



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

DANILO PIRES DE RESENDE

Avaliação de recrutamento de células da resposta imune
inata por BCG Moreau na ausência de citocinas IL-17 e
IL-22.

Goiânia

2014

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
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: Danilo Pires de Resende

Título do trabalho: Avaliação de recrutamento de células da resposta imune inata por BCG Moreau na ausência de citocinas IL-17 e IL-22.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

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(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Prof. Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis
Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas
Instituto de Biologia Molecular e Celular - UFG

Data: 16 / 12 / 2019

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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

DANILO PIRES DE RESENDE

Avaliação de recrutamento de células da resposta imune
inata por BCG Moreau na ausência de citocinas IL-17 e
IL-22.

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.

Orientadora: Dra. Ana Paula Junqueira-
Kipnis

Coorientador: Dr. André Kipnis

Goiânia

2014

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

Pires de Resende, Danilo

Avaliação de recrutamento de células da resposta imune inata por
BCG Moreau na ausência de citocinas IL-17 e IL-22. [manuscrito] /
Danilo Pires de Resende. - 2014.

xv, 89 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis; co
orientadora Dra. 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, 2014.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, mapas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista
de figuras, lista de tabelas.

1. Tuberculose. 2. BCG. I. Junqueira-Kipnis, Ana Paula, orient. II.
Título.



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DANILO PIRES DE RESENDE - Aos vinte e oito dias do mês de janeiro do ano de 2015 (28/01/2015), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS, PATRÍCIA RESENDE ALO NAGIB LOYOLA e MIRIAM CRISTINA LEANDRO DORTA, 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 DE RECRUTAMENTO DE CÉLULAS DA RESPOSTA IMUNE INATA POR BCG Moreau NA AUSÊNCIA DE CITOCINAS IL-17 E IL-22"**, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **MICROBIOLOGIA**, de autoria de **DANILO PIRES DE RESENDE**, 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 n.º 1081/2012 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. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola
Prof. Dr. Miriam Cristina Leandro Dorta

Aprovado / Reprovado

Aprovado
Aprovado
Reprovado
Habilitado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Habilitado, (**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 **MICROBIOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 40 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário 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. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola (IPTSP/UFG)
Prof. Dr. Miriam Cristina Leandro Dorta (IPTSP/UFG)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]
[Assinatura]

A minha professora Ana Paula Junqueira-Kipnis
Pela confiança, inspiração e puxões de orelha.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

A meus pais, Sérgio Jeová e Odalice, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam O MELHOR de todos, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser O MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigado pelo amor incondicional!

A meus irmãos, Guilherme e Marília, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigado pela confiança!

A professora Ana e ao professor André, é claro, que acreditaram em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponíveis e dispostos a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. Fizeram-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas... Você professora Ana não foi somente uma orientadora, mas, em alguns momentos, conselheira e amiga, sempre puxando minha orelha quando fosse preciso. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigado por estarem a meu lado e acreditarem tanto em mim!

A meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, Monalisa, Sarah Bruna, Viviane, Duanne, Joseane, Beatriz, Rafaela, Luana, Lázaro, Fábio, Rogerio, Abadio, Bruno, e especialmente para a Adeliane, sem quem nada desse trabalho seria possível. Vocês se tornaram verdadeiros amigos e tornaram mais leve meu trabalho. Obrigado por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

Ao meu irmão de coração, Renato, que me aguentou quando nem eu me aguentava e sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins! Obrigado maninho!

Ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao professor Milton do laboratório de citocinas - UFG, e à Universidade de Brasília, onde gentilmente me permitiram utilizar

equipamentos essenciais para realizar alguns experimentos do meu trabalho. Obrigada a todos pelo apoio!

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha dissertação de mestrado. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma lição de vida.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADO A TODOS!

“O conhecimento é como uma árvore,
as raízes são amargas, mas os frutos são doces.”

Aristóteles

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura	13
1.1 Tuberculose	14
1.2 Vacina BCG.....	15
1.2.1 Histórico	15
1.2.2 Epidemiologia da vacina BCG	16
1.2.3 Uso alternativo da BCG.....	17
1.2.3.1 Câncer de Bexiga.....	17
1.2.3.2 Hanseníase	17
1.2.3.3 Asma.....	18
1.2.3.4 Adjuvante	19
1.3 Imunologia da BCG.....	20
1.4 Imunidade Inata	22
1.4.1 Macrófagos	25
1.4.2 Neutrófilos	27
1.5 Citocinas	28
2- JUSTIFICATIVA.....	32
3. Objetivos	34
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4- Metodologia	36
4.1 Delineamento do Esquema de Vacinação	37
4.2 Lavado peritoneal	37
4.3 Microscopia de luz.....	38
4.4 Citometria de fluxo.....	38
5 - Resultados.....	40
5.1 Cinética de recrutamento de células	41
5.2 Análise fenotípica dos macrófagos recrutados.	48
5.3 Análise fenotípica dos neutrófilos recrutados.	51
5.4 Análise fenotípica das células NK recrutadas.	53
6- Discussão	58
7- Conclusão	65
8- Referências	67
9- Anexos	85

LISTA DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS E ANEXOS

Figuras.

Figura 1. Mapa da incidência da tuberculose no mundo.	15
Figura 2. Mapa da distribuição da vacina BCG no mundo	16
Figura 3. Esquema de inoculação e eutanásia dos camundongos.	37
Figura 4. Cinética de recrutamento de células para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG	42
Figura 5. Comparação do recrutamento de tipos celulares para a cavidade peritoneal de animais IL-22 ^{-/-} , IL-17 ^{-/-} e C57BL/6 após inoculação com BCG.	44
Figura 6. Fotomicrografia de preparado de citospin das células de camundongos C57BL/6 recrutadas para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG.	45
Figura 7. Fotomicrografia de preparado de citospin das células de camundongos IL-22 ^{-/-} recrutadas para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG.	46
Figura 8. Fotomicrografia de preparado de citospin das células de camundongos IL-17 ^{-/-} recrutadas para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG.	47
Figura 9. Exemplo de <i>Dot Plot</i> e histograma representando a seleção de macrófagos (F4/80 ⁺) do lavado peritoneal após inoculação com BCG, e a presença de CD11b e MHC de classe II	49
Figura 10. Porcentagem de macrófagos (F4/80 ⁺) no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17 ^{-/-} e IL-22 ^{-/-}) 2 e 5 dias após inoculação intraperitoneal de BCG.	50
Figura 11. Exemplo de <i>Dot Plot</i> e histograma representando a seleção de neutrófilos (Gr1 ⁺) do lavado peritoneal após inoculação com BCG, e a quantidade de CD11b	52
Figura 12. Porcentagem de neutrófilos (Gr1 ⁺) no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17 ^{-/-} e IL-22 ^{-/-}) 2 e 5 dias após inoculação intraperitoneal de BCG.	53
Figura 13. Exemplo de <i>Dot Plot</i> e histograma representando a seleção de células NK (NK1.1 ⁺ CD3 ⁻) do lavado peritoneal após inoculação com BCG, e a presença de CD11b.	54
Figura 14. Porcentagem de Células NK no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17 ^{-/-} e IL-22 ^{-/-}).	55
Figura 15. Porcentagem de Células CD3 ⁺ no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17 ^{-/-} e IL-22 ^{-/-}).	56

Figura 16. Porcentagem das diversas populações de linfócitos recrutadas para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6, IL-17 ^{-/-} e IL-22 ^{-/-}) em relação aos linfócitos totais, após inoculação com BCG.	57
Quadro.	
Quadro 1. Painéis usados para marcação celular da citometria de fluxo.	39
Anexos.	
Anexo 1. Parecer do comitê de ética.	85

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

TB - Tuberculose

AAM – macrófagos alternativamente ativados, do inglês “alternatively activated macrophages”

Ag85 – Antígeno 85

APC - Aloficocianina

APCs - Células apresentadoras de antígenos

Arg-1 - Arginase 1

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

CAM – Macrófagos classicamente ativados, do inglês “Classically activated macrophages”

CFU - Unidade formadora de colônia, do inglês "colony forming units”

CR3 – Receptor de complemento 3, do inglês “complement receptor 3”

CTL - Linfócito T citotóxico

CXCL – Quimiocina motivos C-X-C, do inglês “C-X-C motif chemokine”

DAP10 – Proteína adaptadora D, do inglês “D adaptor protein”

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

FC – Fragmento constante da molécula de Ig, do inglês “Fragment crystallizable ”

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FSC – Dispersão frontal, do inglês “forward scatter”

Gr1 – Granulócito 1

HE – Hematoxilina eosina

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

Ig- Imunoglobulina

IFN- γ - Interferon gama

IL - Interleucina

KO -Knock out

KHCO₃ - Bicarbonato de potássio

LI - Linfonodos inguinais

ManLAM - Lipoarabinomanana

MDR – Multidroga resistente, do inglês “multi drug resistant”

MHC II – Complexo Principal de histocompatibilidade II

MR – receptores de manose, do inglês “mannose receptors”

MS - Ministério da Saúde

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

NH₄Cl - Cloreto de amônia

NK - Matadora natural, do inglês "Natural Killer"

NOD2 – Domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo, do inglês “nucleotide-binding oligomerization domain”

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAI - Programa Ampliado de Imunização

PBMCs – células mononucleares do sangue periférico, do inglês “Peripheral blood mononuclear cells”

PBS – Salina fosfato tamponada, do inglês “Phosphate buffered saline”

PE – FicoeritrinaPercP - Peridinina Clorophil

PGE₂ - Prostaglandina 2

PIM - manosídio de fosfatidilinositol, do inglês “phosphatidylinositol mannoside”

RNI - Intermediários reativos de nitrogênio, do inglês “reactive nitrogen intermediates”

ROI – Intermediários reativos de oxigênio, do inglês “reactive oxygen intermediates”

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

SBF – Soro bovino fetal

SSC – Dispersão lateral, do inglês “side scatter”

TGF- β – Fator de transformação do crescimento - beta, do inglês “transforming growth factor”

TLRs - Receptores semelhante ao toll, do inglês “Toll like receptors”

TNF- α - Fator de necrose tumoral, do inglês "Tumoral necrose fator"

WHO - World Health Organization

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa responsável por milhões de mortes todos os anos. BCG (Bacille Calmette-Guérin) é a única vacina autorizada para a prevenção da tuberculose (TB) humana. A produção precoce de IL-17 e IL-22, como a induzida pela BCG, é importante para formação de células de memória protetoras na TB. Neste contexto, avaliamos o papel destas citocinas no recrutamento e ativação das células da imunidade inata induzida pela vacina BCG. Foram utilizados camundongos C57BL/6, IL22^{-/-} e IL17^{-/-}. Células do lavado peritoneal foram avaliadas por citospin e citometria 24 horas, 2º, 3º, 5º e 7º dias após infecção com BCG, via intraperitoneal (1×10^6 /mL). O recrutamento de macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺) para o peritônio foi semelhante em todos os animais avaliados, porém nos camundongos IL17^{-/-} estas células expressavam mais moléculas de MHC de classe II. Os neutrófilos (Gr1⁺) foram inicialmente mais recrutados nos camundongos IL17^{-/-} e IL22^{-/-} em relação ao C57BL/6 ($50,9 \pm 5,4$; $31,7 \pm 1,7$). Após 5 dias da inoculação, estas células apresentavam-se mais ativadas (Gr1⁺CD11b⁺) no camundongo IL17^{-/-} que nos outros animais. Quanto as células NK (NK1.1⁺), dois dias após a inoculação, houve recrutamento nos C57BL/6 enquanto que poucas células NK migraram para o peritônio nos camundongos IL22^{-/-} e IL17^{-/-}. Novamente essas células encontravam-se mais ativadas nos IL17^{-/-} que nos outros animais (NK1.1⁺CD11b⁺). A vacinação intraperitoneal com BCG recruta macrófagos, neutrófilos e células NK para o peritônio. Na ausência de IL17 estas células são mais ativadas do que nos outros camundongos, indicando um perfil de ativação superior.

Palavras-chave: Tuberculose, BCG, resposta imune Inata.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease responsible for millions of deaths every year. BCG (Bacille Calmette-Guérin) is the only licensed vaccine for the prevention of human tuberculosis (TB). Early production of IL-17 and IL-22 as induced by BCG is important for protective memory cells formation in TB. In this context, we evaluated the role of these cytokines in the recruitment and activation of cells of the innate immunity induced by BCG vaccine. C57BL/6, IL22^{-/-} and IL17^{-/-} mice were used. Cells obtained after peritoneal lavage were evaluated by flow cytometry and citospin 24 hours, 2, 3, 5 and 7 days after infection with BCG, intraperitoneally (1x10⁶/ml). The macrophages recruitment (F4/80⁺ CD11⁺) to the peritoneum was similar for all animals, but in IL17^{-/-} mice, these cells expressed more MHCII molecules. Neutrophils (Gr1⁺), initially presented higher percentage in IL17^{-/-} and IL22^{-/-} mice compared with C57BL/6 (50.9 ± 5.4, 31.7 ± 1.7). These cells were more activated (Gr1⁺CD11b⁺) in the IL17^{-/-} mice at 5 days post inoculation. NK cells (NK1.1⁺) was recruited in C57BL/6, mice whereas few NK cells migrated to the peritoneum in IL22^{-/-} and IL17^{-/-} mice, two days after inoculation. Again, these cells were also more activated in IL17^{-/-} than in other animals (NK1.1⁺ CD11b⁺). In summary, intraperitoneal immunization with BCG recruit macrophages, neutrophils and NK cells into the peritoneum. In the absence of IL17 these cells are more activated than in the other mice, indicating a higher activated profile, although these cells were reduced.

Key words: Tuberculosis, BCG, innate immune response.

1. Revisão de Literatura

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Esta doença geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas pode também afetar outros órgãos (TB extrapulmonar). É uma doença transmitida pelo ar quando pessoas doentes com a forma pulmonar expõem bactérias através da tosse, por exemplo. Em geral, uma proporção relativamente pequena de pessoas infectadas com o Mtb vai desenvolver a tuberculose ativa, no entanto, a probabilidade de desenvolver a doença é muito maior entre pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A TB também é mais frequente entre os homens do que mulheres, e afeta principalmente adultos na idade economicamente produtiva, sendo estimado que cerca de dois terços dos casos ocorrem em pessoas entre 15-59 anos (WHO, 2011).

Apesar da disponibilidade de tratamentos altamente eficazes, a tuberculose continua a ser um grande problema de saúde global (Figura 1). Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB uma emergência de saúde pública mundial, num momento em que foram estimados 7-8 milhões de casos e 1,3-1.6 milhões de mortes a cada ano. Em 2010, foi estimado de 8,5-9,2 milhões de casos e 1,2-1,5 milhões de mortes (incluindo mortes por tuberculose entre pessoas HIV-positivas). TB é a segunda principal causa de morte por doenças no mundo (WHO, 2011).

O conhecimento sobre a dinâmica dessa doença tem como marco a identificação do bacilo *M. tuberculosis* por Robert Koch, em 1882. A TB é causada primariamente pelo Mtb (bacilo de Koch), entretanto em muitas partes do mundo uma quantidade significativa da doença é também devida à infecção por outras espécies de micobactérias que pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, como *M. africanum*, *M. canetti*, *M. Bovis*, BCG, *M. microti* e *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003).

O Mtb é o agente etiológico da tuberculose, pertencente à ordem dos *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família *Mycobacteriaceae*. São bacilos aeróbios, não formadores de esporos, sem flagelos, intracelulares facultativos, medindo de 1 – 4µm de comprimento por 0,3 – 0,6 µm de largura. Caracterizam-se por serem bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).



Figura 1. Mapa da incidência da tuberculose no mundo. Em verde os 22 países responsáveis por 82% da tuberculose mundial. Adaptado de WHO 2013.

1.2 Vacina BCG

1.2.1 Histórico

A cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, conhecida como BCG (Bacille Calmette-Guérin), é a única vacina autorizada para a prevenção da tuberculose (TB) humana. Ela foi inicialmente obtida de uma cepa virulenta e desenvolvida na França entre 1908 e 1921 por Albert Calmette (1863-1933) e Camille Guérin (1872-1961). Sua utilização iniciou-se em 1921, após processo de atenuação da BCG, foram mais de 10 anos de pesquisa com mais de 230 passagens seriadas *in vitro*. Esta atenuação promoveu em torno de 16 deleções de regiões genômicas, designadas RD1-RD16, quando comparada ao *Mycobacterium tuberculosis* (BROSCH et al., 2000). A proteção conferida por BCG varia de 0 a 80 % (COLDITZ et al., 1995), protegendo crianças das formas mais graves da TB, como a meningite tuberculosa e tuberculose miliar, com uma proteção de 52 e 100% respectivamente. Entretanto, em relação à proteção em adultos, sua eficácia é altamente variável (DELOGU & FADDA, 2009, WHO, 2012).

