafiados 30 dias após a terceira vacinação. A formulação Advax4 + ECMX foi a formulação que induziu maiores níveis de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ no pulmão, após 45 dias de desafio, maior inclusive que o grupo infecção (controle) (Figura 15A). No baço, os níveis de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ foram residuais, abaixo do grupo salina (Figura 15B).

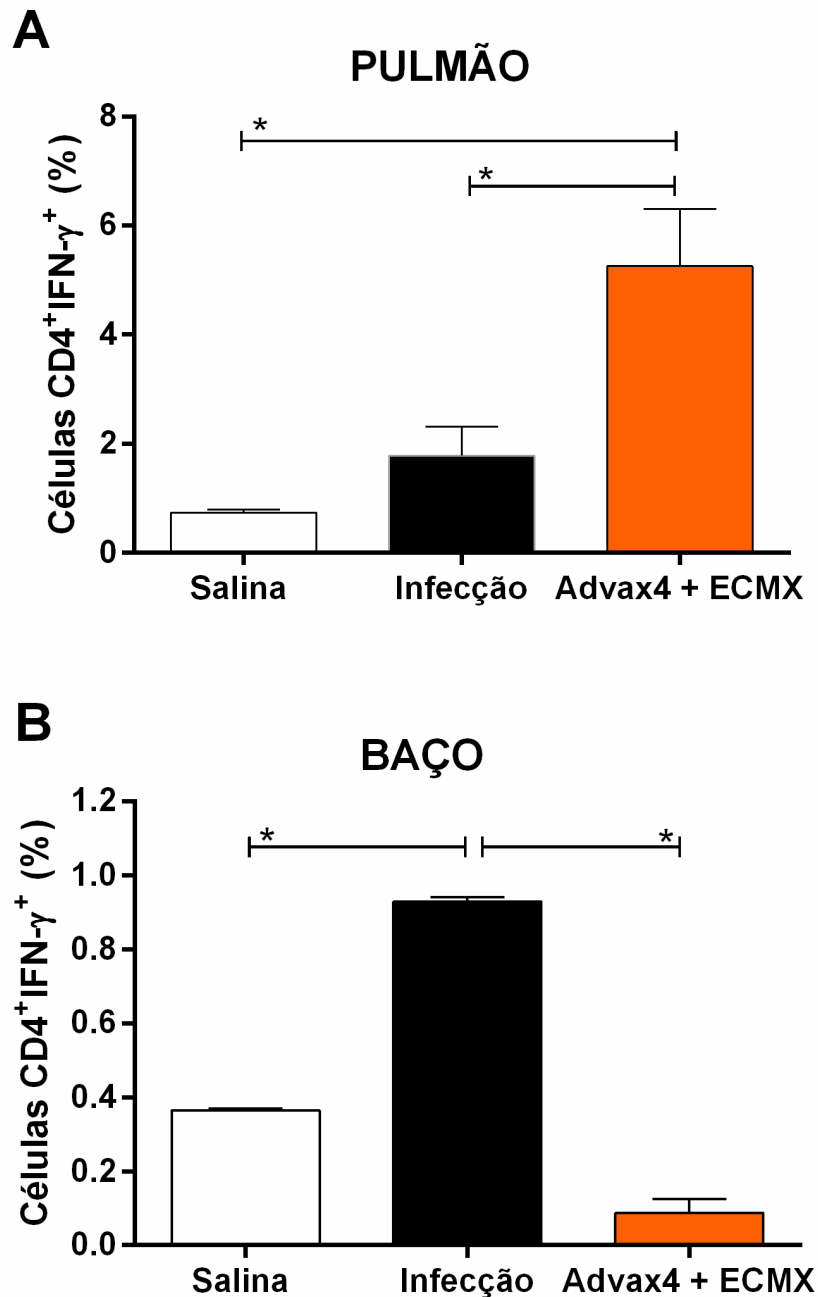


Figura 15 - Resposta imune específica celular induzida por Advax4 + ECMX 45 dias após o desafio. Três animais de cada grupo foram eutanasiados quarenta dias após o desafio com H37Rv e tiveram o baço e o pulmão coletados. As células foram cultivadas *ex-vivo* e reestimuladas com r-CMX. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-IFN- γ e avaliadas por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de linfócitos CD4⁺ IFN- γ ⁺ específicos para a proteína rCMX encontradas no pulmão. (B) Porcentagem de linfócitos CD4⁺ IFN- γ ⁺ específicos para a proteínas rCMX presente no baço dos camundongos. Diferença estatística avaliada por *One way ANOVA* e pós teste *Kruskal Wallis*. *($p < 0.001$)

Para avaliar se a formulação vacinal Advax4 + ECMX foi capaz de reduzir a inflamação causada por Mtb, o lóbulo caudal pulmonar foi coletado de cada camundongo para histologia. Após o desafio com Mtb, os camundongos vacinados com Advax4 + ECMX reduziram a inflamação pulmonar (Figura 16), apresentando apenas alguns focos de infiltração mononuclear. Estes resultados demonstram uma melhor eficácia da formulação Advax4 + ECMX.

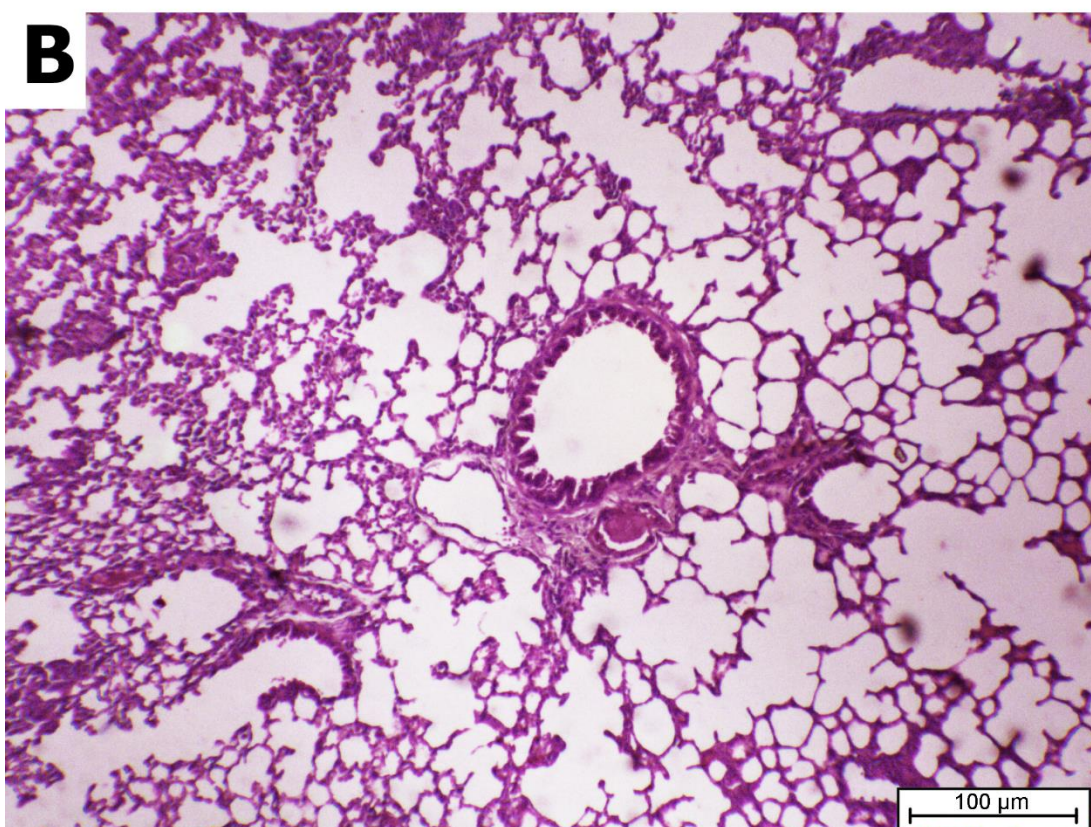
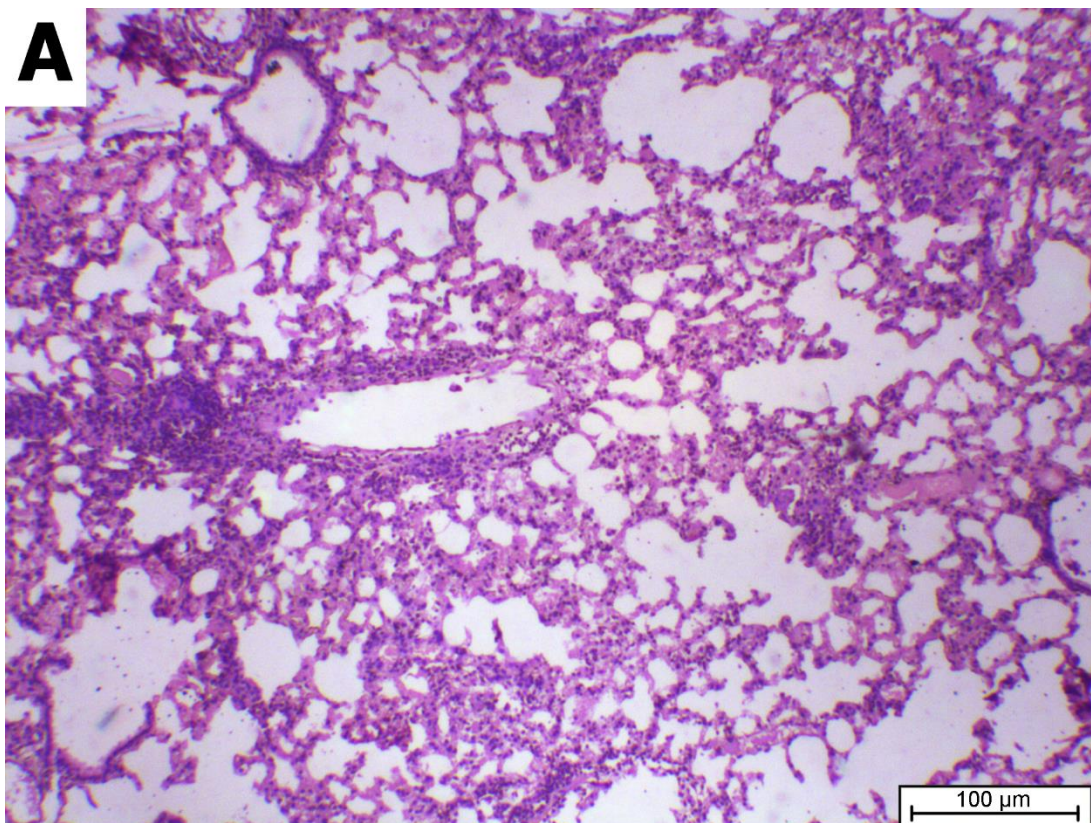


Figura 16 – Histopatológico representativo de pulmão de camundongos BALB/c 45 dias após a infecção. (A) Grupo infecção controle (B) Grupo infectado vacinado com Advax4 + ECMX. Os tecidos foram corados com HE e as imagens (A a I) apresentam aumento de 10X. Barras representam 100μm.

Por fim, para avaliar a capacidade da formulação Advax4 + ECMX em induzir proteção aos camundongos desafiados com Mtb, a carga bacilar pulmonar foi calculada (Figura 17). A vacina Advax4 + ECMX induziu redução de 1 Log na carga bacilar pulmonar. Esse resultado permite concluir que a formulação Advax4 + ECMX foi capaz de proteger contra Mtb.

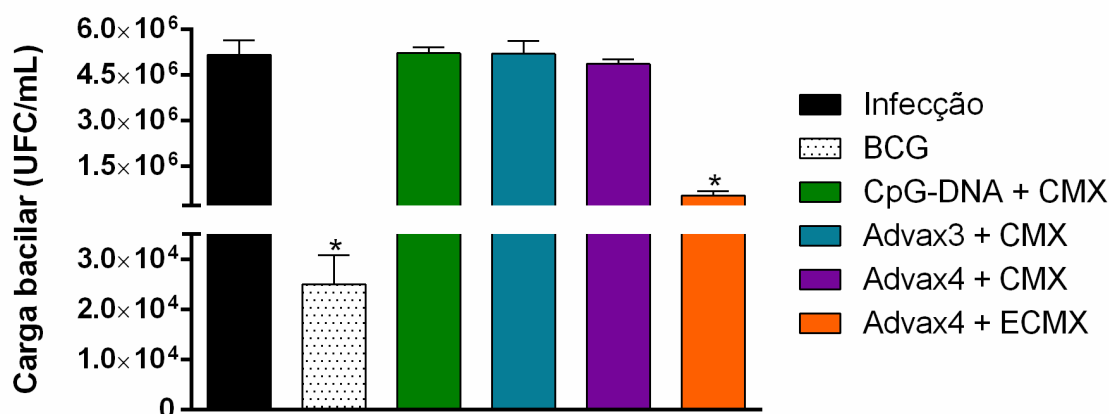


Figura 17 – Carga bacilar em camundongos BALB/c 45 dias após o desafio com Mtb. Camundongos foram desafiados com Mtb H37Rv e quarenta e cinco dias após a infecção, três animais de cada grupo foram eutanasiados e tiveram um lóbulo destinado a contagem da carga bacilar. O pulmão foi diluído 10⁻³ vezes e o homogenato plaqueado em meio 7H9. Diferença estatística avaliada por *One way ANOVA* e pós teste *Kruskal Wallis*. *(p<0.001).