A vacina BCG foi trazida para o Brasil em 1927, por Arlindo de Assis, que recebeu uma cepa da BCG trazida por Moreau, a qual passou a ser denominada BCG Moreau – Rio de Janeiro. Apesar das modificações genéticas, não foi observada redução da

capacidade protetora originalmente descrita (BREWER, 1995), sendo a cepa brasileira considerada uma das mais imunogênicas dentre as 12 estirpes vacinais atualmente em uso (LADEFOGED, 1976).

1.2.2 Epidemiologia da vacina BCG

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a vacinação com a BCG em áreas de alta prevalência e incidência de TB. A vacinação com a BCG é atualmente obrigatória em aproximadamente 64 países e é administrada em 167 países que fazem seu uso no esquema vacinal, tornando a BCG a vacina mais amplamente utilizada no mundo inteiro, como demonstrado na Figura 2 (WHO, 2013).

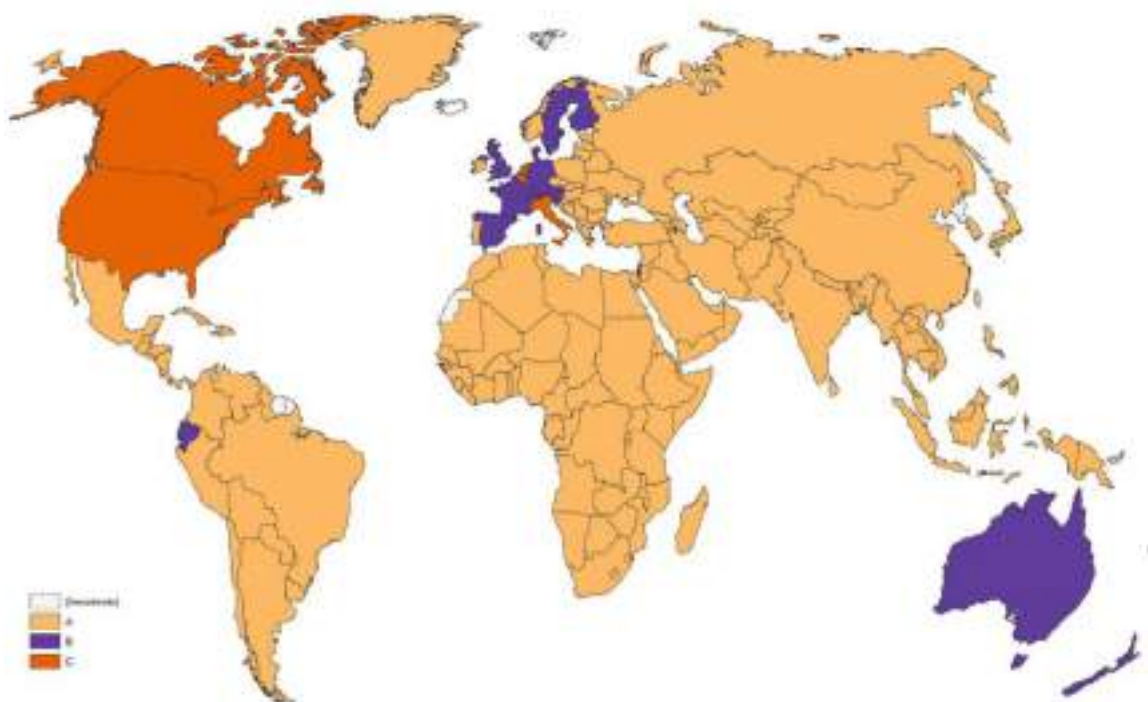


Figura 2. Mapa da distribuição da vacina BCG no mundo. A: Países que usam a BCG no programa vacinal universal. B: Países que recomendavam a vacinação com a BCG, mas atualmente não o fazem. C: Países que nunca tiveram a BCG no programa vacinal universal. Adaptado de Zwerling et al., 2012.

No ano de 1974, a vacinação com BCG foi introduzida ao Programa Ampliado de Imunização da organização mundial da saúde (PAI/OMS). Hoje, a cobertura vacinal da BCG chega aos 85% dos recém-nascidos. A cada ano estima-se que aproximadamente 100 milhões de crianças recebam a vacina BCG, mas em países africanos, sudeste da Ásia e oeste do Pacífico as coberturas vacinais são as mais baixas (FINE et al., 1999).

A BCG é uma vacina de baixo custo que tem sido administrada a 2,5 bilhões de pessoas desde 1948. Ela tem um perfil de segurança bem estabelecido e tem atividade adjuvante comprovada, estimulando tanto respostas imunes mediadas por células, quanto humoral. A BCG pode ser administrada logo após o nascimento de crianças ou em qualquer outro momento posterior, onde uma única dose é suficiente para conferir uma imunidade de longa duração em populações pouco expostas como índios norte-americanos (ARONSON, 2004).

1.2.3 Uso alternativo da BCG

1.2.3.1 Câncer de Bexiga

A BCG tem sido utilizada e recomendada como tratamento para o câncer não invasivo de bexiga, experimentos clínicos realizados desde 1985 mostraram que a terapia com a BCG reduziu as taxas de recorrência do câncer de 29 a 67%. Este efeito antitumoral da BCG foi reconhecido como dependente de células T. Em particular, a resposta do tipo “T helper 1” (Th1), mediada por células, incluindo linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL). O sistema imune inato também contribui para tal proteção, onde a BCG é capaz de recrutar um grande número de neutrófilos, células NK e linfócitos $\gamma\delta$ que possuem atividade antitumoral (KAWAI et al., 2013).

1.2.3.2 Hanseníase

A BCG foi desenvolvida almejando um efeito protetor contra a TB, entretanto, foi observado também proteção contra a hanseníase. Vários estudos para avaliar a proteção conferida pela vacina BCG em hanseníase foram feitos. Nestes estudos as populações alvo foram as atendidas pelos programas de controle de TB e contatos de hanseníase em serviços de rotinas. E foi verificado que houve uma proteção geral contra a hanseníase entre 36 a 90%. Em síntese, a primeira dose da vacina BCG protege contra hanseníase e uma dose a mais da vacina aumenta a proteção (ZODPEY, 2005, FINE et al., 1999).

No Brasil, a vacinação e revacinação são indicadas pelo Ministério da Saúde para contatos de pessoas doentes com hanseníase. No entanto, o impacto do uso da BCG para

proteção contra a hanseníase e o custo/efetividade ainda não foram publicados (CUNHA, 2004).

1.2.3.3 Asma

Têm sido relatado que infecções por BCG e outras micobactérias possuem efeito amenizador da asma, em camundongos, por reduzir a hiperresponsividade das vias aéreas e o recrutamento de eosinófilos devido ao perfil de resposta Th1 gerado por essas infecções (KOH et al., 2001; ERB et al., 1998; HERZ et al., 1998; WANG et al., 1998; HOPFENSPINGER et al., 2002; ZUANY-AMORIN et al., 2002). Han e colaboradores (2012) demonstraram que o sobrenadante de culturas de BCG e *M. tuberculosis* foram eficazes em suprimir a reação asmática em camundongos.

Algumas proteínas secretadas por essas micobactérias possuem papel importante na redução da reação asmática. O tratamento de camundongos com as proteínas Ag85, proteína de 38 KDa e MPB70, mostrou uma diminuição no número de eosinófilos no lavado brônquio-alveolar de camundongos com asma estabelecida, assim como diminuição na hiperresponsividade das vias aéreas, na mesma proporção que em camundongos asmáticos tratados com BCG viva; sugerindo uma possível utilização de proteínas micobacterianas purificadas como uma opção mais segura para o tratamento da asma (HAN, 2012).

Uma potente resposta Th1 gerada pela vacinação com BCG pode ser responsável pela proteção contra a asma, porém, o mecanismo exato de como essa supressão ocorre ainda é desconhecido. Zhang e colaboradores (2013) demonstraram a presença de populações de linfócitos CD4⁺ Th1 nos linfonodos inguinais (LI) de camundongos asmáticos após a vacinação neonatal com BCG. A reação asmática foi desencadeada pelo desafio dos camundongos com ovoalbumina, e foi observada uma diminuição no número dessas células no LI concomitante com aumento das mesmas no pulmão dos camundongos, sugerindo uma migração dessas células diante da inflamação no órgão. Além disso, as células TCD4⁺ do LI apresentaram altos níveis de CXCR3, enquanto o pulmão apresentou altos níveis de CXCL9, sugerindo que esse eixo de receptor de quimiocina-ligante seja o mecanismo utilizado para a migração das células para o tecido pulmonar. Quando realizada a excisão cirúrgica do LI dos camundongos, a vacinação com BCG perde seu efeito protetor contra a reação asmática (ZHANG, 2013).

1.2.3.4 Adjuvante

Devido a imunogenicidade e a capacidade de geração de resposta imune Th1, a vacina BCG têm sido estudada como adjuvante para vacinas contra outros patógenos, além de pesquisas para investigar se a resposta causada pela BCG pode interferir com a resposta de outras vacinas.

A vacina BCG funciona como potente adjuvante para vacina contra leishmaniose, em camundongos, quando administrada previamente a vacina de *Leishmania major* por via retal. O fato de esses dois organismos serem patógenos intracelulares e a BCG proporcionar uma indução de resposta imune celular corrobora a sua utilização simultânea para uma vacina contra leishmaniose. Soudi e colaboradores (2011) demonstraram a geração de resposta protetora Th1 quando a BCG foi coadministrada por via retal juntamente com extrato de leishmania major autoclavada em camundongos.

As regiões endêmicas para tuberculose costumam se sobrepõem às regiões endêmicas para malária. Nessas regiões é comum a utilização simultânea de vacinas anti-TB e anti-malárica. É sabido que co-infecções com outros microrganismos afetam a resposta imune protetora gerada pela vacinação com BCG (ELIAS et al., 2005 & 2008; MANSOOR et al., 2009). Parra e colaboradores (2011), demonstraram que a co-infecção de 4 diferentes cepas de BCG com o *Plasmodium yoelii*, em camundongo, não gerou nenhuma alteração significativa na resposta protetora após desafio com Mtb. Esses dados são importantes para o desenvolvimento de novas vacinas contra TB em regiões endêmicas de malária.

Vacinas para malária que contém BCG estão sendo estudadas, aproveitando o poder indutor de resposta imune da BCG. Por exemplo, Teo e colaboradores (2012), construíram uma cepa BCG expressando a proteína de 22KDa de *Plasmodium falciparum*, e demonstraram que essa formulação vacinal foi eficiente em induzir imunidade celular e humoral em camundongos. O soro dos animais imunizados foi capaz de reconhecer os parasitas fixados, sugerindo uma possível utilização dessa BCG como vacina para malária.

1.3 Imunologia da BCG

Segundo Kaufmann (2005) e Fletcher, (2007), os mecanismos e interações que geram a proteção à tuberculose pós-vacinação com BCG não são bem compreendidos. É sabido que a resposta imune do tipo Th1 é eficaz no combate à tuberculose, sendo essa resposta mediada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Apesar da vacinação com BCG ser capaz de induzir resposta Th1, essa resposta é insuficiente na proteção de adultos jovens, e ineficaz quando utilizada em esquema de doses de reforço. Hokey e Ginsberg sugerem que essa falha pode ser causada pela incapacidade da BCG em direcionar a resposta contra epítomos de Mtb e por isso não contribuir para a proteção, ou que a ação das citocinas IFN- γ e TNF não seria suficiente no combate à doença (HOKEY & GINSBERG, 2013).

Além disso, foi demonstrado que a vacinação com BCG em recém-nascidos influencia a resposta imune humoral, podendo interferir na imunização contra outras infecções. Ritz e colaboradores (2012), através de estudos com recém-nascidos que receberam BCG e os que não receberam, constataram que a vacinação com BCG no nascimento aumentou a resposta humoral da imunização contra pneumococo. Entretanto, a resposta de anticorpos à imunização para hepatite B foi menor no grupo vacinado previamente com BCG que nos recém-nascidos que não foram vacinados.

A importância do papel das células TCD8⁺ induzidas pela vacinação com BCG é evidenciado por experimentos utilizando camundongos C57BL/6 deficientes da molécula do complexo principal de histocompatibilidade do tipo 1 (MCH I); onde após imunização com BCG e desafio com Mtb, a sobrevivência desses camundongos foi drasticamente reduzida e a carga bacilar nos pulmões aumentou em relação aos animais C57BL/6 (FLYNN et al., 1992; BEHAR et al., 1999). Micobactérias são capazes de induzir células TCD8⁺ específicas em humanos (PITHIE et al., 1995; SILVA et al., 2014). Hanekom e colaboradores (2005) demonstraram, a partir da análise de sangue total de recém-nascidos vacinados com BCG, no sul da África, que a vacinação induz células CD8⁺ funcionais, embora em uma frequência menor que células CD4⁺.

A resposta imune celular baseada em células T contra BCG está bem caracterizada. Através de experimentos com sangue total de recém-nascidos na África do Sul, Soares e colaboradores (2012), caracterizaram a função e fenótipo das células T

envolvidas nessa resposta. Foi demonstrado que a resposta predominante é do tipo Th1, com produção de IFN- γ e grande indução de células CD4⁺ responsivas entre 4-6 semanas após a vacinação. Os pesquisadores descobriram que a vacinação leva a indução de células TCD4⁺ de memória que possuem características de células de memória central e de células efetoras.

No que diz respeito às diferenças de cepas da bactéria, vários estudos estão sendo realizados para um melhor entendimento desse mecanismo. Ritz e colaboradores (2011) constataram que crianças imunizadas com BCG-Denmark tiveram uma frequência maior de células citotóxicas na corrente sanguínea que crianças que receberam BCG-Japan ou BCG-Rússia, e essas células eram em sua maioria células CD4⁺, que já foram evidenciadas na TB (CANADAY, et al 2001).

Ritz e colaboradores (2007), também demonstraram que algumas cepas de BCG são capazes de gerar uma maior resposta pró-inflamatória. A cepa BCG Denwark Japan mostrou induzir maiores níveis de citocinas Th1, quando o sangue de recém-nascidos um ano após a vacinação foi avaliado (RITZ, 2011).

A resposta imune das diversas cepas de BCG apresentam várias contradições nos diversos estudos realizados sobre o assunto. Wu e colaboradores (2007) demonstram em seu trabalho que a cepa BCG-Denmark apresenta maior imunogenicidade que a cepa BCG-Japan, mas esses dados são questionados por dois outros estudos (HUSSEY et al., 2002; DAVIDS et al., 2006). Gorak-Stolinska e colaboradores (2006) mostraram que a imunogenicidade da cepa BCG-Glaxo é comparável à cepa BCG-Denmark, enquanto outro estudo (VIJAYALAKSHMI et al., 1995) demonstrou que essa cepa é mais imunogênica quando comparada a cepa BCG-Japan. Esses dados revelam a disparidade de perfis de resposta imunes gerados pelas diferentes cepas, o que corrobora a variação da proteção nos diversos países que tem a BCG em seus programas vacinais.

No que diz respeito às células polifuncionais, que são importantes na resposta imune protetora à tuberculose (DERICK et al., 2011), Ritz e colaboradores (2011), demonstraram que as cepas BCG-Denmark e BCG-Japan foram capazes de induzir populações maiores dessas células em recém nascidos quando comparadas à cepa BCG-Rússia.

1.4 Imunidade Inata

A imunidade inata é o conjunto de mecanismos homeostáticos presentes no organismo desde o nascimento ; de ação rápida e composto por células como macrófagos, neutrófilos, célula NK, eosinófilos, linfócitos B1 e células dendríticas; pelas barreiras epiteliais e químicas, como pele e o baixo pH estomacal; por mediadores solúveis como as proteínas do sistema complemento e várias moléculas microbidas como as defencinas (Brubaker, 2014). Evolucionariamente, a imunidade inata é um dos primeiros mecanismos de manutenção da homeostasia desenvolvido em um organismo, não estando relacionada apenas com a defesa contra patógenos. Sua importancia pode ser notada devido à maioria dos seres vivos, como plantas e insetos, sobreviverem apenas com esse sistema, visto que a imunidade adaptativa se desenvolveu a partir dos vertebrados mandibulados (Gourion, 2014).

No caso da tuberculose, após a inalação de gotículas contaminadas, expelidas por um indivíduo infectado ao tossir, espirrar ou falar; o Mtb vai para os pulmões do novo hospedeiro. O primeiro encontro das micobactérias provalmente ocorre com os macrófagos alveolares residentes, que as fagocitarão. Na maioria dos casos, o macrófago alveolar, consegue destruir ou inibir a multiplicação dessas bactérias, e a infecção cessa ou se torna latente; o que evidencia o papel importante do sistema imne inato na proteção à TB. Após a fagocitose, o fagossomo contendo as bactérias será fundido à um lisossomo presente no citoplasma da célula, dando origem à organela chamada fagolisossomo. Dentro do fagolisossomo, as bactérias são expostas ao pH ácido (4,5) dos lisossomos e às hidrolases presentes nessas organelas; acarretando na destruição desses microorganismos (BURGDORF, 2008). As bactérias que escaparem da destruição inicial no fagolisossomo, podem se multiplicar. Isso acarretará na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, atraindo monócitos e outras células inflamatórias para o pulmão. Os monócitos inflamatórios se diferenciam em macrófagos, que fagocitam as bactérias e dão início à formação do granuloma (VAN CREVEL; 2002). Duas a três semanas após a infecção, células T específicas se desenvolvem, migram para o pulmão e produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ que irá ativar os macrófagos para o controle da infecção (PAGÁN, 2014).

A primeira e mais importante etapa na ativação da resposta imune inata é o reconhecimento do patógeno. Este se dá pela ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) com receptores presentes nas células, chamados receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Dentre esses receptores se encontram principalmente os receptores semelhantes a Toll (TLRs). Essa ligação desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , que levarão à formação do processo inflamatório (KLEINNIJENHUIS; 2010)

O IFN- γ ativa os macrófagos para eliminar as micobactérias. Ele também aumenta a expressão de moléculas de MHC classe II nos macrófagos que resulta na apresentação de antígenos melhorada às células T. A importância crucial do IFN- γ para a defesa antimicobacteriana é demonstrado pelo aumento da susceptibilidade à infecções por micobactérias em pacientes com deficiências no receptor de IFN- γ ou deficiências do receptor de IL-12 (ALTARE, 1998; OTTENHOFF, 2002).

Os TLRs são uma família de receptores, primeiramente descritos em *Drosophila melanogaster*, que nos mamíferos é composta por 12 membros. Eles são expressos na superfície da membrana celular ou na membrana de vesículas de endocitose, principalmente nos macrófagos e nas células dendríticas. A interação de moléculas da micobactéria com seu devido TLR dá início a uma via de sinalização baseada na ativação de MyD88 (UNDERHILL, 1999). Em seguida, se inicia uma cascata de sinalização para a qual são recrutadas moléculas como IRAK, TRAF-6, TAK-1 e MAPs, que levará à ativação e translocação do fator de transcrição nuclear (NF) - κ B (TAKEDA, 2004). Isto permite a transcrição de genes envolvidos na ativação da resposta imune inata, principalmente a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IL1 β , e IL-12 e de óxido nítrico (AKIRA, 2003)

Para o reconhecimento do Mtb foi demonstrado o envolvimento dos TLRs 2, 4, 9 e possivelmente o TLR8 (TAPPING & TOBIAS, 2003). O TLR2 se encontra na membrana plasmática associados na forma de heterodímero com TLR1 ou TLR6. Estes heterodímeros reconhecem glicolípídeos da parede das micobactérias como LAM e manose de fosfatidilinositol (PIM) (MEANS, 2001; DAVILA, 2008). O TLR2 atua na iniciação da resposta imune inata através da indução da produção de TNF α (UNDERHILL, 1999; BAFICA, 2005) e da liberação de IL-12 em macrófagos (POMPEI,

2007). Estudos mostraram que camundongos deficientes de TLR2 apresentam formação de granulomas prejudicada e maior susceptibilidade à infecção por Mtb (REILING, 2002; DRENNAN, 2004).

A proteína de choque térmico de 60/65 KDa que é secretada por diversas espécies de micobactérias pode ativar TLR4 (OHASHI, 2000). Macrófagos de camundongos deficientes em TLR4 apresentaram menor capacidade de produzir de TNF α , em estudos *in vivo*, o papel do TLR4 no reconhecimento de micobactérias é ainda pouco explorado e apresenta resultados conflitantes (REILING, 2002). O TLR8 reconhece RNA de cadeia simples de agentes patogênicos, como vírus de RNA. Davila et al. (2008) demonstrada uma regulação positiva na expressão de TLR8 em macrófagos após a infecção com BCG. Este estudo sugere uma atuação do TLR8 no reconhecimento de Mtb, mas o mecanismo e sinalização citoplasmática continuam desconhecidos.

O sistema imune inato tem grande importância na proteção induzida por BCG. Monócitos, por exemplo, são células chave na defesa contra vários microrganismos. Kleinnijenhuis e colaboradores (2012) demonstraram que além da resposta imune gerada por células T de memória antígeno específicas após vacinação com BCG, as células do sistema imune inato, como os macrófagos, podem ser funcionalmente programadas em um fenótipo de ativação aumentado após contato com BCG. Isso sugere que essas células têm papel importante na resposta imune durante uma reinfecção por micobactérias. Kleinnijenhuis e colaboradores também constataram que o mecanismo pelo qual a vacina BCG “treina” essas células é baseado em mudanças epigenéticas relacionadas com NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain - 2*) na metilação de histonas. Esse mecanismo também confere proteção aumentada contra outras infecções além da tuberculose.

A epigenética na resposta imune inata é pouco estudada. Esse fenômeno é mediado por células imunes inatas tais como monócitos/macrófagos e células NK, e é de curta duração. Na maioria das vezes essa imunidade treinada é inespecífica, e o provável mecanismo para sua formação seria a reprogramação epigenética, principalmente a trimetilação do resíduo de lisina 4 na cauda N-terminal das histonas tipo 3 (H3K4) (WEIR, 2006; NACKERS, 2006). Uma evidência que sugere que a imunidade inata está de fato envolvida na proteção induzida por BCG vem de um estudo conduzido por Grode

e colaboradores (2005) que mostrou que uma vacina BCG recombinante expressando listeriolisina foi capaz de proteger tanto camundongos normais quanto camundongos SCID contra desafio com Mtb; atuando dessa forma independente do sistema imune adaptativo.

O fato de a BCG poder exercer ação na possível memória imunológica inata tem grande impacto no desenvolvimento de novas vacinas para a tuberculose pois poderiam combinar efeitos das imunidades adaptativa e inata (NETEA, 2014).

1.4.1 Macrófagos

Os macrófagos constituem as principais células da imunidade inata responsáveis pela resposta contra o Mtb (RAJA 2004). Porém, além deles, outros componentes da resposta inata compartilham esse processo. Tem sido descrito que as células dendríticas, neutrófilos e células natural killer (NK) apresentam participação nesse mecanismo (DOZ, 2013; JUNQUEIRA-KIPNIS et al. 2003). As células NK pode induzir a morte de Mtb ou macrófagos/monócitos infectados, ao mesmo tempo em que podem ativar fagócitos no sítio de infecção (Raja 2004).

Macrófagos estão presentes em diversos tecidos, desde a pele até o sistema nervoso. Essas células são dependentes de fatores do microambiente para sua diferenciação nos diferentes tecidos, como fatores de crescimento, citocinas e até outras células (GEISSMANN, 2010). O macrófago reconhece e fagocita partículas estranhas, inclusive Mtb, graças à vasta gama de receptores presentes em sua superfície, receptores *scavenger*, receptores de manose (MR), receptores de complemento e receptores semelhantes a TOLL (TLRs). Após a fagocitose, uma cascata de sinalização é iniciada e culmina na produção de moléculas nocivas aos microrganismos e demais mediadores imunes e antimicrobianos que interagem com demais células da imunidade inata (GUIRADO, 2013).

Estudos sugerem que o fenótipo de ativação dos macrófagos é determinado ao interagir com certos mediadores solúveis, como IL-4, IL-13, IL-12, IFN- γ , TNF- α , entre outros, (STOUT, 2004); outros estudos defendem a ideia que de acordo com mudanças no microambiente, essas células podem ter seu perfil de ativação continuamente alterado (STOUT, 2009; MURRAY, 2011). As funções dos macrófagos depois da infecção por

micobactérias são estritamente dependentes do fenótipo de ativação, que é determinado pela sinalização bactéria-induzida através dos receptores de reconhecimento de padrões (ANDRADE et al. 2012). Isso implica nas diferentes interações entre os macrófagos e o Mtb ou BCG de acordo com o microambiente em que a célula encontra os patógenos (GUIRADO, 2013).

Macrófagos estimulados com citocinas Th1 (IFN- γ) polarizam-se para células pró-inflamatórias M1, aumentando o nível de ativação na presença de micróbios, e desenvolvendo o fenótipo típico de macrófagos classicamente ativados (do inglês: *classically activated macrophages* – CAM) (GORDON 2003). Essas células produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e geram reativos intermediários de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) que aumentam as funções bactericidas e citotóxicas dos macrófagos.

Em contraste, macrófagos ativados com citocinas da resposta “T helper tipo 2” (Th2) como IL-4 e IL-13, expostas à imunocomplexos em combinação com ligantes de TLRs, ou IL-10, polarizam-se para fenótipos M2 distintos, M2a, M2b e M2c, respectivamente, são chamados macrófagos alternativamente ativados (do inglês: *alternatively activated macrophages* - AAM), os quais apresentam atividades anti-inflamatórias e de reparo tecidual (MANTOVANI, 2004). Os macrófagos M2 são caracterizados pela expressão de marcadores típicos, incluindo aumento da expressão e atividade de arginase-1 (Arg-1), aumento na expressão de receptores *scavenger* e receptores de manose (MR/CD206), e produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10).

Os macrófagos alveolares tem um papel central na defesa das vias aéreas, (GORDON, 2003). A determinação do fenótipo de ativação dessas células pela vacina BCG se torna interessante, devido às propriedades das células M1 de estimular uma resposta do tipo Th1 pela liberação de IFN- γ , IL-12 e demais citocinas pró-inflamatórias; e propriedades das células M2 de reparação tecidual; o que é interessante em doenças de lesão tecidual inflamatória como a TB; e regulação da resposta inflamatória, pela produção de IL-10 e TGF β .

A molécula F4/80 é uma glicoproteína também conhecida como Ly71 e EMR1. É um marcador de superfície de macrófagos bem caracterizado e extensivamente referenciado. Pertencente a família da proteína EGF-TM7, é expressa em níveis elevados

em vários tipos de macrófagos, como células de Kupffer, macrófagos esplênicos de polpa vermelha, microglia, lâmina própria do intestino, e as células de Langerhans na pele. A molécula F4/80 é também expressa nos macrófagos teciduais no coração, rim, sistema reprodutor, e neuroendócrino (KINOSHITA, 2010).

1.4.2 Neutrófilos

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleados de maior abundância no organismo. Devido à sua capacidade de fagocitose e liberação de mediadores essenciais à resposta imune, os neutrófilos são células importantes no controle inicial de infecções, como a do Mtb, dando início à resposta inflamatória (DOZ, 2013).

Neutrófilos atuam tanto na resposta imune quanto na patogenia de algumas doenças, e isso é determinado pelo número e atividade dessa célula no sítio da enfermidade. É sabido que antígenos de micobactérias são capazes de ativar neutrófilos, que então apresentam potencial micobactericida por mecanismos já conhecidos, como produção de radicais reativos de oxigênio e peptídeos antimicrobianos (KOLACZKOWSKA, 2013). Foi observado que quadros de neutropenia contribuem para o crescimento de *Mycobacterium avium*, a depleção dessas células acarretam na diminuição do potencial do sangue total de restrição do crescimento de micobactérias (MARTINEAU, 2007).

No entanto, foi demonstrado que, quando comparados com macrófagos, os neutrófilos apresentam baixa capacidade de restrição do crescimento de micobactérias no pulmão (ERUSLANOV, 2005), o que sugere que a presença dessas células na reação inflamatória da tuberculose está mais relacionada ao processo patológico. Desse modo, a depleção dessas células contribuiu significativamente na sobrevivência de camundongos após desafio com Mtb (KELLER, 2006). Foi ainda demonstrado que, em camundongos susceptíveis à infecção por Mtb, uma migração aumentada de neutrófilos para os pulmões está associada com a disseminação broncogênica do bacilo (CARDONA, 2000).

Ao fagocitar micobactérias, os neutrófilos podem sofrer apoptose (ALEMAN, 2002). O Mtb é capaz de induzir a apoptose de neutrófilos após ser fagocitado através da indução de alguns fatores de transcrição dessas células (ALEMAN, 2004; 2005). Macrófagos, ao fagocitar os corpúsculos apoptóticos de neutrófilos, iniciam a produção

de prostaglandina E2 (PGE2) e TGF β 1 (FADOK, 1998), e essas citocinas acarretam na diminuição do potencial bactericida dos macrófagos quando presentes nos processos de apoptose (FREIRE-DE-LIMA, 2000; RIBEIRO-GOMES, 2004). Foi demonstrado que altos níveis de PGE2 está relacionado com o avanço da doença, e regulação de células imunes importantes na resposta protetora (HSUEH, 1979; HINES, 1995). Desse modo o papel do neutrófilo na infecção por Mtb ou na vacinação por BCG permanece controverso e carente de novos estudos.

O antígeno de diferenciação mielóide Gr-1, é uma proteína de 21-25 kDa, também conhecido como Ly-6G. A proteína ligada a GPI, Gr-1 é expressa pela linhagem mielóide durante seu desenvolvimento na medula óssea. A expressão de Gr-1 nos granulócitos de medula óssea é mantida em neutrófilos periféricos sendo um bom marcador para estas populações, visto que os monócitos expressam Gr-1 apenas transitoriamente durante o seu desenvolvimento (HARDING, 2014).

Quando estimulados, os neutrófilos exibem uma maior ativação da molécula CD11b, que é uma integrina importante para a adesão de leucócitos e para a migração. Essa molécula é mediadora da inflamação através da regulação da adesão de leucócitos e tem sido relacionada com vários processos imunológicos, tais como fagocitose, citotoxicidade mediada por células, quimiotaxia e ativação celular (SOLOVJOV, 2005).

1.5 Citocinas

IL-22 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células Th1 e Th17 que faz parte da família da IL-10 (WOLK et al, 2004; SABAT et al., 2010). O receptor da IL-22 é composto por duas subunidades, IL-22R1 e IL-10R2 (WOLK, 2006; 2007). O IL-22R1 está presente em uma variedade de tecidos não imunes, como pele, pulmão, rins, pâncreas dentre outros, enquanto o IL-10R2 é altamente expresso em células do sistema imune, como linfócitos B, T e células NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas e hepatócitos (WOLK et al., 2004-2006). O IL-22R1 não está presente nas células da resposta imune, tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T e células NK, estando presentes apenas nos hepatócitos (WOLK et al., 2004). Há também uma IL-22R solúvel conhecida como proteína ligadora de IL-22 (IL-22RP)

que é codificada por outros genes, mas que possui afinidade maior pela IL-22 que o próprio IL-22R1 (WOLK et al., 2007).

Esta citocina age em tecidos não imunológicos e está muito relacionada ao desenvolvimento de doenças crônicas como psoríases, doença de Crohn e artrite reumatoide (ANDOH et al., 2005; IKEUCHI et al., 2005). Um dos mecanismos de indução das doenças autoimunes é por exercer efeito supressor de APCs-CD11b+ (KE et al., 2011).

Foi demonstrado que células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos, ao serem infectadas por BCG produzem CXCL1 e CXCL2 que podem atuar no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. Após contato com essas células dendríticas, os neutrófilos passam a produzir IL-10 via Myd88 e tirosina kinase (DOZ et al 2013), inibindo a ação de células Th17, bem como a produção de IL-17. Os neutrófilos são células fagocíticas que apresentam um importante papel em infecções por micobactérias, sendo que após serem recrutadas para o sítio de infecção essas células podem transferir bacilos vivos para os nódulos linfáticos drenantes (ABEBE et al., 2005). Dessa maneira promovem o amadurecimento de células dendríticas e a polarização de perfis de linfócitos T nos linfonodos (MOREL et al., 2008).