Para resumir e comparar os resultados, o quadro 1 foi construindo utilizando as diferentes formulações vacinais e os critérios de resposta imune gerada, carga bacilar avaliada e redução da inflamação pulmonar (Quadro 1).

Quadro 1 – Resumo dos resultados

	Resposta IgG1	Resposta IgG2a	Resposta Th1	Carga Bacilar	Redução da inflamação pulmonar
CpG-DNA + CMX	+	+	+	+	-
Advax3 + CMX	+	+	+	+	-
Advax4 + CMX	+	+	+	+	+
Advax4 + ECMX	+	+	++	-	++

Quadro 1 – Principais resultados observados com as diferentes formulações vacinais. O símbolo + representa presença do fator avaliado na coluna correspondente e o símbolo – representa ausência. A presença de dois símbolos + representa maior intensidade do fator observado.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, realizamos ensaios de imunogenicidade utilizando novas formulações vacinais. Para tal, camundongos BALB/c receberam 3 doses de vacinas de subunidade proteica, com a proteína recombinante CMX e diferentes adjuvantes, Advax3, Advax4 e CpG-DNA. As vacinas estimularam aumento da celularidade no local da inoculação e conseguiram ativar células endoteliais vasculares e linfáticas nos linfonodos drenantes. Após a primeira dose, os camundongos vacinados com Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e CpG-DNA + CMX geraram resposta imune humoral do tipo IgG2a. Após a segunda dose, os camundongos vacinados com as vacinas citadas induziram resposta do tipo IgG1. Os altos níveis de anticorpos IgG2a e IgG1 se mantiveram até a terceira vacinação. Os camundongos foram desafiados com Mtb e a análise após 45 dias, as vacinas BCG, Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e CpG-DNA + CMX mostraram respostas do tipo Th1 específicas. Entretanto, a resposta celular do tipo Th17 não foi observada. Num segundo ponto experimental, noventa dias após o desafio, a resposta celular Th1, observada previamente no baço e no pulmão, reduziu e apenas a BCG conseguiu manter altos níveis de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺. Nos cortes histológicos, foi possível observar que apesar da queda nos níveis de Th1, a formulação Advax4+CMX conseguiu reduzir o infiltrado inflamatório e manter a arquitetura tecidual. As formulações Advax3 + CMX e Advax4 + CMX conseguiram prolongar a sobrevida dos animais, mas nenhuma das vacinas, exceto a BCG, conseguiu reduzir a carga bacilar nos pulmões dos camundongos infectados. Para testar a capacidade do Advax4 como potencial adjuvante na TB, outra proteína foi escolhida, a ECMX, que conseguiu induzir altos níveis de anticorpos IgG2a e IgG1, aumentar a resposta de células Th1, reduzir o dano inflamatório no pulmão dos camundongos e reduzir a carga bacilar. Novos estudos podem melhorar a formulação Advax4 + ECMX, como potencial vacina contra TB.

O sistema linfático apresenta importante papel ao trazer células, antígenos e outras substâncias do tecido periférico para os linfonodos drenantes. Nestes locais, o linfócito cognato ao antígeno o reconhece e respostas imunes específicas são geradas afim de combater um possível patógeno (DIETERICH; SEIDEL; DETMAR, 2014). Assim, se uma vacina (adjuvante e antígeno) são suficientemente pequenos para serem carregados para o linfonodo drenante, não há a necessidade de induzir inflamação no sítio de inoculação (SWARTZ; HUBBELL; REDDY, 2008). Advax3 + CMX foi capaz de aumentar o número

total de BECs, enquanto tanto Advax3+CMX e Advax4 + CMX foram capazes de aumentar o número total e a porcentagem de LECs, dois dias após a inoculação. LECs expressam TLR2 e TLR4 (KUROSHIMA et al., 2004), assim a proliferação dessas células pode estar ligada a ativação por componentes do Advax™, permitindo um maior influxo de DCs carreando as vacinas. As LECs têm a capacidade de guardar antígenos viral e continuar estimulando células T CD8+ de memória (TAMBURINI; BURCHILL; KEDL, 2014). Assim, elas podem atuar diretamente com células T e estar ligada à eficácia de uma vacina. Portanto, as formulações Advax3+CMX e Advax4+CMX não induzem inflamação no local da inoculação (Figura 2K e 2J), mas são carregadas para os linfonodos drenantes e são capazes de ativar BEC, LEC e macrófagos locais.

Voluntários vacinados com BCG tiveram aumentos sucessivos nos níveis de anticorpos da classe IgG anti-LAM (DE VALLIÈRE, 2005), podendo a resposta humoral ter um papel na proteção contra a TB. Tendo isso em mente, avaliamos os níveis de IgG2a e IgG1 nos camundongos após cada imunização, e as formulações CpG-DNA + CMX, Advax3 + CMX, Advax4 + CMX e Advax4 + ECMX foram capazes de induzir altos níveis de ambas as classes, a partir da primeira ou da segunda vacinação (Figuras 3, 4 e 14). Castañon-Arreola et al. (2005) conseguiu relacionar proteção em camundongos vacinados com uma rBCG e anticorpos IgG2a. Entretanto, nossas formulações vacinais também induziram altos níveis de IgG1 (resposta Th2), podendo contrabalancear o papel protetor de IgG2a (DWIVEDI et al., 2012). Anticorpos podem agir por meio da opsonização do Mtb, sinalização através de receptores Fc, ativação do complemento e modulação da resposta inflamatória (CASADEVALL; PIROFSKI, 2006; ACHKAR; CHAN; CASADEVALL, 2015).

Os animais vacinados com BCG, CpG-DNA + CMX, Advax4 + CMX e Advax4 + ECMX conseguiram elevar os níveis de células Th1 no pulmão frente ao desafio com Mtb. Células T CD4+ apresentam um papel importante durante a infecção por Mtb, por mediar a proteção, contribuir com a inflamação e regular a resposta imune (LYADOVA; PANTELEEV, 2015). A necessidade de células T CD4+ foi comprovada por Saunders et al., (2002) ao infectar camundongos CD4+KO com Mtb, com um aumento exacerbado da carga bacteriana. A importância das células Th1 está na liberação de IFN- γ e ativação dos macrófagos, para combate direto ao microrganismo, pela maturação dos fagolisossomos e formação dos reativos de oxigênio e nitrogênio (WEISS; SCHAIBLE, 2015). Na TB, esses reativos de nitrogênio podem impedir a proliferação direta do Mtb e culminar com a sua destruição (LYADOVA; PANTELEEV, 2015).

As lesões pulmonares avaliadas em dois pontos experimentais (45 e 90 dias após o desafio com Mtb) permitiram observar o agravamento da condição pulmonar nos camundongos doentes. No primeiro ponto, os camundongos conseguiam, seja pela vacina ou pela própria capacidade de resistir ao patógeno, conter os bacilos de Mtb em alguns focos inflamatórios espalhados. De modo geral, a inflamação se agravou em todos os grupos infectados aos 90 dias após a infecção, com espessamento da parede dos septos alveolares, focos hemorrágicos e intenso infiltrado inflamatório mononuclear, com regiões de folículos linfóides. Advax4 + CMX e Advax4 + ECMX conseguiram reduzir os danos causados pela inflamação no pulmão. Esse efeito pode estar diretamente ligado à resposta Th1, que ativa macrófagos a liberar NO (macrófagos M1) que modula endotelina-1 e causa vasoconstrição nos vasos sanguíneos locais, impedindo o recrutamento de células mononucleares para o pulmão (BOURQUE; DAVIGDE; ADAMS, 2011).

Advax4 + ECMX foi a única formulação vacinal capaz de gerar proteção. Esse evento pode estar diretamente ligado à presença da ESAT-6 na ECMX. O Mtb depende do ESAT-6 para sobreviver. Quando esta molécula é usada em vacina, pode culminar no reconhecimento direto de células T e anticorpos específicos ao ESAT-6 e culminar em sua inibição ou talvez bloqueio. Por exemplo, o Mtb estaria impedido de, juntamente ao CFP-10, inibir a sua apresentação por APCs às células imunes adaptativas (SREEJIT et al., 2014). A ausência de proteção pelas outras formulações vacinais pode estar ligada à diminuição dos níveis de IFN- γ secretados pelas células Th1 após 90 dias de infecção. Mittrücker et al. (2007) também desenvolveu uma vacina que gerou a indução de células produtoras de IFN- γ frente ao Mtb, mas não foi o suficiente para conferir uma proteção. Outros estudos sugerem que a proteção vacinal pode não estar associada apenas ao IFN- γ (SAKAI et al., 2016). Outra possibilidade é a incapacidade de gerar células de memória (HENAO-TAMAYO; ORDWAY; ORME, 2014). As formulações vacinais podem não ter sido capazes de gerar um estímulo forte o suficiente para que as células CD4⁺IFN- γ ⁺ tenham se diferenciado em células de memória.

O Advax, como foi observado nos cortes histológicos no local da inflamação, não é inflamatório, mas consegue recrutar células o suficiente para carrear a vacina e ativar os linfonodos drenantes. Além do mais, conseguiu induzir respostas imunes humoral e celular. Para a TB, a adição de IL-17/IL-23 à formulação Advax4 + ECMX pode ser o ponto chave na melhora dessa formulação como vacina. Fatores estimuladores de neutrófilos também podem aumentar os níveis de IL-17, importante na proteção contra TB (TRENTINI et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

A formulações vacinais contendo Advax3 + CMX e Advax4 + CMX foram capazes de ativar células linfonodais, assim como induzir anticorpos da classe IgG2a e IgG1 e linfócitos Th1. No entanto, não reduziram a carga bacilar induzida pela infecção com Mtb. A presença de Advax4 na formulação gerou redução das lesões pulmonares induzidas pela infecção por Mtb, que não foi observado quando Advax3 foi utilizado. Modificando a proteína recombinante CMX pela adição da proteína ESAT-6, a formulação vacinal contendo Advax4 + ECMX além de ser imunogênica foi capaz de proteger os animais desafiados com *M. tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

AERAS. **Global Clinical Portfolio of TB Vaccine Candidates**. [S.I.]: [S.N.], 2017. Disponível em: <<http://www.aeras.org/pages/global-portfolio>>. Acesso em: 15 mar. 2017, 11:03:45.

ABADIE, V. et al. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. **Blood**, v. 106, p. 1843-1850, 2005.

ACHKAR, J. M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase- and MPT51-based serodiagnostic assay as an adjunct to rapid identification of pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 11, p. 1291-3, 2006.

ACHKAR; J. M., CHAN; J., CASADEVALL; A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunol Rev.**, v. 264, n. 1, p. 167-81, 2015.

AHSAN, M. J. Recent advances in the development of vaccines for tuberculosis. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 66-75, 2015.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

ALDERWICK, L. J. et al. The Mycobacterial Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 5, n. 8, 2015.

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. 656-62, 2005.

ANDERSEN, P., WOODWORTH J. S. Tuberculosis vaccines--rethinking the current paradigm. **Trends Immunol.**, v. 35, n. 8, p. 387-95, 2014.

ASTARIE-DEQUEKER, C. et al. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 2, 2009.

AWATE; S., BABIUK; L. A., MUTWIRI; G. Mechanisms of action of adjuvants. **Front Immunol.**, v. 4, n. 114, 2013.

BAFICA, A. et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. **J Clin Invest.**, v. 115, n. 6, p. 1601-6, 2005.

BASTOS, R. G. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495-503, 2009.

BECKER; K., SANDER; P. *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins in virulence and immunity - fighting with a double-edged sword. **FEBS Lett.**, v. 590, n. 21, p. 3800-19, 2016.

BEHAR S.M., DIVANHAHI M., REMOLD H. G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? **Nat Rev Microbiol.**, v. 8, n. 9, p. 668-74, 2010.

BERGONZOLI; G. et al. Determinants of tuberculosis in countries of Latin America and the Caribbean. **Rev Panam Salud Publica**, v. 39, n. 2, 2016.

BLOMGRAN, R. et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. **Cell Host Microbe.**, v. 11, n. 1, p. 81-90, 2012.

BOLLES, M. et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. **J Virol.**, v. 85, n. 23, p. 12201-15, 2011.

BOURQUE, S. L.; DAVIDGE, S. T.; ADAMS M. A. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 300, n. 6, p. R1288-95, 2011.

BRENNAN P. J., NIKAIIDO H. The envelope of mycobacteria. **Annu Rev Biochem.**, v. 64, p. 29-63, 1995.

BURRELL, L. S. et al. Aluminium phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure. **Vaccine.**, v. 19, n. 2-3, p. 275-81, 2000.

CALABRO, S. et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. **Vaccine.**, v. 29, n. 9, p. 1812-23, 2011.

CALMETTE, A. et al. La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG.", 1927.

CAMBIER, C. J. et al. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. **Nature**, v. 505, n. 7482, p. 218-22, 2014.

CARDONA, P. J. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinb).**, v. 86, n. 3-4, p. 273-89, 2006.

CASADEVALL; A., PIROFSKI; L. A. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. **Adv Immunol.**, v. 91, p. 1-44, 2006.

CASTAÑON-ARREOLA, M. et al. A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb).**, v. 85, n. 1-2, p. 115-26, 2005.

COMAS, I. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nat Genet.**, v. 45, n. 10, p. 1176-82, 2013.

COOPER C., MACKIE D. Hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine: a review of HEPLISAV™ safety and efficacy. **Expert Rev Vaccines.**, v. 10, n. 4, p. 417-27, 2011.

DA COSTA, A. C. et al. Recombinant BCG: Innovations on an Old Vaccine. Scope of BCG Strains and Strategies to Improve Long-Lasting Memory. **Front Immunol.**, 2014 v. 5, n. 152, 2014.

DARNELL, M. E. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vaccinated ferrets. **J Infect Dis.**, v. 196, n. 9, p. 1329-38, 2007.

DAVTYAN, H. et al. Alzheimer's disease Advax(CpG)- adjuvanted MultiTEP-based dual and single vaccines induce high-titer antibodies against various forms of tau and A β pathological molecules. **Sci Rep.**, v. 6, n. 28912, 2016.

DAY, C. L. et al. Induction and regulation of T-cell immunity by the novel tuberculosis vaccine M72/AS01 in South African adults. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 188, n. 4, p. 492-502, 2013.

DE SOUSA, E. M. et al. Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in mice and active TB infection. **PLoS One.**, v. 7, n. 10, 2012.

DE SWART, R. L. et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. **J Virol.**, v. 76, n. 22, p. 11561-9, 2002.

DE VALLIÈRE, S. et al. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. **Infect Immun.**, v. 73, n. 10, p. 6711-20, 2005.

DIETERICH; L. C., SEIDEL; C. D., DETMAR; M. Lymphatic vessels: new targets for the treatment of inflammatory diseases. **Angiogenesis.**, v. 17, n. 2, p.359-71, 2014.

DORMANS, J. et al. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. **Clin Exp Immunol.**, v. 137, n. 3, p. 460-8, 2004.

DWIVEDI; V. P. et al. *Mycobacterium tuberculosis* directs T helper 2 cell differentiation by inducing interleukin-1 β production in dendritic cells. **J Biol Chem.**, v. 287, n. 40, p.33656-63, 2012.

EVANS, T. G. et al. Preventive vaccines for tuberculosis. **Vaccine.**, v. 31, sup. 2:B223-6. 2013.

FARINACCI, M.; WEBER, S.; KAUFMANN, S. H. The recombinant tuberculosis vaccine rBCG Δ ureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. **Vaccine.**, v. 30, n. 52, p. 7608-14, 2012.

FAURHOLT-JEPSEN, D. et al. Diabetes is a risk factor for pulmonary tuberculosis: a case-control study from Mwanza, Tanzania. **PLoS One**, n. 8, 2011.

FINE, P. E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. **Lancet.**, v. 346, n. 8986, p. 1339-45, 1995.

FRANCHI; L., NÚÑEZ; G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. **Eur J Immunol.**, v.38, n. 8, p. 2085-9, 2008.

GELDENHUYS, H. et al. The tuberculosis vaccine H4:IC31 is safe and induces a persistent polyfunctional CD4 T cell response in South African adults: A randomized controlled trial. **Vaccine.**, v. 33 n. 30, p. 3592-9, 2015.

GORDON, D. L. et al. Human Phase 1 trial of low-dose inactivated seasonal influenza vaccine formulated with Advax™ delta inulin adjuvant. **Vaccine.**, v. 34, n. 33, p. 3780-3786, 2016.

GLENNY, A. T. et al. Immunological notes. XVII–XXIV. **J Pathol Bacteriol.**, v. 29, n. 1, p. 31-40, 1926.

GRODE, L. et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. **J Clin Invest.**, v. 115, n. 9, p. 2472-9, 2005.

GRUN, J. L.; MAURER, P. H. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. **Cell Immunol.**, v. 121, n. 1, p. 134-45, 1989.

GUO, S. et al. The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. **Med Hypotheses.**, v. 78, n. 3, p. 389-92, 2012.

HARPER J. et al. Mouse model of necrotic tuberculosis granulomas develops hypoxic lesions. **J Infect Dis.**, v. 205, n. 4, p. 595-602, 2012.

HAYASHI, M. Advax, a Delta Inulin Microparticle, Potentiates In-built Adjuvant Property of Co-administered Vaccines. **EBioMedicine.**, v. 15, p. 127-136, 2017.

HENAO-TAMAYO; M., ORDWAY; D. J., ORME; I. M. Memory T cell subsets in tuberculosis: what should we be targeting? **Tuberculosis (Edinb).**, v. 94, n. 5, p. 455-61, 2014.

HENRIKSEN-LACEY, M. et al. Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenicity of soluble antigen. **J Control Release.**, v. 142, n. 2, p. 180-6, 2010.

HOFFMANN, C. et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane; Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, p. 3963-3967, 2008.

HONDA-OKUBO, Y. et al. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus vaccines formulated with delta inulin adjuvants provide enhanced protection while ameliorating lung eosinophilic immunopathology. **J Virol.**, v. 89, n. 6, p. 2995-3007, 2015.

HONDA-OKUBO, Y.; SAADE, F.; PETROVSKY, N. Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses. **Vaccine.**, v. 30, n. 36, p. 5373-81, 2012.

HUYGEN, K. The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of *M. tuberculosis*. **Front Immunol.**, v. 5, p. 321, 2014.

JACKSON, M. The Mycobacterial Cell Envelope – Lipids. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 10, 2014.

JAIN, R. et al. 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, e3869, 2008.

JORDAN, M. B. et al. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. **Science.**, v. 304, n. 5678, p. 1808-10, 2004.

JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. et al. Prime-boost with *Mycobacterium smegmatis* recombinant vaccine improves protection in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One.**, v. 8, n. 11, e78639, 2013.

KANG, D. D. et al. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. **PLoS One**, v. 6, 2011.

KASHYAP, R. S. et al. Laboratory investigations on the diagnosis of tuberculosis in the malnourished tribal population of melghat, India. **PLoS One.**, v. 8, n. 9, e74652, 2013.

KAUFMANN, S. H. The BCG replacement vaccine VPM1002: from drawing board to clinical trial. **Expert Rev Vaccines.**, v. 13, n. 5, p. 619-30, 2014.

KENNEY, R. T. et al. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. **J Immunol.**, v. 163, n. 8, p. 4481-8, 1999.

KEREKES, K. et al. Adjuvant effect of gamma-inulin is mediated by C3 fragments deposited on antigen-presenting cells. **J Leukoc Biol.**, v. 69, n. 1, p. 69-74, 2001.

KLASCHIK, S.; TROSS, D., KLINMAN, D. M. Inductive and suppressive networks regulate TLR9-dependent gene expression *in vivo*. **J Leukoc Biol.**, v. 85, n. 5, p. 788-95, 2009.

KLINMAN, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. **Nat Rev Immunol.**, v. 4, n. 4, abr. 2004.

KOOL, M. et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **J Exp Med.**, v. 205, n. 4, p. 869-82, 2008.

KORB, V. C.; CHUTURGOON, A. A.; MOODLEY, D. *Mycobacterium tuberculosis*: Manipulator of Protective Immunity. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, 2016

KUMAR G., et al. Diagnostic potential of Ag85C in comparison to various secretory antigens for childhood tuberculosis. **Scand J Immunol.**, v. 68, n. 2, p.177-83, ago. 2008.

KUROSHIMA, S. et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 on human intestinal lymphatic vessels. **Microvasc Res.**, v. 67, n. 1, p. 90-5, 2004.

LAHEY, T. et al. Immunogenicity and Protective Efficacy of the DAR-901 Booster Vaccine in a Murine Model of Tuberculosis. **PLoS One.**, v. 11, n. 12, e0168521, 2016.

LERNER, T. R. et al. Lymphatic endothelial cells are a replicative niche for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Invest.**, v. 126, n. 3, p. 1093-108, 2016.

LI; H., NOOKALA; S., RE; F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. **J Immunol.**, v. 178, n. 8, p. 5271-6, 2007.

LIENHARDT, C.; ZUMLA, A. BCG: the story continues. **Lancet.**, v. 366, n. 9495, p. 1414-6, 2005.

LINDBLAD, E. B. Aluminium compounds for use in vaccines. **Immunol Cell Biol.**, v. 82, n. 5, p. 497-505., 2004.

LINDENSTROM, T. et al. Control of chronic mycobacterium tuberculosis infection by CD4 KLRG1- IL-2-secreting central memory cells. **J Immunol.**, v. 190, n. 12, p. 6311-9, 2013.

LYADOVA, I. V.; PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. **Mediators Inflamm.**, v. 2015; n. 854507, 2015.

MCKEE, A. S. et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. **J Immunol.**, v. 183, n. 7, p. 4403-14, 2009.

McNEIL, M.; DAFPE, M., BRENNAN, P. J. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. **J Biol Chem.**, v. 265, n. 30, p. 18200-6, 1990.

MCSHANE, H. et al. Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. **Tuberculosis (Edinb).**, v. 85, n. 1-2, p. 47-52, 2005.

MEROUEH, S. O. et al. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 103, n. 12, p. 4404-9, 2006.

MITTRÜCKER, H. W. et al. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 104, n. 30, p. 12434-9, 2007.

MONIN, L. et al. Immune requirements for protective Th17 recall responses to *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Mucosal Immunol.**, v. 8 n. 5, p. 1099-109, 2015.

MOREL, S. et al. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. **Vaccine.**, v. 29, n. 13, p. 2461-73, 2011.

NABESHIMA, S. et al. T-Cell hyporesponsiveness induced by activated macrophages through nitric oxide production in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.**, v. 67, n. 7, p. 3221-6, 1999.

NICHOLLS, J. et al. SARS: clinical virology and pathogenesis. **Respirology.**, v. 8, sup. S6-8., 2003.

ORME I. M. The Achilles heel of BCG. **Tuberculosis (Edinb)**. v. 90, n. 6, p. 329-32, nov. 2010.

PALOWSKI, A. et al. Tuberculosis and HIV Co-Infection. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 2, 2012.

PATHAK, S. K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nat Immunol.**, v. 8, n. 6, p. 610-8, 2007.

PETROVSKY N., COOPER P.D. Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety. **Vaccine.**, v. 33, n. 44, p. 5920-6, nov. 2015.

PETROVSKY; N, AGUILAR; J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol Cell Biol.**, v. 82, n. 5, p. 488-96, 2004.

PEYRON, P. et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 11, 2008.

PITZALIS, C. et al. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 14, n. 7, p. 447-62, 2014.

RAMALINGAM B., UMA DEVI K. R., RAJA A. Isotype-specific anti-38 and 27 kDa (mpt 51) response in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. **Scand J Infect Dis.**, v. 35, n. 4, p. 234-9, 2003.

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J., O'GARRA, A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. **Mucosal Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 261-70, 2011.

REECE, S. T. et al. Serine protease activity contributes to control of *Mycobacterium tuberculosis* in hypoxic lung granulomas in mice. **J Clin Invest.**, v. 120, n. 9 p. 3365-76, 2010.

REILEY, W. W. et al. Distinct functions of antigen-specific CD4 T cells during murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, vol. 107, n. 45, p. 19408-13, 2010.

REIS, M. C. et al. Role of antibodies reactive to HspX in discriminating pulmonary tuberculosis contacts with high risk of developing active disease. **Braz J Infect Dis.**, v. 15, n. 6, p. 617-8, 2011.

REITHER, K. et al. Safety and immunogenicity of H1/IC31®, an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4⁺ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm³: a phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **PLoS One.**, v. 9, n. 12, e114602, 2014.

RUHWALD, M. et al. H1- and H56- subunit vaccines against TB - an overview of the clinical development. **Eur Respir J.**, v. 44, n. Sup 58, 2014.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nat Immunol.**, v. 10, n. 9, p. 943-8, 2009.

SAKAI, S. et al. Cutting edge: control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subset of lung parenchyma-homing CD4 T cells. **J Immunol.**, v. 192, n. 7, p. 2965-9, 2014.

SAKAI, S. et al. CD4 T Cell-Derived IFN- γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 5, 2016.

SAMSTEIN M., et al. Essential yet limited role for CCR2⁺ inflammatory monocytes during *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell priming. **Elife.**, nov. 2013.