Eosinófilos humanos ao reconhecerem BCG são regulados negativamente quando o receptor transmembrânico CR3 se liga a Lipoarabnomanana (ManLAM), um importante componente da parede micobacteriana, causando a inibição da produção de peroxidase e TNF- α nessas células (DRISS et al., 2012).

Em pacientes que tiveram contato com micobactérias, foi constatada a produção de IL-22 e IL-17 por linfócitos TCD4+, após cultura dos PBMCs com BCG. O link entre a inflamação severa e IL-22 sugere que esta citocina pode contribuir para resposta inflamatória ao Mtb (SCRIBA et al., 2008). Células NK produzem IL-22 quando estimuladas por IL-15 por uma via de sinalização dependente de DAP10. Células NK produtoras de IL-22 inibem o crescimento de micobactérias em macrófagos infectados. A IL-22 age nessas células, que possuem o receptor IL-22R, por meio do aumento da fusão fagolisossomal, processo que requer a expressão de proteína ligadora de cálcio: calgranulina A (DHIMAN et al., 2009; DHIMAN et al., 2013).

Em modelo animal foi observado que 48 horas após vacinação com BCG há um aumento de células NK produtoras de IL-22 nos nódulos linfáticos drenantes e no baço. Foi constatado que há uma queda dessa população após 72 horas da vacinação nos dois órgãos. Após tratamento com anticorpos anti-células NK1.1 (células NK produtoras de IL-22), há um aumento da população de células Treg+FOXP3+ (DHIMAN et al., 2012), que contribui para a manutenção das micobactérias, por impedir a resposta imune inflamatória. Portanto, a IL-22 produzida por células NK parece contribuir para a melhora na proteção gerada pela BCG, além de expandir a população de linfócitos TCD4+ de memória observada após desafio com Mtb (DHIMAN et al., 2012).

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina de assinatura das células Th17, uma subpopulação de células TCD4⁺. Essa citocina tem sido descrita na formação de processos inflamatórios, tumores, doenças autoimunes e no combate a fungos e infecções bacterianas (MADDUR, 2012). A IL-17 está relacionada com o recrutamento de macrófagos e ativação dessas células para produção de mediadores imunes, promovendo uma comunicação entre imunidade inata e adquirida (BARIN, 2012; FANG 2011). Estudos demonstram que essa citocina é também expressa por células da imunidade inata como macrófagos e mastócitos (VYKHOVANETS, 2011; Song, 2008; DA SILVA, 2008).

A inflamação mediada por IL-17 é a chave do processo patológico de diversas doenças autoimunes e processos inflamatórios, como psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, esclerose múltipla, entre outras (MADDUR, 2012).

A citocina IL-17 é de fundamental importância no recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios (KORN, 2009; MOSSEC, 2012). Essa citocina está relacionada com vários fatores da resposta imune, inclusive com células da imunidade adquirida, por exemplo, em experimentos de imunização com BCG, as células Th17 regulam negativamente a produção de IL-10, desse modo, modulam a resposta imune para um perfil Th1 (GOPAL, 2012). A resposta Th17 induzida por BCG ocorre previamente a resposta Th1, e na falta de citocina IL-23, importante na formação do perfil Th17, ocorre redução tanto da população Th17 como da população Th1. No entanto, na ausência de IL-10, a imunização com BCG, induz a formação de células Th1 de maneira independente das células Th17 (GOPAL, 2012).

Apesar de ser importante na indução de fenótipo celular imune protetor, a IL-17 promove danos teciduais durante a infecção por Mtb (TORRADO, 2010; DESVIGNES, 2009), e nas demais doenças em que sua atuação é observada (JOVANOVIC, 1998; EDDENS 2012). A vacinação repetida com BCG também induz aumento da produção de IL-17 e maior recrutamento de neutrófilos para o pulmão acarretando em piora da patologia do tecido pulmonar (CRUZ, 2010). Desse modo, uma resposta ideal para proteção contra tuberculose deve promover um balanço entre as respostas Th1 e Th17 (JUNQUEIRA-KIPNIS, 2013).

Vários estudos demonstram que células B e a imunidade humoral tem papel na modulação da resposta imune de células T, atuando na formação de células T de memória (LUND, 2010; MAGLIONE, 2009). Trabalhos tem mostrado que as células B estão relacionadas com a regulação da resposta Th17 (HAMEL, 2008; MATSUSHITA, 2008), sendo relatado que, em humanos com tuberculose, uma subpopulação de células B foi capaz de suprimir a resposta Th17 (ZHANG, 2012).

2- JUSTIFICATIVA

A tuberculose 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 multidroga resistência (MDR). São notificados aproximadamente nove milhões de novos casos e 1,9 milhões de mortes por ano, sendo que 98% destes casos se encontram nos países em desenvolvimento. O Brasil encontra-se em 16º lugar no “ranking” dos 22 países com maior índice de prevalência de tuberculose (WHO 2011).

Um melhor prognóstico para a infecção por *M. tuberculosis* pode ser parcialmente atribuído à eficiência da imunidade inata do hospedeiro (VANCREVEL, 2002). As células pertencentes à essa resposta imune, como macrófagos, neutrófilo e células NK, são de suma importância no contato inicial e combate à infecção. Diversas citocinas estão envolvidas na ativação e recrutamento dessas células, entre elas, duas de papel importante e não bem caracterizadas são IL-17 e IL-22 (KOZAKIEWICZ, 2013).

Apesar de não proteger indivíduos adultos contra a tuberculose, a BCG é a vacina utilizada mundialmente e que apresenta melhor desempenho para evitar a morte por tuberculose na infância. Apesar de vários estudos terem avaliado a resposta imune específica induzida por esta vacina, poucos estudos descreveram o seu papel no recrutamento de células da resposta imune inata e o envolvimento das citocinas IL-22 e IL-17 neste processo.

Dessa forma, este estudo busca esclarecer o papel dessas citocinas no recrutamento e ativação das células do sistema imune inato induzido pela vacina BCG, utilizando camundongos isogênicos deficientes em IL-22 ou IL-17.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o recrutamento, e o perfil das células da resposta imune inata induzidas pela vacinação intraperitoneal com BCG cepa Moreau na ausência das citocinas IL-17 e IL-22.

3.2 Objetivos específicos

- Inocular BCG cepa Moreau intraperitonealmente em camundongos C57BL/6, IL22^{-/-} e IL17^{-/-}.
- Determinar a cinética de migração celular após a vacinação intraperitoneal com BCG.
- Comparar e avaliar o fenótipo das células inflamatórias presentes no peritônio de camundongos vacinados intraperitonealmente com BCG.

4- Metodologia

4.1 Delineamento do Esquema de Vacinação

Foram utilizados camundongos fêmeas com 6 semanas de idade das linhagens C57BL/6, IL22^{-/-} e IL17^{-/-} provenientes do biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, que foram distribuídos ao acaso em grupos de cinco animais, em gaiolas com água e dieta *ad libitum* estéreis. As condições de temperatura, umidade e ventilação foram mantidas por estante ventilada em sala com dupla contenção e circulação de ar próprio. As trocas das gaiolas foram realizadas em fluxo laminar classe B2. O uso dos camundongos foi conduzido de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e aprovado por comitê de ética N° 027/14. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes independentes para comprovação da reprodutibilidade dos experimentos.

Os camundongos foram inoculados uma única vez com 10⁶ CFU de BCG Moreau em 1mL de PBS 0,05% Tween 80, intraperitonealmente. Cinco animais de cada linhagem receberam apenas PBS 0,05% Tween 80 como controle. Nos devidos pontos experimentais após a inoculação (Figura 3), 3 camundongos de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi realizada a coleta do lavado peritoneal.



Figura 3. Esquema de inoculação e eutanásia dos camundongos.

4.2 Lavado peritoneal

Para a obtenção do lavado, cada camundongo foi eutanasiado por deslocamento cervical no devido ponto experimental. Em fluxo laminar foi realizada a exposição do peritônio com o auxílio de tesouras cirúrgicas e pinças cirúrgicas. Foi injetado no peritônio 5 mL de PBS gelado para a desaderência das células, seguiu-se a realização de massagem dorsal com auxílio de pinça cirúrgica. Com uma seringa foi aspirado o lavado

peritoneal, e este foi armazenado em tubo de poliestireno de 15 mL em banho de gelo para posterior processamento.

4.3 Microscopia de luz

Para a contagem das células e realização da cinética de recrutamento celular, foi retirada uma alíquota de 150 µL do lavado recém-coletado. Essa alíquota foi processada em citocentrífuga (Citospin 248 Fanem) à 1000 rpm por 30 segundos. As lâminas resultantes foram fixadas pela adição de 10 µL de metanol PA (Impex) sobre o spot formado. Seguiu-se coloração da lâmina por kit de coloração rápida para hematologia InstantProv (NewProv) de acordo com especificações do fabricante. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Labomed Lx 400 (Labomed). Foram contadas cem células por quadrante em quatro quadrantes distintos de cada lâmina. A média dos valores de cada lâmina foi usada como representativo da contagem para aquela lâmina.

4.4 Citometria de fluxo

O lavado peritoneal foi centrifugado a 1250 rpm 4°C por 15 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1mL de meio RPMI completo (10% SBF, 1% L-glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 1% piruvato e 1% penicilina). Foram adicionados 200 µL da suspensão de células de cada camundongo à poços distintos de uma placa de cultura de 96 poços. A placa foi centrifugada a 1250 rpm 4°C por 15 min e o sobrenadante foi desprezado por inversão delicadamente; foi adicionado então, 50 µL de PBS 0,05% azida sódica 10% soro de camundongo normal e incubada por 30 min a 4°C para o bloqueio dos receptores de porção Fc dos fagócitos. Em sequência foi adicionado 200 µL de PBS 0,05% azida sódica em cada poço e a placa foi centrifugada a 1250 rpm 4°C por 15 min e o sobrenadante foi desprezado por inversão delicadamente. Preparou-se 150 µL de mix de anticorpos conjugados com fluorocromos (4 µL de anticorpos conjugados com FITC, e 8 µL de anticorpos conjugados com os demais fluorocromos, diluindo em PBS 0,05% azida sódica) para cada painel de acordo com o Quadro 1. Adicionou-se 25 µL do mix de anticorpos nos poços dos respectivos painéis e seguiu-se incubação de 30 min a 4°C no escuro. Em sequência foi adicionado 200 µL de PBS 0,05% azida sódica em cada poço e a placa foi centrifugada a 1250 rpm 4°C por 15 min e o sobrenadante foi desprezado por inversão delicadamente. A fixação foi feita pela adição

de 100 ul de PermFix (BD Biosciences) em cada poço, seguindo-se de incubação por 20 min a 4°C no escuro. Em sequência foi adicionado 100 ul de PBS 0,05% azida sódica em cada poço e a placa foi centrifugada a 1250 rpm 4°C por 15 min e o sobrenadante foi desprezado por inversão delicadamente. As células foram ressuspensas em 200 uL de PBS 0,05% azida sódica e armazenadas a 4°C no escuro até a aquisição em citômetro de fluxo FacsVersa.

A aquisição foi analisada em software FlowJo_V10.

	FITC	PE	PercP	APC
Painel 1	CD11b	MHC I	MCH II	F4/80
Painel 2	CD11b	MHC I	MCH II	Gr1
Painel 3	CD3	CD11b	--	NK1.1

Quadro 1. Painéis usados para marcação celular da citometria de fluxo. FITC - Isotiocianato de fluoresceína; PE – Ficoeritrina; PercP – Peridinina Clorophil; APC – Alofocianina.

5 - Resultados

5.1 Cinética de recrutamento de células

Para avaliação da cinética de recrutamento celular, quinze camundongos fêmeas de cada linhagem (C57BL/6, IL-17^{-/-} e IL-22^{-/-}) foram inoculados intraperitonealmente com BCG e nos devidos pontos experimentais, o lavado peritoneal foi obtido e analisado em microscópio de luz após preparação por citospin. Com base na contagem diferencial das células do lavado peritoneal foi estabelecida a cinética de recrutamento celular induzido pela inoculação com BCG.

Os camundongos do grupo inoculado apenas com salina, apresentaram a população de células peritoneais composta principalmente por macrófagos residentes, e alguns linfócitos. Neutrófilos, basófilos e eosinófilos, estavam ausentes visto que são células que comumente não habitam essa cavidade (GHOSN, 2009). A infecção com BCG em camundongos C57BL/6 por via intraperitoneal induziu a migração de macrófagos (24 – 120 horas $p < 0,0001$; 168 horas $p < 0,05$), seguido de neutrófilos (24 – 120 horas $p < 0,0001$) que se mantiveram constantes até o quinto dia, onde ocorreu diminuição significativa dessas células. Fenômeno contrário ocorreu com os linfócitos (120-168 horas $p < 0,05$), que inicialmente foram pouco recrutados, e no quinto dia seu número cresceu. No final da cinética, a maioria das células eram macrófagos, seguidos por linfócitos. Basófilos e eosinófilos apesar de presentes não sofreram alteração no número de células durante os pontos experimentais estudados (Figura 4C, 6, 7 e 8). A estatística foi realizada comparando cada ponto experimental, de cada tipo celular, com o respectivo ponto controle 0 horas (antes da inoculação).

Nos animais IL-17^{-/-}, os macrófagos (24-168 horas $p < 0,0001$) se mantiveram como a maioria das células recrutadas para a cavidade peritoneal, similarmente aos camundongos C57BL/6. Os neutrófilos (24–72 horas $P < 0,0001$) apresentaram recrutamento similar ao camundongo C57BL/6 até o terceiro dia após inoculação, onde a quantidade de células recrutadas começa a decair e se torna mínima no quinto dia após a inoculação. Os linfócitos (120-168 horas $P < 0,0001$) tem seu recrutamento aumentado a partir do terceiro dia, atingindo níveis altos no quinto dia após a inoculação (Figura 4B, 6, 7 e 8).

Nos animais IL-22^{-/-}, o recrutamento de macrófagos (48-168 horas $p < 0,0001$) e neutrófilos foram similares 24 horas após a inoculação ($p < 0,001$), no entanto, 48 horas

após a inoculação ocorreu uma diminuição do número de neutrófilos (48-120 horas $P < 0,0001$). O número de linfócitos (120 horas $p < 0,05$; 168 horas $p < 0,0001$) passou a ser maior do que os de neutrófilos, cinco dias após a vacinação. Os macrófagos, no entanto, foram as células predominantes após a vacinação com BCG (Figura 4A, 6, 7 e 8).