SANT'ANNA, C. C. Critérios diagnósticos da Tuberculose Pulmonar. **Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 2, 2006.

SAUNDERS, B. M. et al. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. **Cell Immunol.**, v; 216, n. 1-2, p. 65-72, 2002.

SHIROTA H., KLINMAN D. M. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. **Expert Rev Vaccines.**, v. 13, n. 2, p. 299-312, 2014.

SIDDIQUI, K. F., AMIR, M., AGREWALA, J. N. Understanding the biology of 16 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: scope in diagnosis, vaccine design and therapy. **Crit Rev Microbiol.**, v. 37 ,n. 4, p. 349-57, 2011.

SILVA, B. D. et al. MPT-51/CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine.**, v. 27, n. 33, p. 4402-7, 2009.

SILVA, B. D. et al. Different phenotypes of CD8⁺ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. **Immunol Lett.**, v. 160, n. 1, p. 23-32, 2014.

SILVA MIRANDA, M. et al. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? **Clin Dev Immunol.**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

SINAN – Sistema de Informações de Agravos de Notificação. 2016.

SMAILL, F.; XING, Z. Human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine: is the respiratory route of delivery the future? **Expert Rev Vaccines.**, v. 13, n. 8, p. 927-30, 2014.

SREEJIT, G. et al. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with beta-2-microglobulin (β 2M) affecting antigen presentation function of macrophage. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 10, e1004446, 2014.

SRINIVASAN; L., AHLBRAND; S., BRIKEN; V. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with host cell death pathways. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 4, n. 8, 2014.

SRIVASTAVA, S.; ERNST, J. D. Cell-to-cell transfer of *M. tuberculosis* antigens optimizes CD4 T cell priming. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 741-752, 2014.

STENGER; S., NIAZI; K. R., MODLIN, R. L. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol.**, v. 161, n. 7, p. 3582-8, 1998.

SWARTZ; M. A., HUBBELL; J. A., REDDY; S. T. Lymphatic drainage function and its immunological implications: from dendritic cell homing to vaccine design. **Semin Immunol.**, v. 20, n. 2, p. 147-56, 2008.

TAMBURINI B. A., BURCHILL M. A., KEDL R. M. Antigen capture and archiving by lymphatic endothelial cells following vaccination or viral infection. **Nat Commun.**, v. 5, n. 3989, 2014.

TOOSSI, Z; ELLNER, J. J. The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. **Clin Immunol Immunopathol.**, v. 87, n. 2, p. 107-14, 1998.

TUBERCULOSE – Guia de Vigilância Epidemiológica. **J bras pneumol.**, v. 30, sup. 1, 2004.

URDAHL, K. B. Understanding and overcoming the barriers to T cell-mediated immunity against tuberculosis. **Semin Immunol.**, v. 26, n. 6, p. 578-87, 2014.

VERGNE, I. et al. Cell biology of *mycobacterium tuberculosis* phagosome. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 20, p. 367-94, 2004.

WANG, H. B.; WELLER, P. F. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. **J Leukoc Biol.**, v. 83, n. 4, p. 817-21, 2008.

WANG, L. X. et al. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. **Vaccine.**, v. 28, n. 8, p. 2026-31, 2010.

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

WHITE, A. D. et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine, MVA85A, delivered by aerosol to the lungs of macaques. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 663-72, 2013.

WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Report. 2015.

WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Report. 2016.

WILSON R. A., et al. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. **J Mol Biol.**, v. 335, n. 2, p. 519-30, 2004.

WONG, T. M. et al. Delta inulin-derived adjuvants that elicit Th1 phenotype following vaccination reduces respiratory syncytial virus lung titers without a reduction in lung immunopathology. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 24, p.1-10, 2016.

YANG, X. Y. et al. *Mycobacterium vaccae* vaccine to prevent tuberculosis in high risk people: a meta-analysis. **J Infect.**, v. 60, n. 5, p. 320-30, 2010.

ZUMLA A., et al. WHO's 2013 global report on tuberculosis: successes, threats, and opportunities. **Lancet**, v. 382, n. 9907, p. 1765-7, nov. 2013.

ZWERLING, A. et al. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. **PLoS Med.**, v. 8, n. 3, 2011.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE



PARECER CONSUBSTANCIADO

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino): PESQUISA

II - Identificação:

- ☐ **Título do projeto:** CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA BCG RECOMBINANTE EXPRESSANDO AG85A, MPT31 E HSPX PARA TUBERCULOSE
- ☐ **Pesquisador Responsável:** João Alves de Araújo Filho
- ☐ **Instituição onde será realizado:** IPTSP – UFV
- ☐ **Data de apresentação ao CEEA:** 18/05/2010

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Desde 1985 tem-se realizado estudos de controle de caso utilizando diferentes cepas de BCG, e se observou que a eficácia da vacina varia de zero a 80% (SMITH, 1987). Em crianças, a proteção estimada é de 52 a 100%, para a prevenção de meningite tuberculosa, e de 2 a 80% na prevenção de tuberculose pulmonar (ROMANUS, 1987; PADUNGCHAN et al., 1986; TIDJANI et al., 1986). As causas da falha na eficiência da vacina BCG podem estar relacionadas com os seguintes fatores: exposição prévia a micobactérias ambientais (BLACK et al 2002); variações genéticas da população ou das cepas utilizadas como vacinas (KAUFMANN 2005); diferenças nutricionais nos indivíduos vacinados (BLOOM & FINE 1994) e existência de co-infecções (FERREIRA et al 2002).

A segurança da BCG é uma preocupação crescente, devido à alta prevalência de infecção por HIV. Para prevenir os efeitos adversos da BCG em indivíduos imunocomprometidos, bactérias modificadas têm sido propostas. Os resultados mostram que estas cepas são seguras em camundongos com imunodeficiência severa combinada e demonstraram a mesma proteção nos camundongos normais susceptíveis à tuberculose, sugerindo que este poderia ser um método mais seguro de vacinação (HUEBNER 1994).

IV - Sumário do projeto:

- ☐ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:**

O tamanho da amostra foi definido de acordo com os métodos estatístico utilizados para ser capaz de detectar diferença entre o grupo. Em substituição ao uso de animais os recursos alternativos mais usados como cultura celular, pesquisas clínicas e epidemiológicas dentre outros métodos não se adequam para a avaliação do ensaio experimental de eficácia de uma vacina. Recursos alternativos que se tem hoje em dia são relativamente pequenos, os animais continuam sendo indispensáveis

❑ Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):

O estudo será realizado em 20 camundongos BALB/c, fêmeas com idade entre 4-8 semanas, proveniente do biotério do IPTSP/UFG (4 grupos de 5 animais).

❑ Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade):

Os camundongos serão acomodados em gaiolas de polipropileno autoclavável, será utilizada maravalha autoclavada como cama. A alimentação fornecida será ração em forma cilíndrica autoclavada e água autoclavada e acidificada "ad libitum" Os animais serão mantidos em sala com controle de temperatura a 20-24°C e umidade 55±10% em condições de "Specific Pathogen Free", com ciclos de 12 h escuro/luz. Os animais infectados serão mantidos em gaiolas dentro de uma estante ventilada com fluxo laminar e filtro HEPA em instalações de risco biológico.

❑ Alimentação/hidratação:

A alimentação fornecida será ração para a espécie em forma cilíndrica autoclavada e água autoclavada e acidificada "ad libitum"

❑ Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada:

Camundongos serão imunizados uma vez, subcutaneamente ou via oral, com a vacina experimental contendo (~10⁸ UFC) de rBCG-Ag85C-MPT51-HspX que será emulsificada em Dimetil-diocetadecyl-brometo de amônio (DDA; 250 µg/dose) com Monofosforil Lipídeo A (MPL; 25 µg/dose) em um volume de 0,2 mL. O adjuvante MPL será preparado misturado em água estéril contendo 0,2% de Triethylamina. A mistura será aquecida a 70°C por 30 segundos e sonicada por 30 segundos 10 vezes. O MPL será misturado com DDA imediatamente antes do uso.

Os camundongos serão desafiados 10 semanas após a primeira imunização. Os camundongos serão desafiados pela via de aerosol. Os animais serão infectados com ~100 UFC de *M.*



tuberculosis H37Rv. Os camundongos serão mortos seis semanas após o desafio com *M. tuberculosis*.

- ☐ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:**

Adequada e justificada

- ☐ **No caso de aulas, caracterização dos estudantes (curso/idade/conhecimento básico) e das atividades previstas (tipo de manipulação que farão):**

Não se aplica

- ☐ **Anestésico/analgésico utilizado, se pertinente:**

Não se aplica

- ☐ **Método de eutanásia (se for o caso):**

Os animais serão eutanasiados, através de sedação com éter etílico, e posterior deslocamento cervical com seis semanas após o desafio com *M. tuberculosis*.

- ☐ **Destino do animal (caso não seja submetido à eutanásia):**

Não se aplica

IV – Comentários do relator frente às orientações do COBEA

- ☐ **Estrutura do protocolo: ADEQUADA**

a) **Folha de rosto: ADEQUADA**

b) **Projeto de Pesquisa: ADEQUADO**

c) **Curriculo do pesquisador:**

- Pesquisadores com experiência e capacitação comprovada.

d) **Termo de responsabilidade**

- Consta do projeto o Termo de Responsabilidade assinado por todos os pesquisadores da equipe.

- ☐ **Análise do Termo de consentimento dos responsáveis por animais (se for o caso):**



Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo

Vaccine Journal

“Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information).”

Title

Advax4, a new adjuvant derived from delta inulin and ECMX, a fusion recombinant protein from *Mycobacterium tuberculosis* induces Th1 response and protect mice from infection

Running title

Advax4+ECMX induces Th1 response and protect mice

Bruno de Paula Oliveira Santos¹, Monalisa Martins Trentini¹, Mara Rúbia Nunes Celes², Nikolai Petrovsky³, André Kipnis¹, Ana Paula Junqueira-Kipnis¹

1 – Laboratory of Immunopathology of Infectious Diseases, Department of Microbiology, Immunology, Parasitology, and Pathology, Tropical Institute of Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil

2 - Laboratory of Pathology, Department of Microbiology, Immunology, Parasitology, and Pathology, Tropical Institute of Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Brazil

3 – Flinders University, Flinders Medical Center, Adelaide, Australia

Corresponding author

Ana Paula Junqueira-Kipnis
apkipnis@gmail.com

Abstract

Tuberculosis (TB) is still a main concern of public health and 10.4 million new cases around the world occurred in 2015. BCG is the only approved vaccine against TB, but has variable efficacy and new vaccines are in clinical trial. However, these studies still have not shown adequate safety and full protection. We developed two new formulations containing a new adjuvant, Advax4, and the recombinant fusion proteins, CMX and ECMX. Balb/c mice were vaccinated three times. Advax4 + CMX and Advax4 + ECMX induced high levels of IgG1 and IgG2a antibodies against CMX and ECMX, respectively. Vaccinated mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) increased Th1 specific responses. The vaccines also reduced lung damage caused by Mtb, but only Advax4 + ECMX reduced bacterial load. Our study evaluates a new vaccine formulation against TB, which demonstrates potential to further tests.

Graphical abstract

Highlights (3 to 5)

Keywords

1. Introduction

The Global Report from World Health Organization (WHO), estimated 10.4 million new cases of tuberculosis (TB) worldwide that culminated with 1.8 million of deaths in 2015 (WHO, 2016). Of these deaths, 0.4 million resulted from co-infection with HIV. It is estimated that one third of the world population is infected with *Mtb* in its latency state of which, 10% will develop the active disease (Manabe; Bishai, 2000). The unique vaccine against TB, BCG, was created over 80 years ago and has variable effect in children and also do not protect adults (Fletcher; Schrager, 2016). Although several vaccines have been developed and some of them are in clinical tests, none of them proved to contribute to TB elimination (Dockrell, 2016). For this, new studies are trying to understand the complex mycobacteria-host interaction to reach a new effective vaccine.

Subunit protein vaccine have the advantages of being safer than live vector vaccines and are generated targeting specific immune responses (Agger, 2016). rBCG expressing Ag85c increased BCG protection against *Mtb* and induced the important IL-12, TNF- α and IFN- γ cytokines (Jain et al., 2008) for TB control. MPT51, in association with CpG-DNA, was capable to increase Th1 cells and protect BALB/C mice (Silva et al., 2008). HspX purified from cell lysates protected against *Mtb* and improved BCG efficacy (Taylor et al., 2012). CMX is a fusion protein composed of the immunodominant epitopes from *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) proteins Ag85c and MPT51, that are recognized during active TB disease, and the whole HspX protein sequence, highly expressed during latency (De Sousa et al., 2012). CMX was shown to be immunogenic when used in combination with liposome, when expressed by *Mycobacterium smegmatis* or BCG live vectors (De Sousa et al., 2012; Junqueira-Kipnis et al., 2013, da Costa et al., 2014). Those vaccine formulations also resulted in protection against *Mtb*.

ESAT-6 is another latency-associated antigen. This feature can be incorporated for the improvement of a TB vaccine. A vaccine containing the fusion protein Ag85B-ESAT-6, showed protection in mice (You et al., 2012), non-human primates (Langermans et al., 2005), and currently is in phase II clinical trial, named H1:IC31 (van Dissel et al., 2011). Chatterjee et al. (2011) observed that ESAT-6 promotes the generation of Th17 responses correlated with protection against *Mtb*.

Adjuvants play a central role in the development of an immune response towards a vaccine, particularly for subunit protein vaccines. Advax is an adjuvant derived from delta inulin, a polysaccharide isomer found in the roots of Compositae (Cooper; Petrovsky, 2011). The Advax was used in different formulations and compositions (Advax1, Advax2 and Advax3) in previous works, being able to induce Th1 and Th2 cellular and humoral immune responses (Wong et al., 2016). Advax has already been tested as vaccine against respiratory syncytial virus (Wong et al., 2016), West Nile Japanese encephalitis (Petrovsky et al., 2013), Influenza (Honda-Okubo; Ong; Petrovsky, 2015; Li et al., 2015; Honda-Okubo et al., 2014), severe acute respiratory syndrome coronavirus (McPherson et al., 2016), *Listeria* (Rodriguez-Del Rio et al., 2015) and others with promising results. Thus, Advax seems to have good immunogenicity that prompted us to test it in a subunit vaccine against TB.

Therefore, our group hypothesized that the formulation Advax4 in combination with CMX or the new recombinant protein composed of CMX associated to ESAT-6 (ECMX) could induce cellular and humoral immune responses against *Mtb*, being two new vaccine possibilities against TB.

2. Material and Methods

2.1 Ethics

The experiments using animals were performed in accordance with the guidelines of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA- Ministério da Ciência e Tecnologia-Brazil). The protocols used in this study were approved by the Ethical Committee in the use of animal (CEUA) from Federal University of Goiás protocol number: 0153/10. Animals were kept in animal-housing facilities located at Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Animal handling were done under veterinarian supervision.

2.2 Animals

For this study, we used 86 specific pathogen free female mice (BALB/c) provided by Unicamp – (Campinas University – São Paulo) animal-housing facilities. They were maintained in micro-isolators containing HEPA filters. Mice were fed with sterilized water and chow diet *ad libitum*. Paper cylinders were used to reduce stress and occasionally the animals were supplemented with sunflower seeds. Room humidity controlled from 40 to 70% and light/dark cycles of 12 hours. Temperature was maintained at 24°C.

2.3 rCMX and rECMX Construction

De Sousa et al. (2012) described pET23a/CMX plasmid construction. For the construction of the ECMX fusion gene, the ESAT-6 gene was amplified from Mtb, H37Rv strain and cloned in a pGEM-T easy (Promega) plasmid with concomitant of creation of the restriction enzyme sites for NdeI and BamHI enzymes at the amino and carboxyl region of the gene. The ESAT-6 gene was removed from the recombinant pGEM-T easy construction by digestion with the above enzymes and insertion in the pET23a/CMX previously digested with the same enzymes. The resulting recombinant plasmid named pET23a/ECMX was confirmed by enzyme-restricted profiles as well as sequencing of the entire construction.

2.4 rCMX and rECMX Production

Large-scale recombinant CMX (rCMX) or rECMX protein production was achieved by culturing *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformed with each recombinant plasmid separately in liquid LB medium (containing chloramphenicol and ampicillin) for 4-6 hours until OD₆₀₀ reached 0.6. At this point recombinant protein expression was induced by the addition of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM and cultures were further incubated for additional 4-5 hours. Protein purification was done under denaturing conditions according to His-Tag Protein Purification Ni-NTA purification kit (Qiagen) instructions. After addition of lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8), the suspension was centrifuged for 45 minutes, 10,000 xg, at 22°C. The supernatant was transferred to a purification column and separated according to the kit instructions.

2.5 Vaccine formulation

The vaccines were formulated immediately before the vaccination as following: 1: Advax4 + CMX contained Advax4 (10mg/ml) plus the rCMX fusion protein (200 µg/ml); 2: Advax4 + rECMX contained Advax4 (10mg/ml) with the rECMX fusion protein (200 µg/ml); 3: CpG-DNA + CMX consisted of CpG-DNA (200 µg/ml) with the rCMX fusion protein (200 µg/ml). As vaccine controls, the adjuvant and the recombinant proteins were formulated alone at the same concentration used in the vaccine formulations. All vaccines were prepared immediately before the animal inoculation followed by strong homogenization. Also, as vaccine control, a group of animals was vaccinated with BCG Moreau strain (10^6 CFU/100 µL).

2.6 Experimental Design

Six groups of 6-7 adults (8-10 weeks old) female BALB/c were used in this study. The animals from groups CpG-DNA + rCMX, Advax4 (adjuvant control), Advax4 + rCMX, rCMX alone, Advax4 + rECMX, and rECMX alone were injected three times intramuscularly with 100µL of each vaccine with a 30 days interval. One day before each vaccination, blood was collected to obtain serum for analysis. Thirty days after the last immunization, all animals were challenged with *M. tuberculosis*. The animals from BCG group were subcutaneously vaccinated once and 90 days after the immunization, were challenged with Mtb. Infection control groups were composed of animals vaccinated intramuscularly with saline challenged (n=6) or not with *M. tuberculosis* (n=7). In order to evaluate the immune response elicited by the vaccine and the bacterial load, three animals from each group were euthanized by cervical dislocation at 45 days and 90 days post *M. tuberculosis* infection (Figure 1).

2.7 Blood collection and indirect ELISA for rCMX and rECMX

Blood from the caudal vein was obtained and the samples were incubated for 1 h at 37°C, centrifuged at 800 x g and the serum obtained were frozen at -20°C. 96 wells ELISA plates were overnight incubated with rCMX or rECMX (10 µg/mL) in carbonate-bicarbonate buffer 0.05M pH 9.6. After discarding the previous solution, saline 2% skim milk were added and the plate were incubated for 2 h at 37°C. 100 µL of each serum sample diluted to 1:200 (rCMX) or 1:800 (rECMX) in saline 1% skim milk were added to each well. Following 2 h of incubation at 37°C and exhaustive washing the secondary antibody (anti-IgG1 or anti-IgG2a; Pharmingen) conjugated to peroxidase was added and the plates were further incubated for 1 h at 37°C. The reaction was revealed using citrate buffer pH 5.0 containing OPD and H₂O₂. The plates were read in an ELISA plate (Labsystems Multiskan Thermo) reader using a 492nm absorbance.

2.8 *Mycobacterium tuberculosis* infection

To determine protective efficacy, previously quantified and stocked at -80°C freezer, *M. tuberculosis* H37RV strain was unfrozen and diluted to 10^6 CFU/mL in saline 0.05% Tween 80. The animals were injected intravenously with 100µL of the *M. tuberculosis* suspension by the caudal vein. The inoculum was plated in 7H11 supplemented with OADC in order to check the challenge dose. Also, one day after the *M. tuberculosis* challenge, one animal from each group was euthanized by cervical dislocation and the lungs were collected, homogenized, and plated onto 7H11 supplemented with OADC in order to obtain the initial bacterial load.

2.9 Specific immune response to rCMX/rECMX

Forty-five and 90 days post *M. tuberculosis* infection, three animals from each group were euthanized and the lungs and spleens were used to evaluate the specific immune response induced by the vaccination and infection. Lung and spleen cells were collected from the animals and homogenized as described by Da Costa et al. (2014). After red blood cells lysis, the cell suspension were adjusted to 1×10^6 cell/mL and distributed in a 96 well plate. The cells were then stimulated with ConA (10 μ g/mL), rCMX (10 μ g/mL) or rECMX (10 μ g/mL). Non stimulated cells from all animals were used as control. After 2h at 37°C in a CO₂ incubator, Monensin (3 μ M; BD Pharmingen) was added to cells that were further incubated for 4 h. After this period, the plates were centrifuged at 800 x g and the cells were resuspended with saline sodium azide and incubated at room temperature for 20 min. Using buffer containing 5% paraformaldehyde, the cells were incubated with anti-CD4-FITC (clone: RM4-5 - eBioscience) for 20 minutes. The intracellular staining was performed after incubating the cells with Perm Wash buffer (BD Cytofix/Cytoperm Kit) using anti- IFN- γ -PE (clone: XMG1.2 eBioscience) and anti-IL-17-PERCP(clone: TC11-18H10 - BD Pharmingen). To evaluate lymph node cells, draining lymph nodes (popliteal and inguinal) from vaccinated BALB/c mice were collected two days post vaccination. The cells were obtained after pressing the organs using a 70 μ M cell strainer. Cells were then fixed and treated with anti-gp38-FITC (clone: 8.1.1 - Novus Biologicals), anti-CD31-Pe-Cy7(clone: 390 - BD Pharmingen), anti-F4/80-FITC (clone: BM8 - Novus Biologicals) and anti-CD11b-PE (clone: M1-70 – eBioscience). Lymphocyte gate were excluded from lymph nodes analyzes and results are expressed in total cells percentages. Cell phenotypes were acquired using a FACSVerse (BD Biosciences) leased to the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás. At least 50,000 lymphocytes were acquired per sample. The lymphocytes were evaluated by size and granularity using a FlowJo Software 8.7.

2.10 Bacterial Load Evaluation

To evaluate bacillary load after vaccination, it was collected the apical and medium right lung lobes from each mouse, 45 and 90 days after infection. Lung lobes were homogenized from each mouse, diluted and cultured on 7H11 agar medium, supplemented with OADC. Plaques were incubated in a CO₂ incubator at 37°C. CFU counting was done manually 28 days later.

2.11 Statistical analysis

The data were digitalized using Microsoft Office Excel 2013 and GraphPad Prism version 6.0. The average and standard deviation were calculated for each experimental group. Variances among the groups were determined by One-Way ANOVA. Using Dunnet test as a post test, the differences between the groups were defined using a 95% confidence interval.

3. Results

3.1 Vaccine formulations containing Advax4 do not induce local inflammation

To evaluate the reactogenicity of the Advax4, the vaccines were inoculated on the quadriceps muscle and the tissue was collected after 2 days (Figure 2). There was no difference in the striated muscle tissue morphology in the saline group (Figure 2A) and Advax4 alone (Figure 2C). The mice inoculated only with rCMX had a small increase in the mononuclear cells profile (Figure 2B). However, the formulation Advax4 + rCMX (Figure 2D) showed vascular congestion and increase in the mononuclear cells inflammatory infiltrate. These results show the capacity of the vaccine formulation to stimulate the recruitment of mononuclear cells without causing an inflammatory injury.

3.2 Advax4 + rCMX stimulate lymph node lymphatic endothelial cells

To access if the formulations containing Advax and rCMX could stimulate cells from local lymph nodes (inguinal and popliteal), nodes were collected and processed to analyze cellular profile (Figure 3). After 2 days of vaccination with Advax4 + rCMX the percentages of blood endothelial cells (BECs) were similar to the nodes from control mice (Figure 3A). However, the vaccination with Advax4 + rCMX increased the percentage of lymphatic endothelial cells (LECs) and activated macrophages (F480/CD11b⁺) (Figures 3B and 3C). These findings suggest that the vaccine formulation composed of Advax4 might be drained to the local nodes and activate LECs.

3.3 Advax4 + rCMX and Advax4 + rECMX are antigenic and immunogenic formulations

To check the immunogenicity of CpG-DNA + rCMX, Advax4 + rCMX, Advax4 + rECMX and control groups (Saline, BCG, CMX, Advax4 and CpG-DNA+CMX), the sera from immunized mice were analyzed. IgG1 levels induced by the vaccines increased after the second vaccination (Figure 4A, C and E). They also were able to generate IgG2a that was highly induced since the first immunization (Figure 4B, D and F). There was no difference between the IgG1 and IgG2a levels induced by Advax4 + rCMX, Advax4 + rECMX and CpG-DNA + rCMX. The ratio of IgG2a/IgG1 is indicated in figure 4G. The vaccines BCG and CpG-DNA+CMX induced the highest levels of IgG2a. In summary the vaccine formulations were able to induce specific humoral immune responses.

3.4 Only Advax4 + rCMX induces specific cellular Th1 response in lungs and spleen

In order to evaluate if the vaccine was able to induce specific Th1 responses, after challenging with *Mtb* the lungs and spleens were evaluated. The mice had their lungs and spleen collected after 45 days of challenge. Only animals vaccinated with Advax4 + rCMX and CpG-DNA + rCMX presented specific Th1 responses to rCMX at similar levels as infected animals in the lungs (Figure 5A). Contrasting, mice vaccinated with Advax4 + rECMX and infected with *Mtb* presented levels of CD4⁺IFN- γ ⁺ cells anti-ECMX lower than mice only infected (Figure 5B). Evaluating the splenocyte responses, the same pattern of response was obtained but at lower levels.