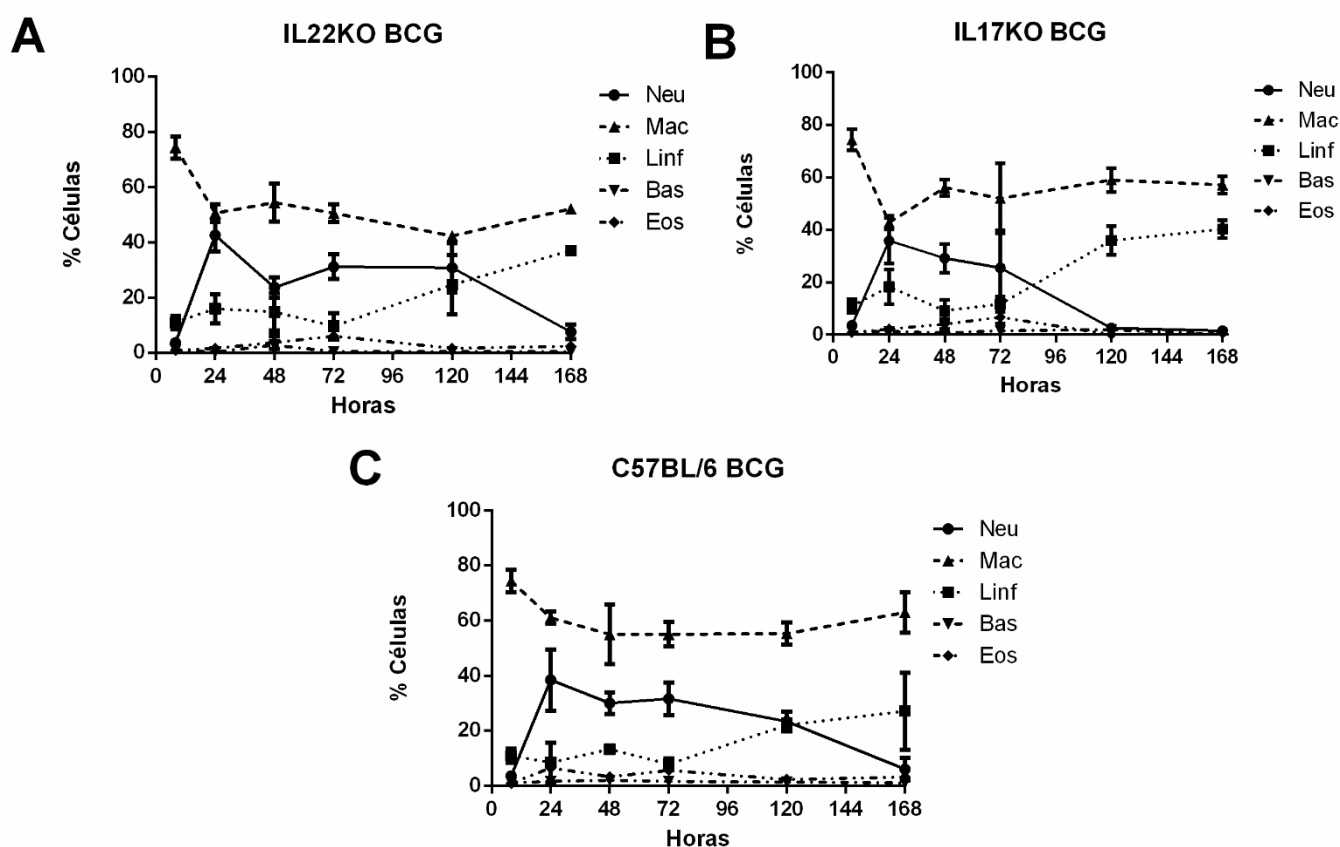


Figura 4. Cinética de recrutamento de células para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG. Camundongos Knock-out para IL-22 ou IL-17 ou C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com 10^6 CFU de BCG Moreau. O lavado peritoneal foi colhido em 24, 48, 72, 120 e 168 horas após a inoculação. As células presentes no lavado foram quantificadas em microscópio de luz após preparação por citospin. Neu – neutrófilos, Mac – macrófagos, Linf – linfócitos, Bas – basófilos, Eos – eosinófilos, A- recrutamento nos animais IL-22^{-/-}, B – recrutamento nos animais IL-17^{-/-}, C – recrutamento nos animais C57BL/6. Estatística avaliada entre pontos experimentais e ponto controle 0 horas ($p < 0,05$).

Quando comparamos as linhagens *Knock out* com a linhagem selvagem C57BL/6, podemos observar diminuição no recrutamento de macrófagos nas duas linhagens, 24 horas após a inoculação (IL-22^{-/-} p=0,0116; IL-17^{-/-} p<0,0001). Os animais IL-22^{-/-} também apresentaram recrutamento diminuído 120 horas (p=0,0116) e 168 horas (p=0,0116) após a inoculação (Figura 5A e 6).

No recrutamento de neutrófilos, a linhagem IL-22^{-/-} não apresenta diferença estatística em nenhum ponto experimental em relação aos camundongos C57BL/6. No entanto, os animais IL-17^{-/-} apresentaram diminuição do recrutamento dos neutrófilos a partir de 72 horas após a inoculação, apresentando diferença estatística em 120 horas (p<0,05) após a inoculação (Figura 5B e 7).

Os linfócitos apresentaram aumento no seu recrutamento apenas a partir de 72 horas em todas as linhagens. Quando esta migração celular foi comparada à ocorrida nos camundongos C57BL/6, os animais IL-22^{-/-} apresentaram maior recrutamento no 5º e 6º dias (120 e 168 horas) após a inoculação (p = 0,0064). Os animais IL-17^{-/-} apresentaram recrutamento de linfócitos semelhante ao animais C57BL/6 durante toda a cinética (Figura 5C e 8). Basófilos e eosinófilos não apresentaram diferença no recrutamento.

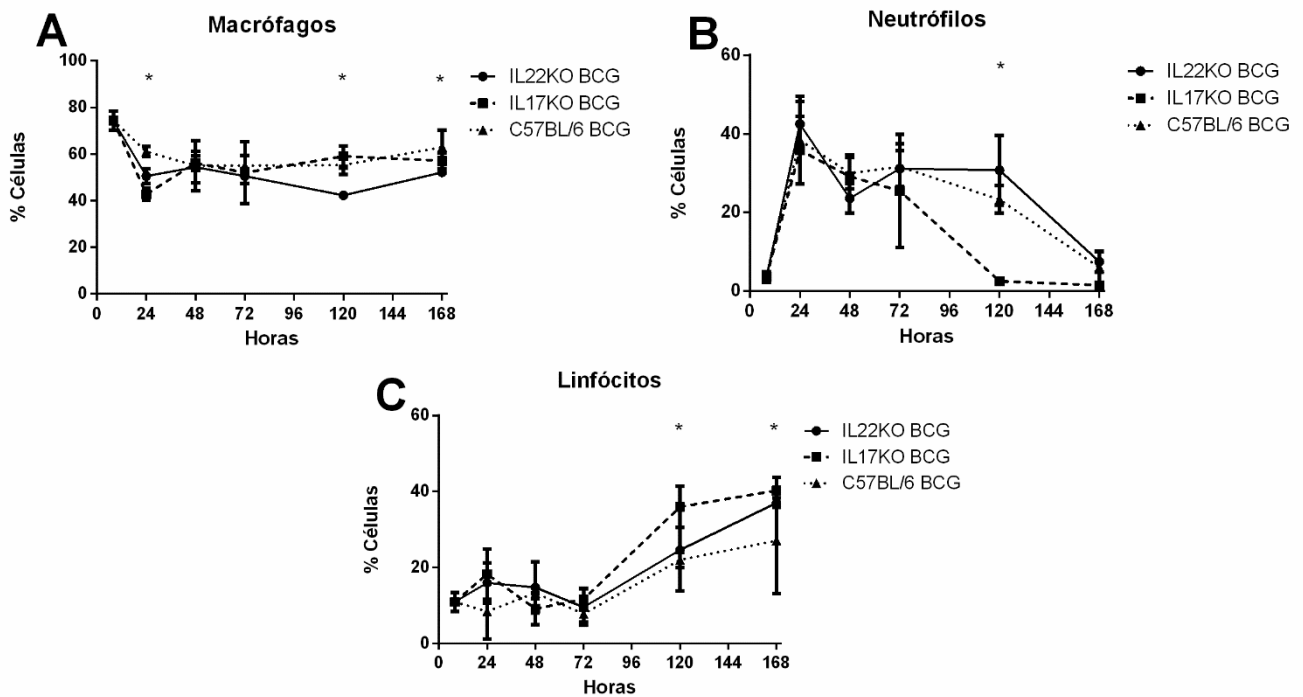


Figura 5. Comparação do recrutamento de tipos celulares para a cavidade peritoneal de animais IL-22^{-/-}, IL-17^{-/-} e C57BL/6 após inoculação com BCG. Camundongos Knock-out para IL-22 ou IL-17 ou C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com 10⁶ CFU de BCG Moreau. O lavado peritoneal foi colhido em 24, 48, 72, 120 e 168 horas após a inoculação. As células presentes no lavado foram quantificadas em microscópio de luz após preparação por citospin. Estatística avaliada entre linhagens *Knock out* e C57BL/6 em cada pontos experimental. A- recrutamento de macrófagos. B – recrutamento de neutrófilos; C – recrutamento de linfócitos; * - p<0,05.

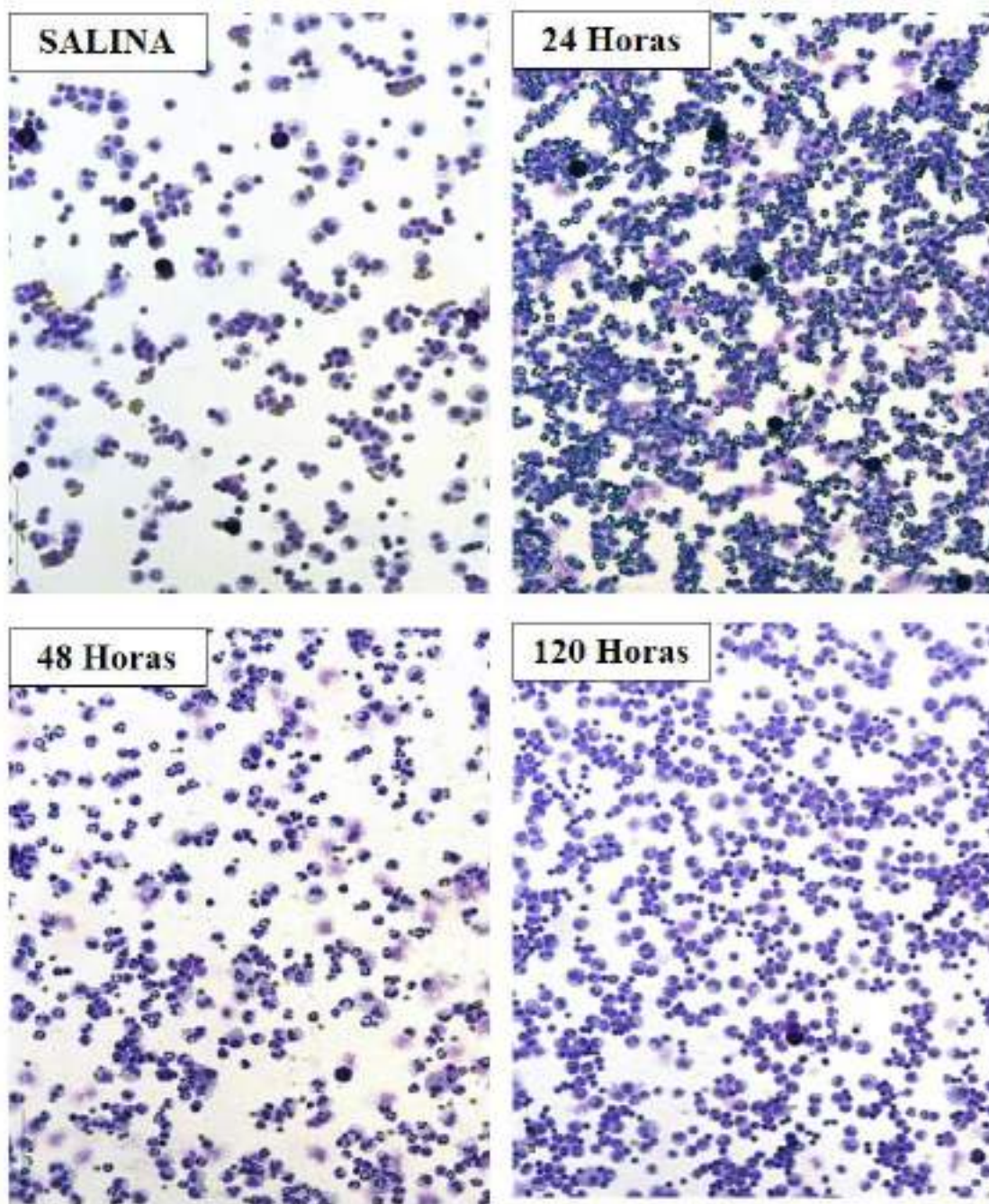


Figura 6. Fotomicrografia de preparado de citospin das células de camundongos C57BL/6 recrutadas para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com 10^6 CFU de BCG Moreau. O lavado peritoneal foi colhido em 24, 48, 72, 120 e 168 horas após a inoculação. As células presentes no lavado foram quantificadas em microscópio de luz após preparação por citospin. Coloração HE Instant Prov, aumento 40X.

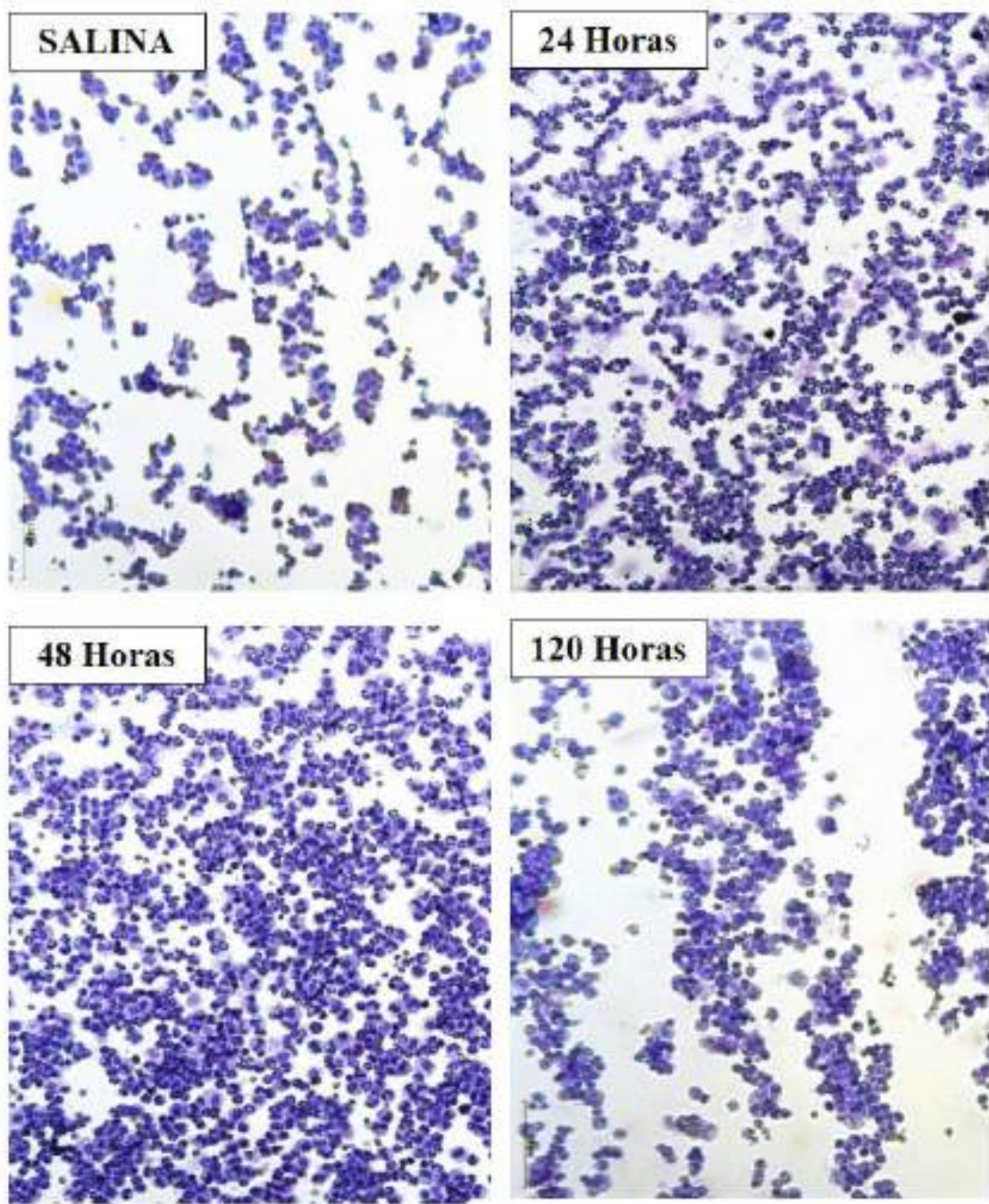


Figura 7. Fotomicrografia de preparado de citospin das células de camundongos IL-22^{-/-} recrutadas para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com 10⁶ CFU de BCG Moreau. O lavado peritoneal foi colhido em 24, 48, 72, 120 e 168 horas após a inoculação. As células presentes no lavado foram quantificadas em microscópio de luz após preparação por citospin. Coloração HE Instant Prov, aumento 40X.