3.5 Advax4 formulation reduce the lung inflammatory injure caused by *Mycobacterium tuberculosis* challenge

After 45 days of infection, the normal alveolar architecture found in lungs (Figure 6A) is extremely altered with the inflammatory process caused by *Mtb* infection (Figure 6B). BCG vaccination (Figure 6C) partially reduced the damage, but the presence of mononuclear cells at periarteriolar inflammatory areas can be observed. Notable, the

vaccine formulations Advax4 + rCMX and Advax4 + rECMX reduced significantly the inflammatory process (Figure 6E and F). Previous vaccination with Advax4 + rCMX and Advax4 + rECMX avoided the thickness of alveolar walls when compared to the infected animals, although there was the presence of mononuclear cells (Figure 6E and 6F).

3.6 Addition of ESAT-6 to CMX protein, in formulation with Advax4, was the only formulation capable of reducing the lungs bacillary load

To evaluate the protection induced by the vaccines formulations, superior and middle lung lobes were collected after 45 days of infection. CpG-DNA+CMX and Advax4+CMX were not capable to protect infected mice, keeping bacteria levels at similar levels as infected mice. In contrast, Advax4+ECMX reduced significantly the lung bacterial load when compared to infected animals (Figure 7). As expected, BCG vaccinated animals presented reduced bacillary load.

4. Discussion

In this study, we aimed to see the efficacy and protection of Advax4 adjuvant with two different recombinant fusion proteins: CMX and ECMX. The formulations increased cellular recruiting at the site of injection without creating an inflammatory damage. In draining lymph nodes, the vaccine increased LECs proliferation, exhibiting ability to stimulate macrophages, enhancing its vaccine potential. Both formulations showed to be immunogenic, once they induced high antibody levels against CMX or ECMX, after second and third immunization. After Mtb challenge, mice vaccinated with Advax4+CMX and Advax4+ECMX increased the Th1 cells induced by infection. Vaccination with Advax4+ECMX reduced significantly the pulmonary inflammatory damages as well reduced the bacillary load. We propose that Advax4+ECMX is an optimistic advance against TB.

Advax has been previously showed not being able of provoking inflammation (Honda-Okubo; Saade; Petrovsky, 2012). However, may exert its adjuvant function through another ways. To do so, it is necessary activate local cells and induce presenting cells to migrate to draining lymph nodes. Histology images of the inoculation site showed the increase of mononuclear cells when Advax4 was used in the vaccine formulation (Figure 2D). Even though, the increase was not high and could not be characterized as an inflammation process, this event could represent the Advax action. It has been shown before that Advax deposit in resident macrophages increasing complement activation (Petrovsky; Cooper, 2015). It is possible that the increasing on the mononuclear cells is due to the complement activation and the activation of the resident macrophages culminated to the increased migration to the region without a vascular inflammation. It is important to notice that the mononuclear cells increase was not observed when Advax was used alone. In this regard we believed that the protein alone could activate macrophages as shown by Hetland and Wiker (1994) that Ag85c activates monocytes through CR3. Additionally others and we have shown that proteins from Mtb (including CMX) activate macrophages through a TLR-4 signaling inducing IL-6, IL-1 α and TGF- β , emphasizing the importance of the recombinant protein and its composition in activating local cells and the response that will be generated (Choi et al., 2016).

Advax is a polysaccharide derived from microparticles of polyfructofuranosyl-d-glucose, named delta inulin. Advax has been used in numerous tests in animal models and has already been approved as an adjuvant in humans (Gordon et al., 2014). Its shaped immune response has been recently studied, and it seems to increase the antigen immune cellular response. In other words, if the vaccine formula generates Th1 responses, Advax potentiates this Th1 response, but if the vaccine formula induces Th2 responses, Advax potentiates this kind of response. Advax mechanism of action is dependent on macrophage uptake of its microparticles by MARCO receptor, TNF- α release and DC proliferation (Hayashi et al., 2017). CpG-DNA is a TLR-9 agonist that induces a Th1 cellular profile, by stimulating NK cells to produce IL-12, IL-18 and IFN- γ (Chu et al., 1997). Hsieh et al. (2004) used a protein of Mtb, CFP, with CpG-DNA and observed that this formulation failed as vaccine, demonstrating transient results. However, Silva et al. (2009) used CpG-DNA as adjuvant with MPT-51, as vaccine in BALB/c mice and it was able to protect mice and induce higher Th1 cells levels. Advax4 is a new formula of AdvaxTM, containing CpG-DNA, in aim to potentiate its response against intracellular microorganisms.

Intramuscular vaccines injected in the quadriceps muscle in mice was shown to be drained to lymph nodes, inguinal fat and sciatic nerve (Tegenge et al., 2016). In the present work we showed activation/increase of BECs and LECs population after Advax4+CMX vaccination. Tamburini, Burchill, Kedl (2014) showed that LEC could be involved in the activation of specific cells to induce protection against influenza because these cells captured viral antigens and maintained these antigens for a long period of time, that was directly associated to T cells memory production. This way, LECs act like packages in lymph nodes and probably transfer antigens from themselves to local APCs. It is possible that the formulations containing Advax4 could be activating LECs and therefore their proliferation and also inducing macrophages activation (Figure 3).

Since CMX showed to be a promising vaccine candidate, to improve its capacity as vaccine, another antigen was added to it, the ESAT-6, which has shown to be safe and to induce long lived cells in a clinical trial vaccine (IC31; van Dissel et al., 2011), generating the ECMX recombinant protein. Both proteins, CMX and ECMX, were formulated separately with Advax4 and evaluated for their immunogenicity. High levels of IgG2a and IgG1 were generated after the second immunization. IgG2a is correlated with a Th1 response and IgG1 with a Th2 response (Millan et al., 1998). In the present work, there was a balance in its induction that could indicate a broad adaptive specific stimulation involving several Th cells subpopulation. Addressing the ratio of IgG2a/IgG1 and the levels of Th1 generated after Mtb challenge, we could argue that such correlation was not observed once only mice vaccinated with CpG-DNA+CMX and Advax4+ECMX induced higher levels of specific Th1 responses than the infected mice (Figure 4).

It has been shown before that IgG1 antibodies against lipoarabinomannan (LAM) were able to protect mice infected with Mtb (Hamasur et al., (2004), while Liu et al., 2017 showed that a higher IgG2a(c)/IgG1 ratio was correlated with protection. Here, we couldn't make such correlation because all vaccines formulations induced antibodies against the recombinant proteins but with a different protection outcome. Even though, Mtb does not produce CMX or ECMX proteins, antibody generated against CMX was able to recognize one of the antigens, the HspX (De Sousa et al., 2012). HspX is an antigen expressed during Mtb stressing conditions (Chang et al., 1996). Maybe the antibodies generated against CMX did not exert its biological function as was seen before

for anti-LAM antibodies because here the Mtb infection is active and therefore express lower levels of HspX (Hamasur et al., 2004).

Advax 4+CMX and Advax4+ECMX induced higher levels of specific Th1 cells that could be correlated to the activation of LEC cells. Advax4+ECMX was not evaluated, but could present similar activation. In addition, both vaccines were able to reduce lung inflammation and alveolar collapse caused by Mtb that culminated with better protection (Figure 7). IFN- γ produced by Th1 cells has a major role in Mtb combat. This cytokine acts on macrophage activation and the release of reactive nitrogen intermediates, like NO, capable of killing mycobacteria (Flynn et al., 1993). Increasing lung levels of NO could have induced the increasing of endothelin that associated with the bacterial killing could culminate with endothelia constriction resulting in the Advax4+ECMX reduction of the inflammatory reactions.

BCG induced higher protection levels. Differences between BCG and our vaccine formulation include vaccine type (attenuated vector x subunit protein) and the induced response. BCG induces Th1 and lower Th17 cellular responses, as seen before in BCG vaccinated BALB/c mice that culminated with protection (Garcia-Pelayo et al, 2015). Unfortunately, Advax formulations were not able to induce Th17 responses (data not shown).

The challenge is to create a vaccine able to act right in the beginning of the infection with enough strength to overcome the Mtb ability to escape and survive within immune system metabolites. In addition, a vaccine should be able to prolong the BCG memory response or have enough memory to protect adults. Next step to this vaccine should be improve its protection and evaluate its memory cellular capability. The first step could be using Advax4+ECMX as a boost of BCG vaccinated mice. Da Costa et al. (2014) when vaccinated mice with a BCG recombinant vaccine expressing CMX and boosted with the CMX protein with CpG-DNA observed a greater reduction in the bacterial load. Since Advax4 contains CpG-DNA in its components, known to induce Th1 cellular responses, an improvement could be addition of IL-17/IL-23 in its composition, or elements that stimulates neutrophils. Trentini et al. (2016) has proved the importance of neutrophils in generating Th17 cells against TB. Th17 has been shown to have a major role in protection against Mtb (Monin et al., 2015), and the absence of these cells on the studied vaccine formulation may be one of the reasons for better improvement of Advax4+ECMX.

Clearly, the main difference is the presence of ESAT-6 on the recombinant protein. Recently, Liu et al. (2017) observed that a BCG recombinant vaccine expressing Ag85B/ESAT-6 enhanced long lasting Th1 response in mice. Also, in adolescents, H1:IC31 (Ag85b-ESAT-6 fusion protein + IC31 adjuvant) induced long-lived TNF- α /IL-2⁺ CD4 T cells (Reither et al., 2014). As a host mechanism of defense, during Mtb infection in vitro, CD11c⁺ cells can direct ESAT-6 particles to its cytosol, where they activate NLRP3 complex and caspase-1 to break the pro-IL-18 into IL-18 cytokine. IL-18 is a pro-inflammatory cytokine, which activates NK cells and CD8⁺ T cells to produce IFN- γ , controlling mycobacterial growth (Kupz et al., 2016). However, as a mycobacterial mechanism of defense, ESAT-6, in complex with CFP-10, can inhibit the class I-mediated (MHC-I) antigen presentation, by interacting with β 2M of the host cell (Sreejit et al., 2014). ESAT-6 also induces an increase in macrophage glucose uptake and deregulation of enzymes involved in triglyceride formation, which benefits mycobacterial

nutrition and survival (Singh et al., 2015). Therefore, ESAT-6 in a vaccine formulation, could inhibit the expression of MHC-I by Mtb and therefore support the cells mechanisms for Mtb elimination, besides of inhibition of Mtb nutrition. These outcomes demonstrate a possible role of ESAT-6 in a vaccine immunogenicity and protection against Mtb.

Our results demonstrate for the first time the efficacy of a fusion recombinant protein, ECMX, as a vaccine formulation against TB and evaluate the Advax4 as a potential adjuvant in new subunit vaccines against TB.

Acknowledgements

Vaxine LTDA provided the Advax.

References

Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P (2006) Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31.

Vaccine., 24(26):5452-60.

Agger, EM (2016). Novel adjuvant formulations for delivery of anti-tuberculosis vaccine candidates. **Adv Drug Deliv Rev.**, 1;102:73-82.

Chang Z, Primm TP, Jakana J, Lee IH, Serysheva I, Chiu W, Gilbert HF, Quijcho FA (1996). Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. **J Biol Chem.**, 271(12):7218-23.

Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, Van Kaer L, Chattopadhyay D, Das G (2011). Early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis promotes protective T helper 17 cell responses in a toll-like receptor-2-dependent manner. **PLoS Pathog.**, 7(11):e1002378.

Choi HG, Choi S, Back YW, Park HS, Bae HS, Choi CH, Kim HJ (2016). *Mycobacterium tuberculosis* Rv2882c Protein Induces Activation of Macrophages through TLR4 and Exhibits Vaccine Potential. **PLoS One.** 11(10):e0164458.

Chu RS1, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. **J Exp Med.**, 186(10):1623-31.

Cooper PD, Petrovsky N (2011). Delta inulin: a novel, immunologically active, stable packing structure comprising β -D-[2 $\rightarrow$ 1] poly(fructo-furanosyl) α -D-glucose polymers. **Glycobiology.**, 21(5):595-606.

da Costa AC, Costa-Júnior Ade O, de Oliveira FM, Nogueira SV, Rosa JD, Resende DP, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP (2014). A new recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis. **PLoS One.**, 9(11):e112848.

de Sousa EM, da Costa AC, Trentini MM, de Araújo Filho JA, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP (2012). Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in mice and active TB infection. **PLoS One**. 7(10):e47781.

Dockrell HM (2016). Towards new TB vaccines: What are the challenges? **Pathog Dis.**, 74(4):ftw016.

Fletcher HA, Schrager L (2016). TB vaccine development and the End TB Strategy: importance and current status. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 110(4):212-8.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Exp Med.**, 178(6):2249-54.

Garcia-Pelayo MC, Bachy VS, Kaveh DA, Hogarth PJ (2015). BALB/c mice display more enhanced BCG vaccine induced Th1 and Th17 response than C57BL/6 mice but have equivalent protection. **Tuberculosis (Edinb)**, 95(1):48-53.

Gordon D, Kelley P, Heinzl S, Cooper P, Petrovsky N (2014). Immunogenicity and safety of Advax™, a novel polysaccharide adjuvant based on delta inulin, when formulated with hepatitis B surface antigen: a randomized controlled Phase 1 study. **Vaccine.**, 32(48):6469-77.

Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, Schroder U, Kallenius G, Svenson SB (2004). A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab') fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Exp Immunol.**, 138(1):30-8.

Hayashi M, Aoshi T, Haseda Y, Kobiyama K, Wijaya E, Nakatsu N, Igarashi Y, Standley DM, Yamada H, Honda-Okubo Y, Hara H, Saito T, Takai T, Coban C, Petrovsky N, Ishii KJ (2017). Advax, a Delta Inulin Microparticle, Potentiates In-built Adjuvant Property of Co-administered Vaccines. **EBioMedicine.**, 15:127-136.

Hetland G, Wiker HG (1994). Antigen 85C on *Mycobacterium bovis* BCG and *M. tuberculosis* promotes monocyte-CR3-mediated uptake of microbeads coated with mycobacterial products. **Immunology**, 82:445–449.

Hsieh MJ, Junqueira-Kipnis AP, Hoeffler A, Turner OC, Orme IM (2004). Incorporation of CpG oligodeoxynucleotide fails to enhance the protective efficacy of a subunit vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine.**, 22(5-6):655-9.

Honda-Okubo Y, Kolpe A, Li L, Petrovsky N (2014). A single immunization with inactivated H1N1 influenza vaccine formulated with delta inulin adjuvant (Advax™) overcomes pregnancy-associated immune suppression and enhances passive neonatal protection. **Vaccine.**, 32(36):4651-9.

Honda-Okubo Y, Ong CH, Petrovsky N (2015). Advax delta inulin adjuvant overcomes immune immaturity in neonatal mice thereby allowing single-dose influenza vaccine protection. **Vaccine.**, 33(38):4892-900.

Honda-Okubo Y, Saade F, Petrovsky N (2012). Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses. **Vaccine.**, 30(36):5373-81.

Junqueira-Kipnis AP, de Oliveira FM, Trentini MM, Tiwari S, Chen B, Resende DP, Silva BD, Chen M, Tesfa L, Jacobs WR Jr, Kipnis A (2013) Prime-boost with *Mycobacterium smegmatis* recombinant vaccine improves protection in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One.**, 8(11):e78639.

Kupz A, Zedler U, Stäber M, Perdomo C, Dorhoi A, Brosch R, Kaufmann SH (2016). ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives noncognate tuberculosis control in vivo. **J Clin Invest.**, 126(6):2109-22.

Langermans JA, Doherty TM, Vervenne RA, van der Laan T, Lyashchenko K, Greenwald R, Agger EM, Aagaard C, Weiler H, van Soolingen D, Dalemans W, Thomas AW, Andersen P (2005). Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. **Vaccine.**, 23(21):2740-50.

Li L, Honda-Okubo Y, Li C, Sajkov D, Petrovsky N (2015). Delta Inulin Adjuvant Enhances Plasmablast Generation, Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase and B-Cell Affinity Maturation in Human Subjects Receiving Seasonal Influenza Vaccine. **PLoS One.**, 10(7):e0132003.

Liu W, Xu Y, Yan J, Shen H, Yang E, Wang H (2017). Ag85B synergizes with ESAT-6 to induce efficient and long-term immunity of C57BL/6 mice primed with recombinant Bacille Calmette-Guerin. **Exp Ther Med.**, 13(1): 208–214.

Manabe YC, Bishai WR (2000). Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. **Nat Med.**, 6(12):1327-9.

McPherson C, Chubet R, Holtz K, Honda-Okubo Y, Barnard D, Cox M, Petrovsky N (2016). Development of a SARS Coronavirus Vaccine from Recombinant Spike Protein Plus Delta Inulin Adjuvant. **Methods Mol Biol.**, 1403:269-84.

Millan CLB, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist C-A, Davis HL (1998). CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 95(26): 15553–15558.

Monin L, Griffiths KL, Slight S, Lin Y, Rangel-Moreno J, Khader SA (2015). Immune requirements for protective Th17 recall responses to *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Mucosal Immunol.**, 8(5):1099-109.

Petrovsky N, Cooper PD (2015). Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety. **Vaccine.**, 33(44):5920-6.

Reither K, Katsoulis L, Beattie T, Gardiner N, Lenz N, Said K, Mfinanga E, Pohl C, Fielding KL, Jeffery H, Kagina BM, Hughes EJ, Scriba TJ, Hanekom WA, Hoff ST, Bang P, Kromann I, Daubenberger C, Andersen P, Churchyard GJ (2014). Safety and immunogenicity of H1/IC31®, an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4+ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm³: a phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **PLoS One.**, 9(12):e114602.

Rodriguez-Del Rio E, Marradi M, Calderon-Gonzalez R, Frande-Cabanes E, Penadés S, Petrovsky N, Alvarez-Dominguez C (2015). A gold glyco-nanoparticle carrying a Listeriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection. **Vaccine.**, 33(12):1465-73.

Silva BD, da Silva EB, do Nascimento IP, Dos Reis MC, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP (2009). MPT-51/CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine.**, 27(33):4402-7.

Singh V, Kaur C, Chaudhary VK, Rao KV, Chatterjee S (2015). *M. tuberculosis* Secretory Protein ESAT-6 Induces Metabolic Flux Perturbations to Drive Foamy Macrophage Differentiation. **Sci Rep.**, 5:12906.

Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, Jha V, Valluri VL, Ghosh S, Mukhopadhyay S (2014). The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with beta-2-microglobulin (β2M) affecting antigen presentation function of macrophage. **PLoS Pathog.**, 10(10):e1004446.

Tamburini BA, Burchill MA, Kedl RM (2014). Antigen capture and archiving by lymphatic endothelial cells following vaccination or viral infection. **Nat Commun.**, 5:3989.

Tegenge MA, Von Tungeln LS, Mitkus RJ, Anderson SA, Vanlandingham MM, Forshee RA, Beland FA (2016). Pharmacokinetics and biodistribution of squalene-containing emulsion adjuvant following intramuscular injection of H5N1 influenza vaccine in mice. **Regul Toxicol Pharmacol.**, 81:113-119.

Trentini MM, de Oliveira FM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP (2016). The Role of Neutrophils in the Induction of Specific Th1 and Th17 during Vaccination against Tuberculosis. **Front Microbiol.**, 7:898.

van Dissel JT, Soonawala D, Joosten SA, Prins C, Arend SM, Bang P, Tingskov PN, Lingnau K, Nouta J, Hoff ST, Rosenkrands I, Kromann I, Ottenhoff TH, Doherty TM, Andersen P (2011). Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31® promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. **Vaccine**, 29(11):2100-9.

Wong TM, Petrovsky N, Bissel SJ, Wiley CA, Ross TM (2016). Delta inulin-derived adjuvants that elicit Th1 phenotype following vaccination reduces respiratory syncytial virus lung titers without a reduction in lung immunopathology. **Hum Vaccin Immunother.**, 12(8):2096-2105.

World Health Organization – WHO (2016). Global Tuberculosis Reports.

You Q, Wu Y, Wu Y, Wei W, Wang C, Jiang D, Yu X, Zhang X, Wang Y, Tang Z, Jiang C, Kong W (2012). Immunogenicity and protective efficacy of heterologous prime-boost regimens with mycobacterial vaccines and recombinant adenovirus- and poxvirus-vectored vaccines against murine tuberculosis. *Int J Infect Dis.*, 16(11):e816-25.

Legends

Fig. 1. Representative schematic time line of vaccinations. Mice were vaccinated three times with 30 days intervals. Blood samples were collected 30 days after each vaccination and before another procedure. Two days after the first vaccination, mice were euthanized to collect right quadriceps muscle and draining lymph nodes. Thirty days after the last vaccination, mice were infected with Mtb. Forty-five days after Mtb challenge, mice were euthanized to lung and spleen collection and analysis.

Fig. 2. Representative histopathological images of quadriceps muscle tissues of vaccinated mice. BALB/c mice were vaccinated with the different formulations on the quadriceps muscle and euthanized after two days to morphological analysis. Saline group (A), recombinant protein alone (B), adjuvant alone (C), adjuvant formulated with recombinant protein (D). H&E staining, x100 magnification. In (D) is possible to observe leukocytes increase, even though it cannot be characterized as an inflammatory process. The results shown are representative of two independent experiments (N=6, *p<0.05). Arrows indicate increase of mononuclear cells.

Fig. 3. Levels of specific CMX cells present in the draining lymph nodes after injection. BALB/c mice inoculated with Saline, CMX, Advax3, Advax4, Advax3 + rCMX, Advax4 + rCMX were euthanized after 2 days, and the draining lymph nodes were collected. Cells were stained with gp38, CD31, F4/80, CD11c. (A) Absolute values of blood endothelial cells (BEC). (B) Absolute values of lymphatic endothelial cells (LEC). (C) Absolute values of activated macrophages (F4/80⁺/CD11b). The results shown are representative of two independent experiments (N=6, *p<0.05).

Fig. 4. Humoral Immune Response anti-CMX. Animals were bleed thirty days after the first, second and third vaccination. Antibody levels were measured after sera separation. (A) IgG1 levels induced by CpG-DNA+CMX and controls. (B) IgG2a levels induced by CpG-DNA+CMX and controls. (C) IgG1 levels induced by Advax4+CMX and controls. (D) IgG2a levels induced by Advax4+CMX. (E) IgG1 levels induced by Advax4+ECMX. (F) IgG2a levels induced by Advax4+ECMX. (G) IgG2a/IgG1 ratio of all vaccine formulations. All vaccines induced high antibody levels since 30 days after the first vaccination. The results shown are representative of two different experiments (N=6, *p<0.05). # Statistic difference with the saline. * Statistic difference with the analyzed group and the same group in the first vaccination.

Fig. 5. Cellular specific immune response anti-CMX generated 45 and 90 days after challenge. Thirty after three vaccination, BALB/c mice were challenged with Mtb (10⁵ CFU per mice) and euthanized after 45 days or 90 days to evaluate the cellular response. (A) CD4⁺IFN- γ ⁺ lung cells anti-CMX or anti-ECMX 45 days after challenge. (B) CD4⁺IFN- γ ⁺ splenocytes anti-CMX or anti-ECMX 45 days after challenge. The results

shown are representative of two different experiments (N=3, *p<0.05). # Statistic difference with the saline. * Statistic difference with the analyzed group and the BCG group.

Fig. 6. Representative histopathological images of lungs. After 45 days of challenge (A) Saline, (B) control of infection, (C) BCG, (D) Advax4, (E) Advax4+CMX, (F) Advax4+ECMX. H&E staining, x100 magnification. Inflammatory injury reduction observed 90 days after challenge in the Advax4+CMX group.

Fig. 7. Bacillary load of mice infected with Mtb. After 45 days of infection, the vaccinated mice were euthanized and the superior left lobe of lung mice collected. Mtb grew in 7H11 media (N=3, *p<0.05).