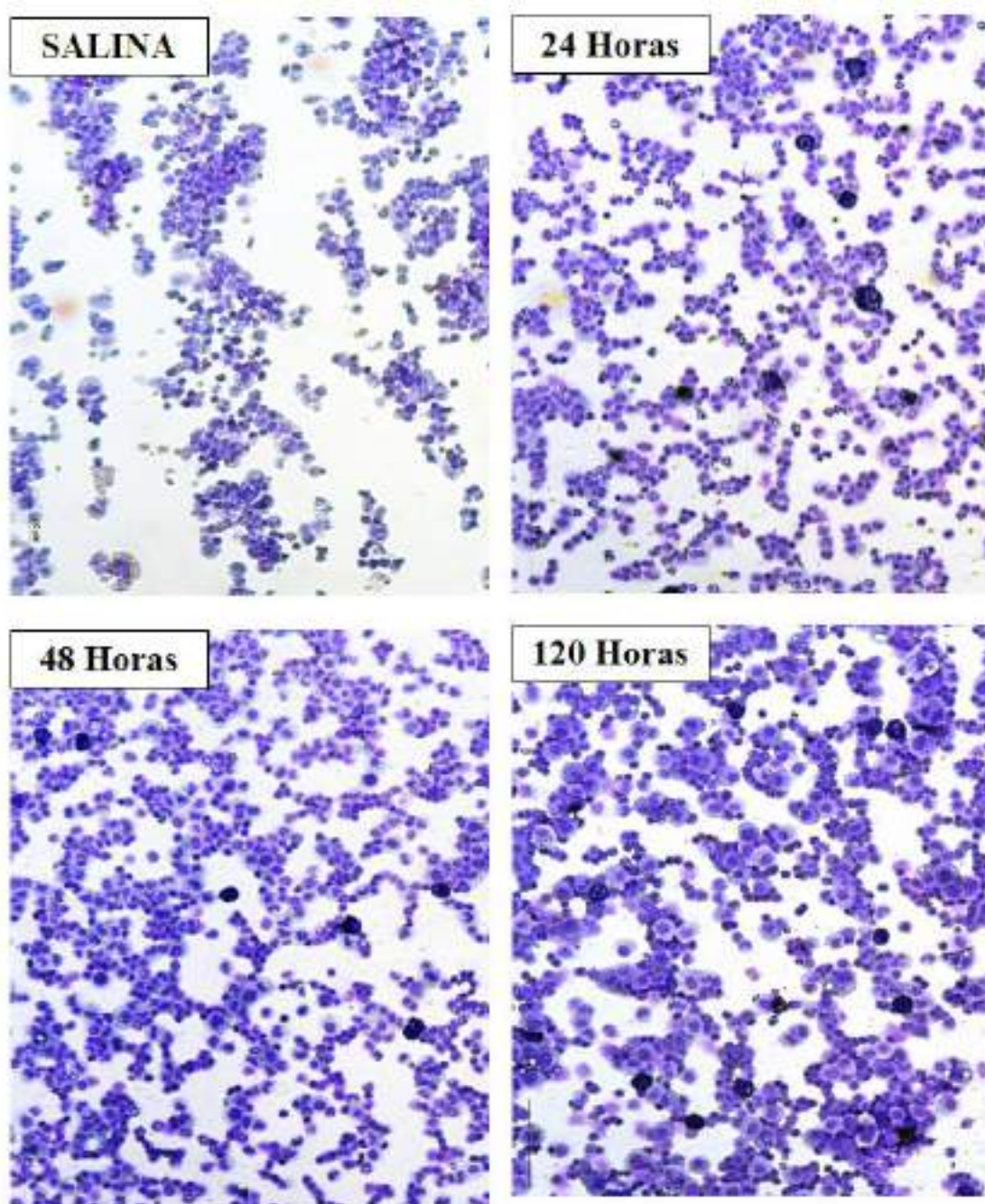


Figura 8. Fotomicrografia de preparado de citospin das células de camundongos IL-17^{-/-} recrutadas para a cavidade peritoneal após inoculação com BCG. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com 10⁶ CFU de BCG Moreau. O lavado peritoneal foi colhido em 24, 48, 72, 120 e 168 horas após a inoculação. As células presentes no lavado foram quantificadas em microscópio de luz após preparação por citospin. Coloração HE Instant Prov, aumento 40X.

5.2 Análise fenotípica dos macrófagos recrutados.

Os pontos experimentais que apresentaram as principais diferenças no recrutamento celular foram utilizados para avaliar o fenótipo das células presentes e de sua ativação por meio de citometria de fluxo.

Para a avaliação dos macrófagos considerou-se as células positivas para F4/80 com tamanho e granulosidade compatíveis com células mononucleares granulosas (Figura 9). Essas células foram então avaliadas quanto a presença da molécula CD11b e a expressão de MHC de classe II.

A porcentagem de células F4/80 positivas que migraram para a cavidade peritoneal dos camundongos foi semelhante entre as três linhagens avaliadas (C57BL/6, IL-17^{-/-} e IL-22^{-/-}), tanto ao 2º quanto ao 5º dia após a inoculação de BCG (Figura 10A). Quando essas populações foram analisadas quanto a presença de CD11b, foi possível observar duas subpopulações de macrófagos, uma pequena subpopulação (10-20%) de células F4/80⁺CD11b⁻, e uma subpopulação maior (80-90%) de células F4/80⁺CD11b⁺, porém essas populações não foram diferentes entre as três linhagens de camundongos (Figura 10B).

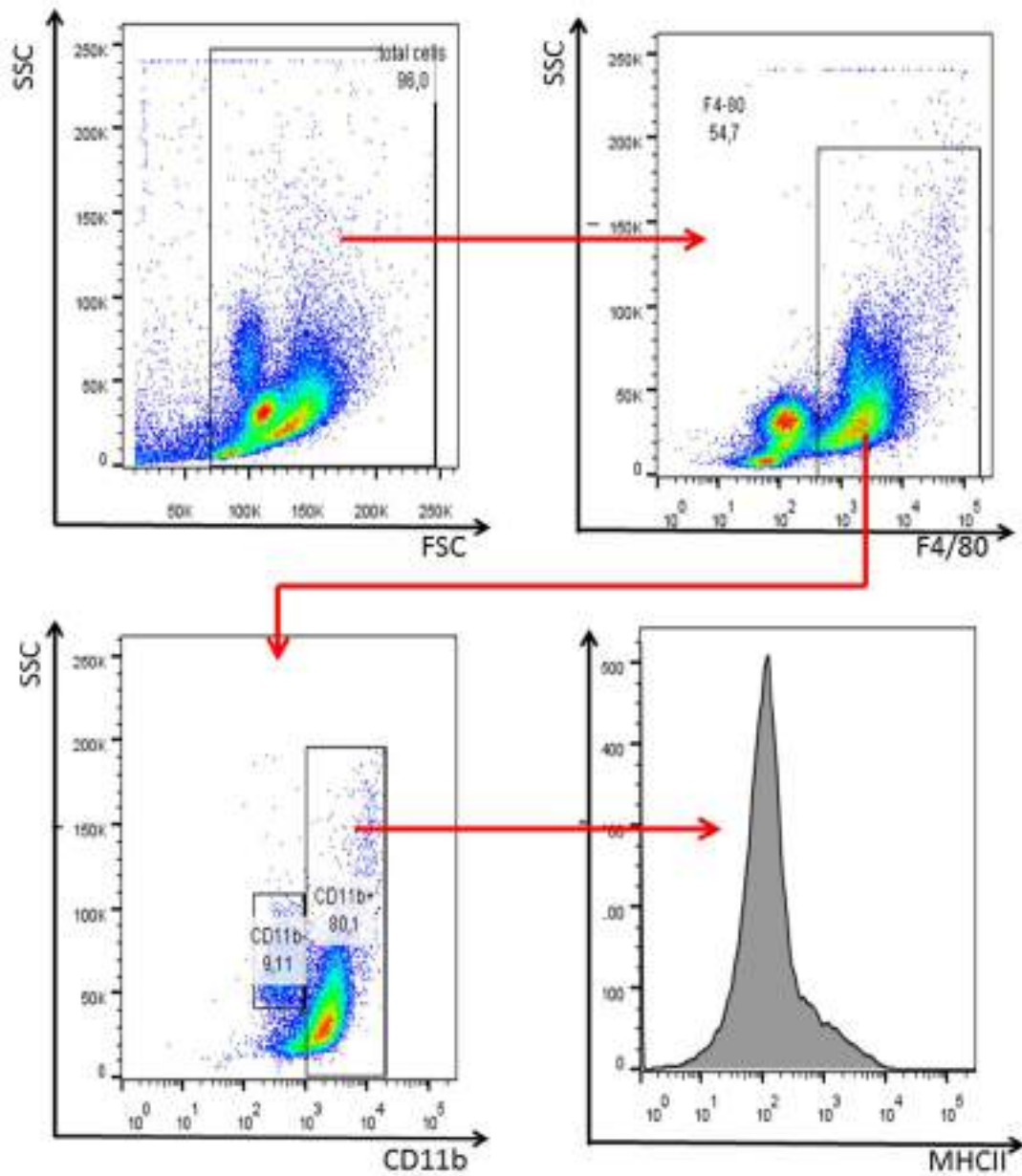


Figura 9. Exemplo de *Dot Plot* e histograma representando a seleção de macrófagos ($F4/80^+$) do lavado peritoneal após inoculação com BCG, e a presença de CD11b e MHC de classe II. SSC – *Side Scatter* (dispersão lateral), FSC – *Forward Scatter* (dispersão frontal)

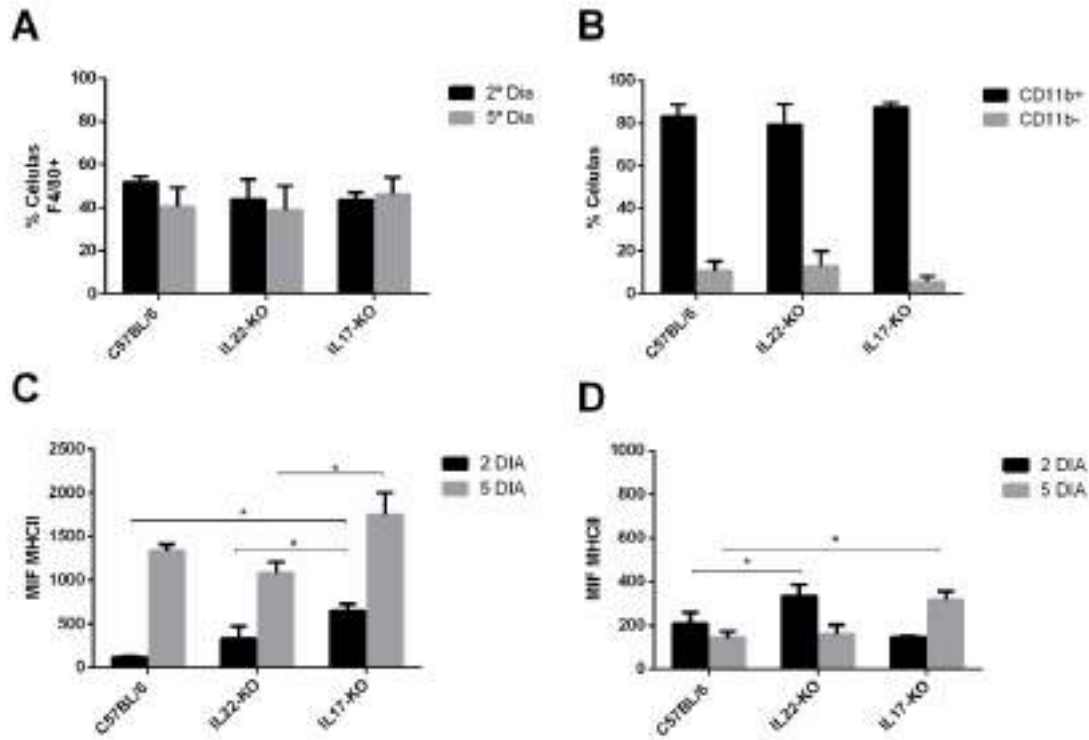


Figura 10. Porcentagem de macrófagos (F4/80⁺) no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17^{-/-} e IL-22^{-/-}) no 2º e 5º dia após inoculação intraperitoneal de BCG. A – Células F4/80⁺; B – presença de CD11b nas células F4/80⁺; C – Média da intensidade de fluorescência de MHC-II na população CD11b⁺; D – Média da intensidade de fluorescência de MHC-II na população CD11b⁻. * (p<0,05).

Cada uma dessas subpopulações foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de MHC de classe II utilizando a média da intensidade de fluorescência. A população de macrófagos CD11b⁺ dos camundongos IL-17^{-/-} apresentou no segundo dia após a inoculação de BCG, uma maior expressão de moléculas de MHC-II quando comparada a mesma população nas demais linhagens, esse fenômeno se manteve até o quinto dia, onde as quantidades de MHC-II aumentaram nos macrófagos CD11b⁺ de todas as linhagens. No entanto, nos camundongos IL-17^{-/-}, os macrófagos F4/80 CD11b⁺ expressaram mais moléculas de MHC-II que os macrófagos das linhagens IL-22^{-/-} e C57BL/6 (Figura 10C).

A população de macrófagos CD11b⁻ apresentou níveis inferiores de MHC-II, que não se alteraram nos dias avaliados (segundo e quinto dias após a inoculação de BCG). A comparação entre as linhagens, no entanto, permitiu mostrar que no segundo dia, houve um aumento discreto de expressão de MHC-II nos macrófagos CD11b⁻ dos camundongos

IL-22^{-/-}, enquanto que os macrófagos CD11b⁻ dos camundongos IL-17^{-/-} aumentaram a expressão de MHC-II no quinto dia após a inoculação de BCG (Figura 10D).

5.3 Análise fenotípica dos neutrófilos recrutados.

Os neutrófilos foram selecionados de acordo com o tamanho e granulosidade compatíveis com granulócitos e a presença de Gr1. Cerca de 30-35% das células do peritônio dos camundongos C57BL/6 eram positivas para Gr1. Essa população foi avaliada quanto a expressão da molécula CD11b utilizando a média da intensidade de fluorescência (Figura 11).

No segundo dia após a inoculação de BCG pode ser observado uma maior quantidade de células Gr1 positivas no peritônio dos camundongos *Knock out* quando comparados aos camundongos C57BL/6, sendo que os camundongos IL-17^{-/-} apresentaram a maior porcentagem dessas células (Figura 12A).

No quinto dia após a inoculação, ocorre um aumento na quantidade de células Gr1⁺ nos camundongos C57BL/6, enquanto que nos camundongos IL-22^{-/-} estas células aumentaram discretamente não sendo, no entanto, diferente da quantidade de células Gr1 dos camundongos C57BL/6. A porcentagem de neutrófilos dos camundongos IL-17^{-/-} reduziu drasticamente no quinto dia após a inoculação de BCG (Figura 12B).

Interessantemente, quando foi avaliada a quantidade da molécula CD11b nessas populações, os camundongos IL-17^{-/-} apresentaram altos níveis de CD11b nas poucas células que existiam na cavidade peritoneal no quinto dia após a inoculação, enquanto que os neutrófilos das demais linhagens não apresentaram diferença estatística na expressão de CD11b entre si e em ambos os dias avaliados.

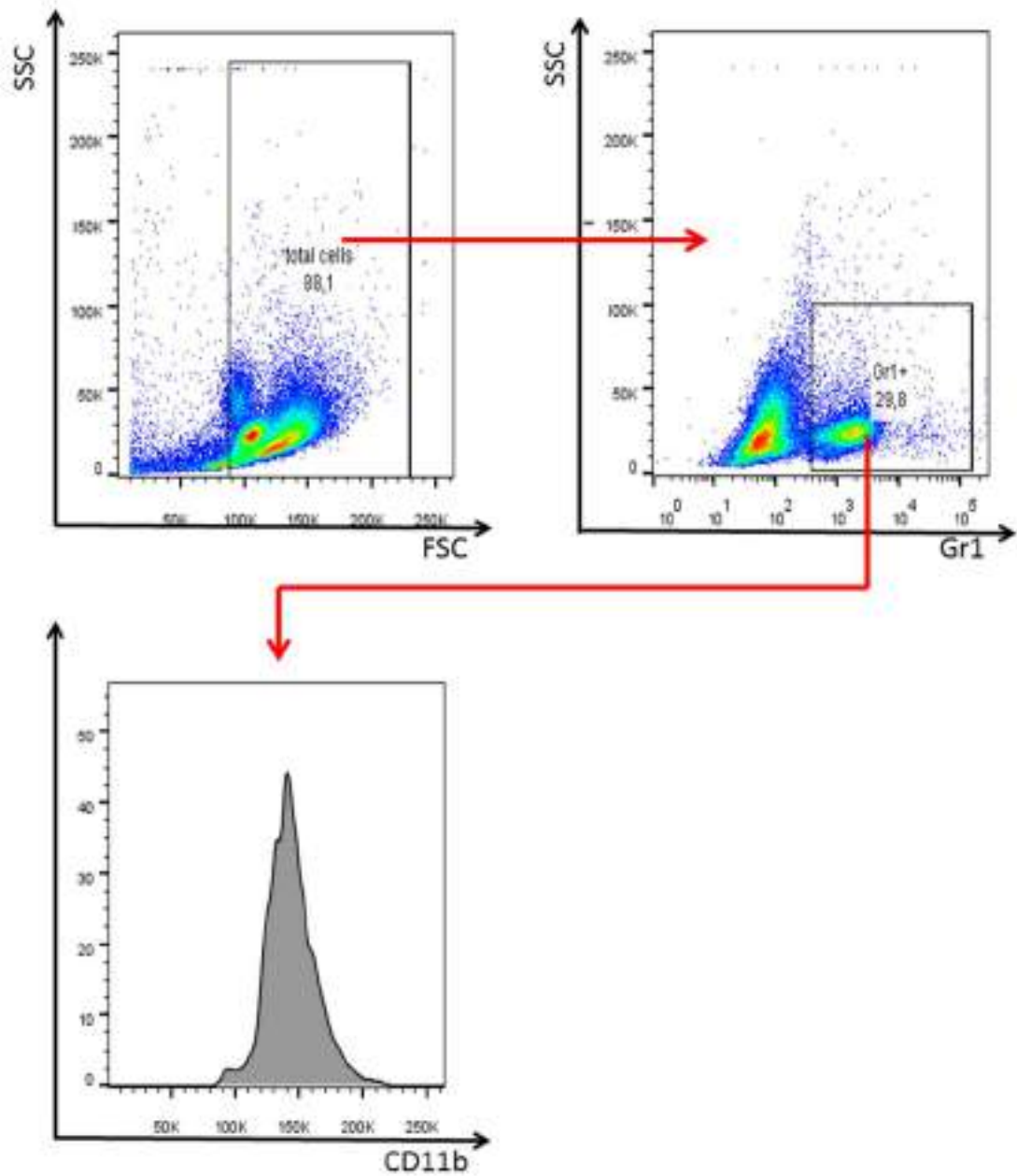


Figura 11. Exemplo de *Dot Plot* e histograma representando a seleção de neutrófilos (Gr1⁺) do lavado peritoneal após inoculação com BCG, e a quantidade de CD11b. SSC – *Side Scatter* (dispersão latera), FSC – *Foward Scatter* (dispersão frontal)

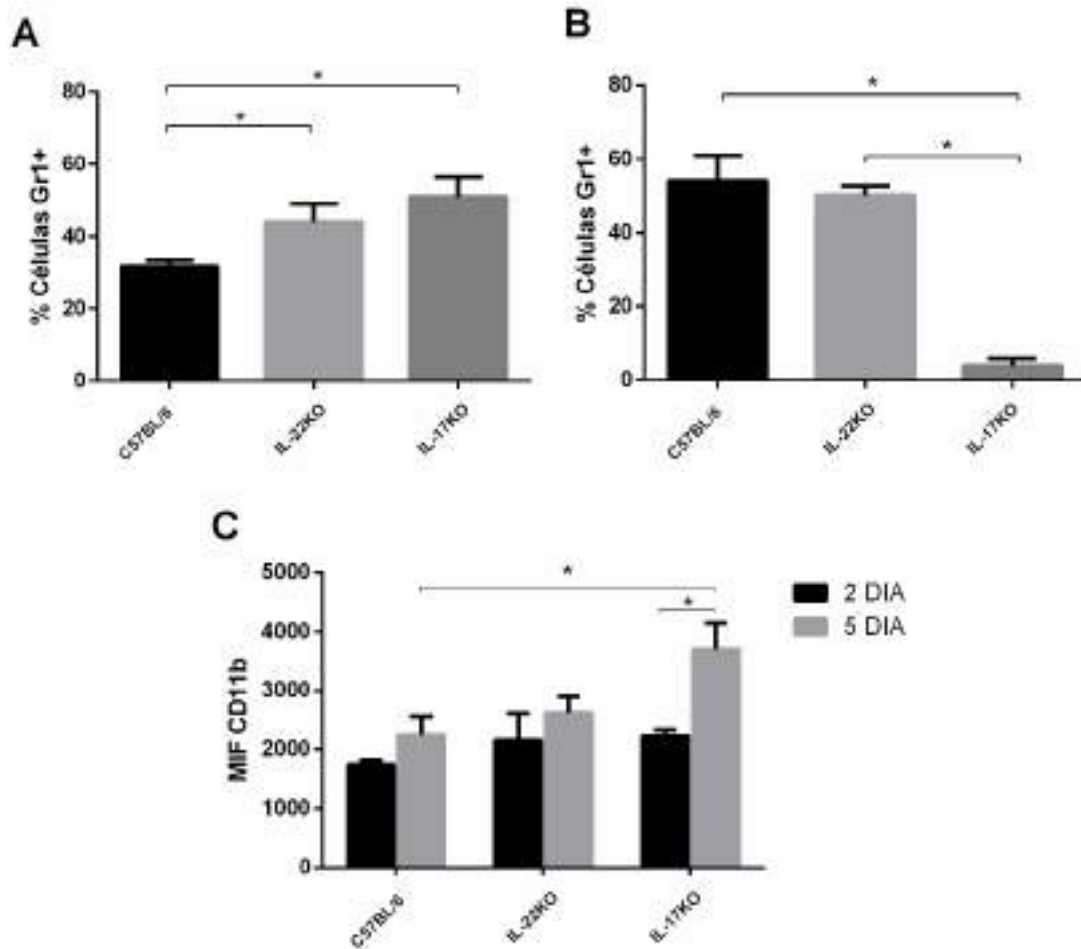


Figura 12. Porcentagem de neutrófilos (Gr1⁺) no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17^{-/-} e IL-22^{-/-}) no 2º e 5º dia após inoculação intraperitoneal de BCG. A – Porcentagem de células Gr1⁺ dois dias após inoculação; B – Porcentagem de células Gr1⁺ cinco dias após inoculação; C – Média da intensidade de fluorescência de CD11b na população Gr1⁺. * (p<0,05).

5.4 Análise fenotípica dos linfócitos recrutados.

A cinética da migração celular mostrou um aumento de linfócitos no quinto dia após a inoculação de BCG. Por se tratar de uma provável migração de células da resposta imune inata, decidiu-se avaliar a porcentagem de células NK e NKT que migraram para o peritônio e a sua ativação. Após definição da população celular de acordo com tamanho e granulidade de células mononucleares não granulares (linfócitos), estas células foram avaliadas quanto a positividade para CD3 e NK1.1. Os linfócitos T foram considerados CD3⁺NK1.1⁻, as células NKT: CD3⁺NK1.1⁺ e as células NK: CD3⁻NK1.1⁺. As células NK foram então avaliadas quanto a expressão da molécula CD11b utilizando a média da intensidade de fluorescência (Figura 13).

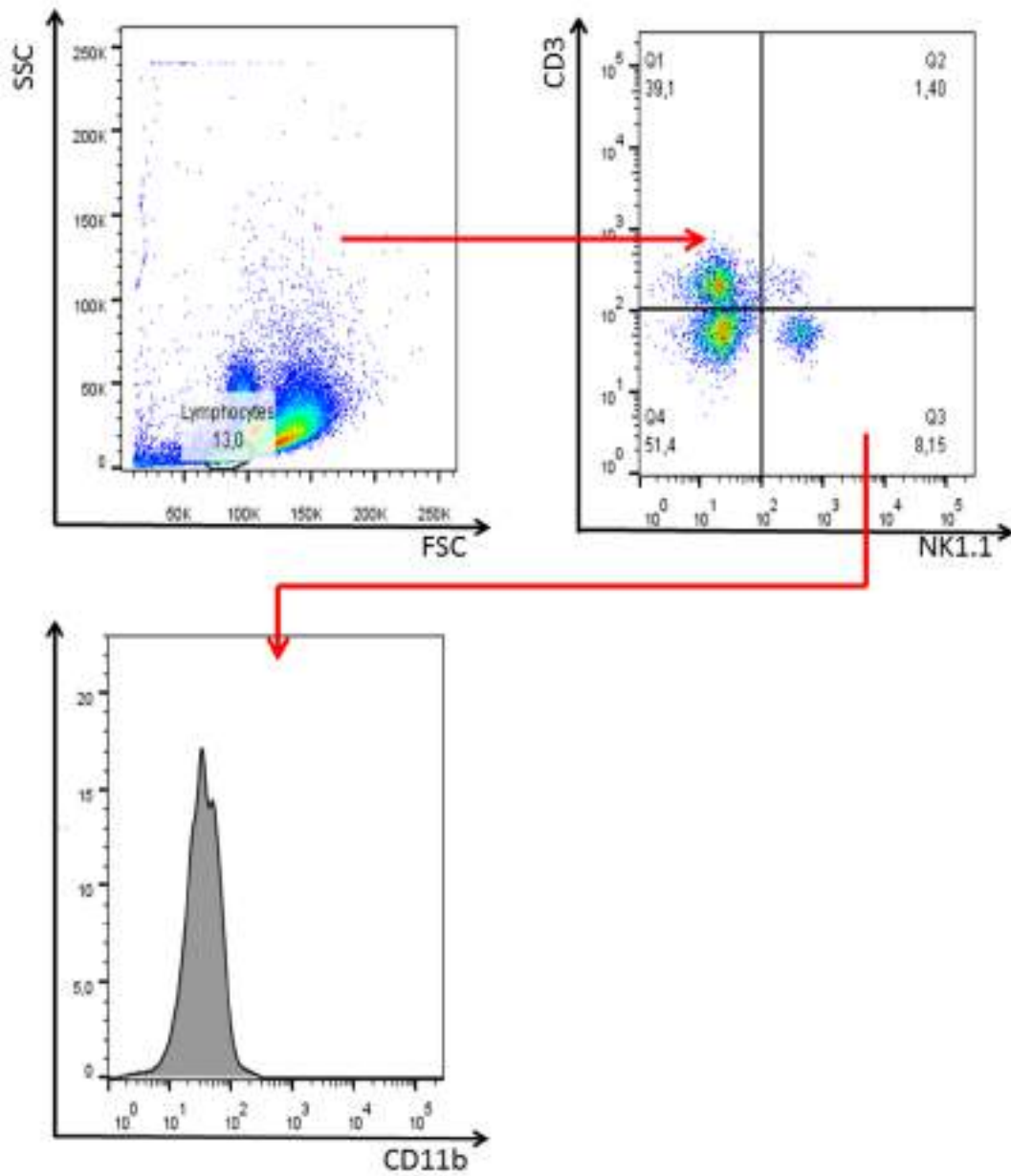


Figura 13. Exemplo de *Dot Plot* e histograma representando a seleção de células NK (NK1.1⁺CD3⁻) do lavado peritoneal após inoculação com BCG, e a presença de CD11b. SSC – *Side Scatter* (dispersão lateral), FSC – *Foward Scatter* (dispersão frontal).

Em ambos os dias avaliados, os camundongos C57BL/6 apresentaram maior porcentagem de células NK: CD3⁻NK1.1⁺ no peritônio do que os demais animais inoculados com BCG. Os camundongos IL-22^{-/-} apresentaram uma porcentagem superior de células NK quando comparados às células dos camundongos IL-17^{-/-}, principalmente no quinto dia após inoculação de BCG (Figura 14A).

Quanto a ativação das células NK que migraram para o peritônio frente ao estímulo com BCG, apenas no segundo dia após a inoculação, as células NK dos camundongos IL-17^{-/-} apresentaram grande quantidade da molécula CD11b (Figura 14B).

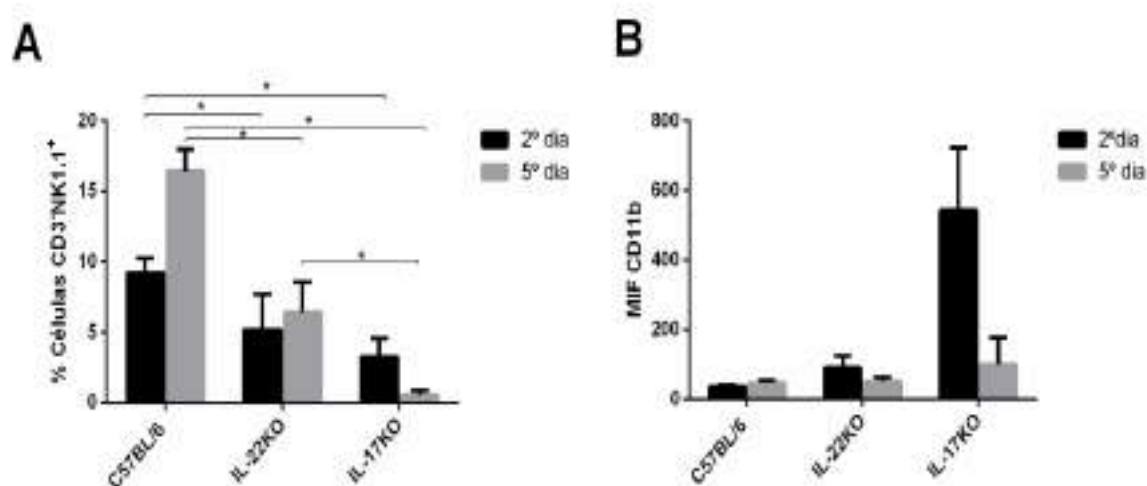


Figura 14. Porcentagem de Células NK no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17^{-/-} e IL-22^{-/-}). A – Porcentagem de células NK1.1⁺CD3⁻ dois e cinco dias após inoculação intraperitoneal de BCG; B – Média da intensidade de fluorescência de CD11b na população NK1.1⁺CD3⁻. * (p<0,05).

Quando avaliados os linfócitos T, percebe-se que nos camundongos C57BL/6 essas células são recrutadas independente do ponto experimental, já as linhagens *Knock out* apresentaram quantidades semelhantes dessas células apenas no quinto dia após a inoculação (Figura 15A). Quanto às células NKT, os animais IL-22^{-/-} e os IL-17^{-/-} não apresentaram diferença nas quantidades de células recrutadas quando comparados entre si ou com os animais selvagens (Figura 15B).

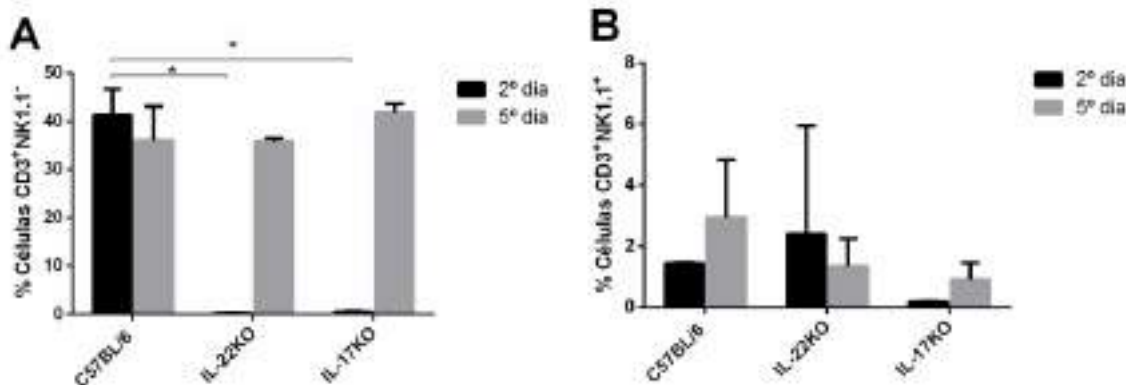


Figura 15. Porcentagem de Células CD3⁺ no lavado peritoneal de camundongos (C57BL/6, IL-17^{-/-} e IL-22^{-/-}). A – Porcentagem de células CD3⁺ NK1.1⁻ dois e cinco dias após inoculação intraperitoneal de BCG; B – Porcentagem de células CD3⁺ NK1.1⁺ dois e cinco dias após inoculação intraperitoneal de BCG. * (p<0,05).