Figure 1

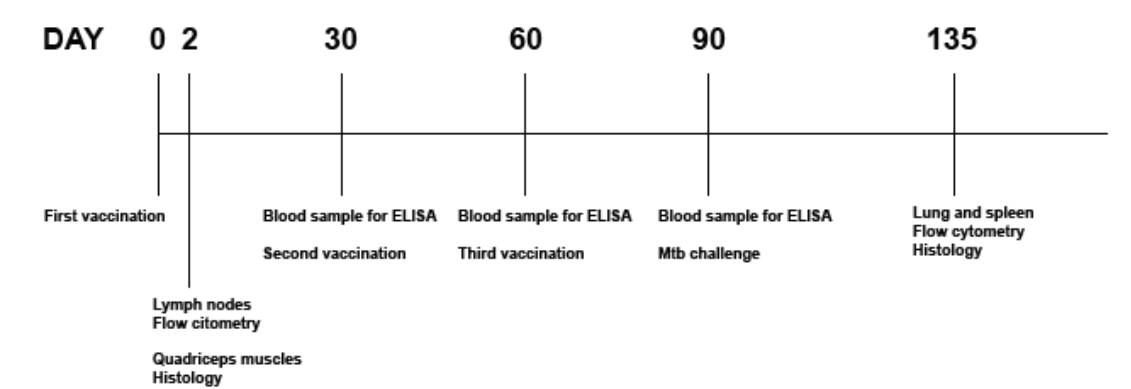


Figure 2

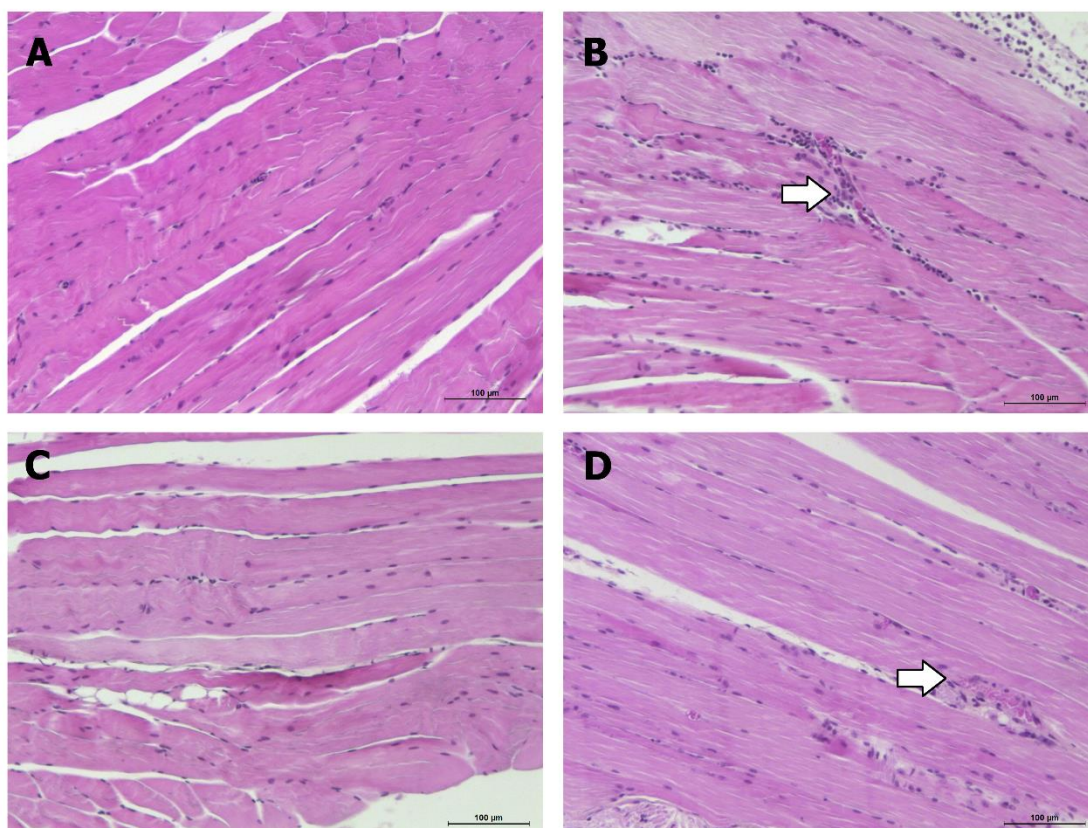


Figure 3

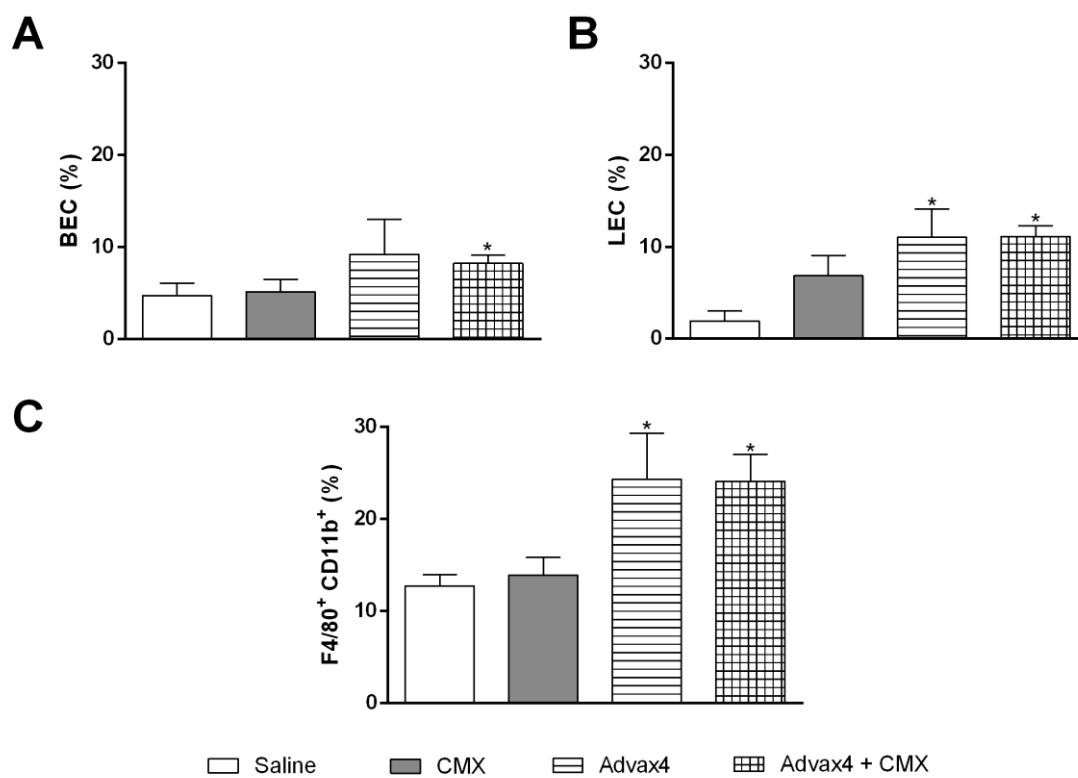


Figure 4

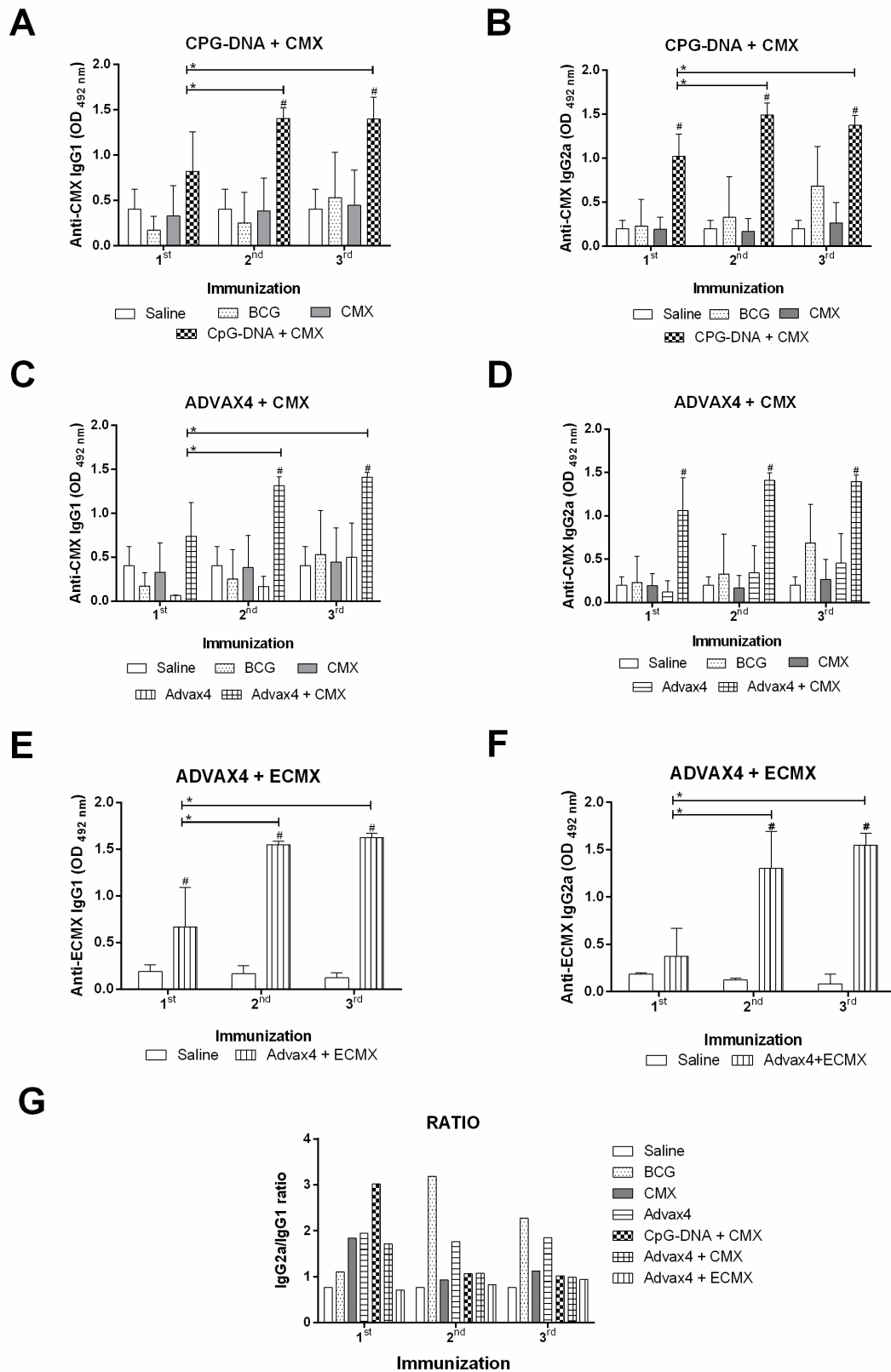


Figure 5

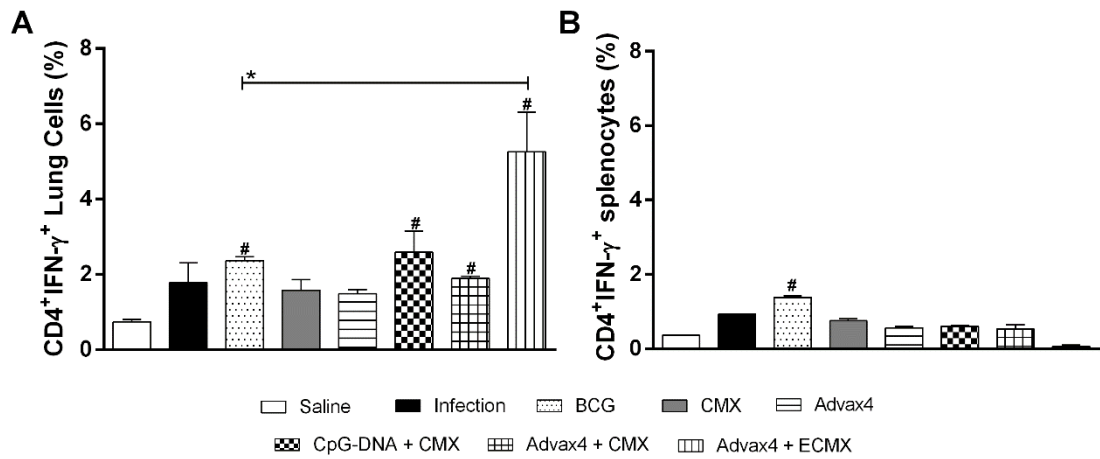


Figure 6

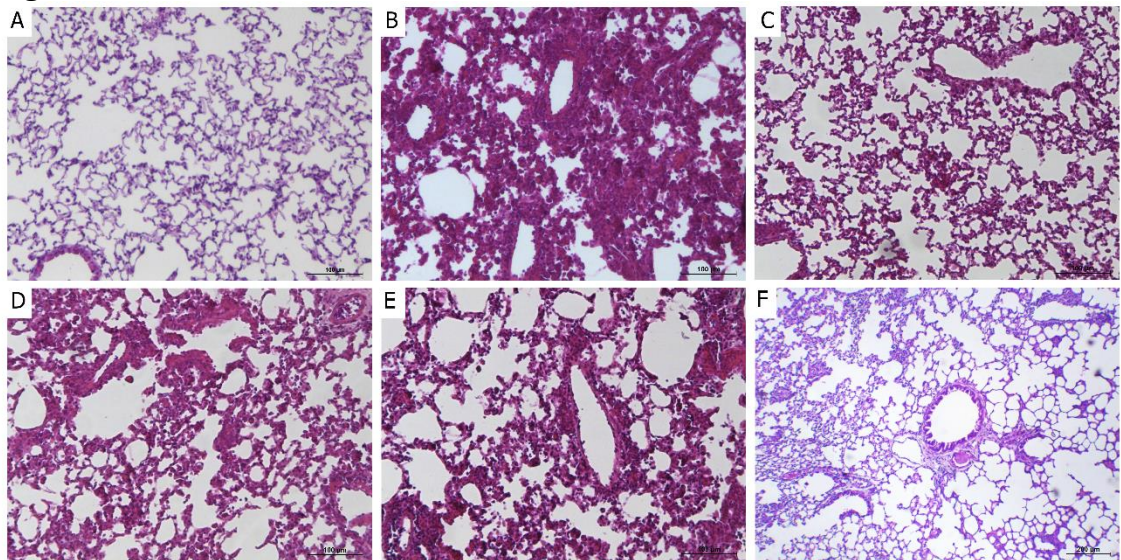


Figure 7