Estes dados demonstram que a inoculação de BCG intraperitonealmente induz migração de linfócitos (Figura 5C) em todas as linhagens estudadas. Destes linfócitos totais, nas três linhagens de animais, aproximadamente 40% são linfócitos T (CD3⁺) e 2-3% são células NKT (CD3⁺ NK1.1⁺). As células NK (CD3⁻ NK1.1⁺), que foram menos recrutadas nas linhagens *Knock out*, somam 8% nos animais IL-22^{-/-}, 2% nos animais IL-17^{-/-} e 15% nos animais C57BL/6 (Figura 16).

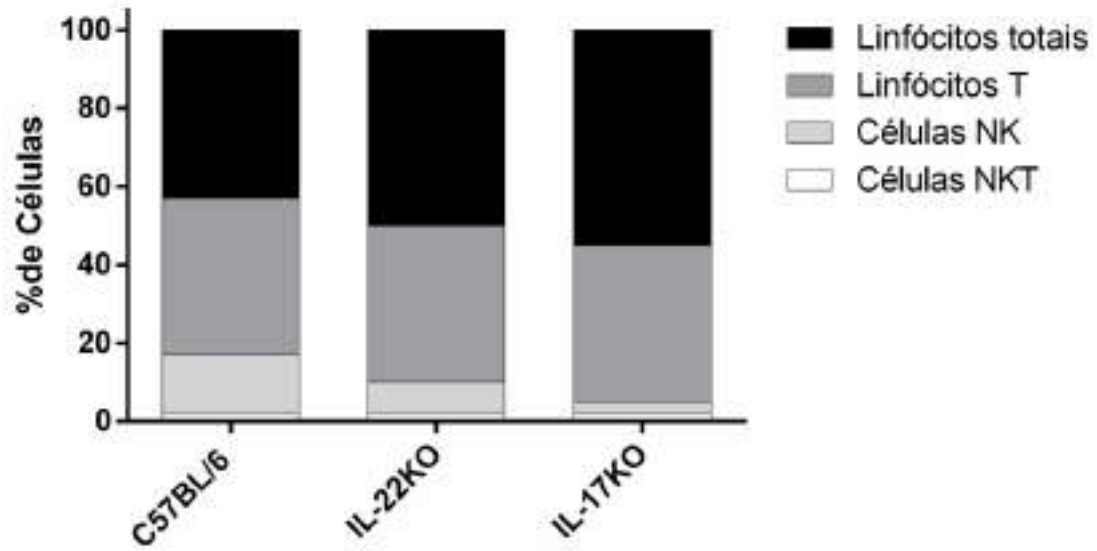


Figura 16. Porcentagem das diversas populações de linfócitos recrutadas para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6, IL-17^{-/-} e IL-22^{-/-}) em relação aos linfócitos totais, após inoculação com BCG.

6- Discussão

A Tuberculose é uma das doenças infecciosas de maior morbidade e mortalidade mundial (WHO, 2011). Atualmente, só está disponível uma vacina licenciada para a prevenção dessa doença, o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Já é bem demonstrado que, em termos de resposta imune inata, as citocinas IL-17 e IL-22, tem papel essencial no recrutamento de células como monócitos e neutrófilos, e recentemente foi demonstrado papel da citocina IL-22 na potencialização da ação de macrófagos no combate a infecções por Mtb (DHIMAN, 2009).

A vacinação intraperitoneal com BCG induziu o recrutamento de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o peritônio. Na ausência de IL-17 ocorre uma diminuição no recrutamento de neutrófilos e células NK, porém essas células se encontram mais ativadas, com maior expressão de moléculas de MHC-II e CD11b, sugerindo papel compensatório devido à falta de citocina tão importante. Na ausência de IL-22, as células NK também são menos recrutadas mas não apresentam maior perfil de ativação, possivelmente pela ação da IL-17 sobre essas células.

O peritônio é uma membrana serosa transparente, sendo a de maior tamanho no corpo e que reveste tanto a parede abdominal (peritônio parietal) quanto às vísceras (peritônio visceral). O folheto embrionário mesoderma é o responsável pela formação do peritônio. A cavidade peritoneal está localizada no interior da cavidade abdominal, entre as lâminas parietal e visceral do peritônio. Não tem a função de sustentação de órgãos, no entanto, contém o líquido peritoneal, composto por água, eletrólitos, e outras substâncias do líquido extracelular, que tem como função lubrificar a superfície visceral (MOORE, 2004). A cavidade peritoneal é responsável por alojar grande parte dos órgãos e nela está presente uma gama de células do sistema imune, como linfócitos T, linfócitos B, células NK e células mononucleares como os fagócitos. Essas células, principalmente os fagócitos são enriquecidos facilmente e isolados do compartimento peritoneal. Com isso, estas células vêm sendo utilizadas como instrumento experimental desde o início dos estudos da biologia dos fagócitos (CAILHIER et al., 2005; KAUFMANN & SCHAIBLE, 2005).

No presente estudo, constatamos que a ausência das citocinas IL-17 e IL-22 interferem no recrutamento celular induzido por inoculação de BCG intraperitonealmente. As quantidades de células recrutadas e seus perfis de ativação foram alterados nos camundongos deficientes dessas citocinas em comparação ao camundongo

normal C57BL/6. Os camundongos IL-17^{-/-} apresentaram recrutamento de neutrófilos diminuído no quinto dia após inoculação, porém essas células se encontravam mais ativadas, esse fenômeno se repete com o recrutamento das células NK apenas nos camundongos IL-17^{-/-}. Nos camundongos IL-22^{-/-}, o recrutamento das células NK também se encontra diminuído, porém essas células não se encontram mais ativadas como nos animais IL-17^{-/-}.

Em análise inicial, constatamos diferenças no recrutamento de células para o peritônio dos camundongos entre as linhagens estudadas, quando inoculadas com BCG. Ao analisar as células que migraram para o peritônio constatamos que os macrófagos se mantêm sempre como maioria dentre as células em todas as linhagens, seguidos pelos neutrófilos, que são recrutados em 24 horas após a inoculação como ocorre comumente em uma resposta à inflamação (SCHUSTER, 2013), e apenas no terceiro dia após a inoculação, os linfócitos começam a migrar para o peritônio. Trabalhos mostraram que ao fagocitar e processar a BCG, os macrófagos residentes da cavidade peritoneal dão início ao processo inflamatório, secretando citocinas como IL-1 e TNF- α , que induziram integrinas e selectinas nas células endoteliais promovendo a migração de mais células para a cavidade. Posteriormente, a citocina IL-17, produzida pelos linfócitos Th17, que assumiria o papel de recrutar neutrófilos (ZUMLA, 2014; DORHOI, 2014). Nossos dados corroboram com estes achados uma vez que 168 horas após a inoculação de BCG no peritônio o número de células recrutadas também diminuiu (Figura 4C).

Os macrófagos não apresentaram diferença no seu recrutamento independente da ausência das citocinas e se manteve como a maioria das células recrutadas (Figura 4). Ao analisar a expressão da molécula F4/80, foi confirmado esse achado (Figura 8A). No entanto, essas populações de macrófagos apresentaram expressões diferentes da molécula CD11b (Figura 8B). CD11b é um membro da família das integrinas que atua juntamente com CD18 para formar o heterodímero CR3. Essa molécula regula a adesão e migração de leucócitos, mediando assim a resposta inflamatória (MELO, 2000). Dessa forma, podemos inferir que a população CD11b^{LOW} representa os macrófagos residentes do peritônio, e a população CD11b^{HIGH} representa as células que migraram para a cavidade em resposta à inoculação com BCG. Apesar de ser demonstrado que a citocina IL-17 possui papel no recrutamento de monócitos para sítios de infecção (WERNER, 2011), neste estudo, constatamos que o recrutamento dessas células para a cavidade peritoneal se deu independentemente da ausência tanto de IL-17 quanto de IL-22.

Como esperado, a população de macrófagos residentes apresentou níveis baixos de expressão da molécula de MHC-II (Figura 8D), estando desse modo menos ativados, visto a atuação dessa molécula na apresentação de antígenos (SARAAV, 2014). Já os macrófagos recrutados para a cavidade peritoneal apresentaram maior expressão dessa molécula no quinto dia após a inoculação, especialmente nos camundongos IL-17^{-/-} (Figura 8C). Esses dados contrastam com achados que indicam um papel da IL-17 na formação do perfil de linfócitos Th1 (GOPAL, 2012), que polarizam os macrófagos para um perfil inflamatório rico em moléculas de MHC-II (MIA, 2014). Além disso, já foi mostrado que a citocina IL-17 potencializa o efeito bactericida dos macrófagos, diminuindo a vida da BCG no fagossoma (LING, 2013).

Por outro lado, devido à ausência da citocina IL-17, um aumento na produção da citocina IL-23 pode estar acontecendo na tentativa de formar mais células Th17, visto que essa citocina é fundamental na diferenciação desse perfil de linfócitos T (WERNER, 2011). A citocina IL-23 é formada por duas subunidades, IL12P40 e p19, de modo que apresenta similaridade estrutural com a citocina IL-12 (PARHAM, 2002); e já foi demonstrado que a IL-23 induz a produção de IFN- γ (OTTENHOF, 2005), de modo que este pode ser um mecanismo de compensação que acaba por ativar os macrófagos na ausência de IL-17.

Neutrófilos, apesar de serem as primeiras células recrutadas para locais de inflamação (SCHUSTER, 2013), não são células comuns da cavidade peritoneal (GHOSN, 2009); desse modo, dois dias após inoculação com BCG, os camundongos C57BL/6 apresentavam baixa quantidade de células Gr1⁺ (Figura 10A), em contraste com os camundongos *Knock out* que já apresentavam algumas dessas células, correspondente aos achados de microscopia (Figura 4). Uma possível explicação para a presença dessas células nos camundongos IL-17^{-/-} seria uma ação compensatória da citocina IL-22 que também atua no recrutamento de neutrófilos (EYERICH, 2010). No quinto dia após a infecção houve o aumento esperado no recrutamento dessas células exceto nos camundongos IL-17^{-/-} (Figura 10B), devido à importância dessa citocina no recrutamento de neutrófilos para os sítios inflamatórios.

Apesar do baixo recrutamento de neutrófilos nos camundongos IL-17^{-/-}, essas células se encontram mais ativadas que nos demais camundongos, expressando altos níveis da molécula CD11b (Figura 10C), possivelmente, esse fato se deve ao mesmo

mecanismo de compensação envolvendo as citocinas IL-23 e IFN- γ . Esses dados demonstram a importância da citocina IL-17 na imunidade inata, visto que a ação dos neutrófilos já foi descrita como pertinente nessa resposta, devido a alterações causadas no microambiente por essa célula, além de secreção de mediadores solúveis (MANTOVANI, 2011) e o *cross-talk* com demais tipos celulares como células dendríticas (SCHUSTER, 2013) e células NK (SILVA, 2010).

Apesar de linfócitos serem característicos da resposta imune adaptativa, essas células se diferenciam em diversas populações, e algumas delas tem ação importante na imunidade inata. Dentre as células T recrutadas em ambas as linhagens de camundongos a partir do quinto dia (Figura 13A), podem estar presentes uma pequena população de linfócitos T $\gamma\delta$. Essa é uma população de células T única, cujo TCR pode reconhecer antígenos não peptídicos, como antígenos lipídicos micobacterianos, e não requerem a apresentação via moléculas de MHC clássicas. Estas células são localizadas nos tecidos ricos em epitélio como pele e intestino (BRANDES, 2005). Linfócitos T $\gamma\delta$ são grandes produtores de IL-17 durante as fases iniciais de infecções peritoneais (DUHINDAN, 1997), e isso talvez explique o não recrutamento de linfócitos T nos animais *Knock out* no segundo dia após inoculação (Figura 13A),

As células NK T são uma subpopulação de células T que foram inicialmente caracterizadas como células que co-expressam receptores $\alpha\beta$ TCR e receptores de células NK. Uma característica das células NKT é a sua capacidade de produção de grandes quantidades de citocinas muito rapidamente após a ativação (CHIBA, 2008). As células NKT, podem ativar células da imunidade inata, incluindo células NK, macrófagos, células dendríticas (DC), e células T $\gamma\delta$ (BRIGL, 2004). Apesar de já comprovada a eficácia das células NKT no combate à tuberculose (SADA-OVALE, 2008), a inoculação de BCG intraperitonealmente parece não influenciar no recrutamento dessas células, tão pouco a ausência das citocinas IL-22 e IL-17 influenciaram esse fenômeno (Figura 13B).

Os demais linfócitos recrutados, não avaliados neste estudo (Figura 14), possivelmente são linfócitos B. A cavidade peritoneal é naturalmente habitada por uma população de linfócitos B inatos denominados B1. Essas células são formadas durante o desenvolvimento embrionário no fígado fetal; são grandes produtoras de IL-10 e anticorpos naturais de baixa afinidade (CUNNINGHAM, 2014). A possível presença

dessas células pode ter influenciado o recrutamento das demais populações celulares, devido à produção da citocina anti-inflamatória IL-10. No entanto mais estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

As células NK são células de linhagem linfocítica, porém atuam principalmente na imunidade inata como grandes produtoras de IFN- γ e IL-22 (DHIMAN, 2012); essas células já foram descritas como importantes na resposta imune à patógenos intracelulares como Mtb (JUNQUEIRA-KIPNIS, 2003). Na análise de microscopia, foi constatado que os linfócitos em geral, são recrutados para a cavidade peritoneal a partir do quinto dia (Figura 4), ocorrendo pequenas variações não significativas entre as linhagens de camundongos. Quando analisadas por citometria de fluxo foi observado uma baixa na quantidade dessas células nos camundongos *Knock out*, principalmente nos IL-17^{-/-} (Figura 12A), o que sugere uma atuação dessas citocinas no recrutamento dessas células. Foi demonstrado anteriormente que as células NK atuam de forma importante no combate ao Mtb através da produção de IL-22, que resultará na potencialização da formação do fagolisossomo, controlando a infecção (DHIMAN, 2009).

Assim como observado nos neutrófilos, as poucas células NK recrutadas pelos camundongos IL-17^{-/-} apresentaram níveis altos da molécula CD11b (Figura 12B), se apresentando mais ativadas.

Quanto aos eosinófilos e basófilos, a vacinação com BCG não apresentou aumento significativo no recrutamento dessas células, tanto no camundongo normal, quanto nas linhagens *Knock out*, sendo identificadas em níveis similares em todos os animais. Desse modo, pode-se inferir que essas células independem dessas citocinas para seu recrutamento.

Visto o papel importante dessas citocinas na resposta imune inata e no recrutamento de células para a resposta inicial à inoculação com a vacina BCG, essas células se tornam interessantes alvos para possíveis métodos de melhoramento da vacinação contra a tuberculose.

7- Conclusão

A vacinação intraperitoneal com BCG recruta macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o peritônio. As citocinas IL-17 e IL-22 são importantes para o recrutamento de neutrófilos e células NK, porém na ausência dessas citocinas, essas células se encontram mais ativadas, com maior expressão de moléculas de MHC-II e CD11b embora estejam em número reduzido.

8- Referências

AKIRA S. Toll-like receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**. vol. 278, no. 40, pp. 38105–38108, 2003.

ALEMAN, M., DE LA BARRERA, S.S., SCHIERLOH, P.L., ALVES, L., YOKOBORI, N., BALDINI, M., *et al.* In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. **J Infect Dis** 192: 399–409. 2005.

ALEMAN, M., GARCIA, A., SAAB, M.A., DE LA BARRERA, S.S., FINIAS Z, M., ABBATE, E., AND SASIAIN, M.C. *Mycobacterium tuberculosis*-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. **Am J Respir Cell Mol Biol** 27: 583–592. 2002.

ALEMAN, M., SCHIERLOH, P., DE LA BARRERA, S.S., MUSELLA, R.M., SAAB, M.A., BALDINI, M., *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. **Infect Immun** 72: 5150–5158. 2004.

ALTARE F., DURANDY A., LAMMAS D. *et al.* Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. **Science**. vol. 280, no. 5368, pp. 1432–1435, 1998.

ANDOH, A., Z. ZHANG, O. INATOMI, S. FUJINO, Y. DEGUCHI, Y. ARAKI, T. TSUJIKAWA, K. KITO, S. KIM-MITSUYAMA, A. TAKAYANAGI, *et al.* Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. **Gastroenterology** 129: 969–984. 2005.

ANDRADE M R M, AMARAL E P, RIBEIRO S C M, ALMEIDA F M, PERES T V, LANES V, D'IMPÉRIO-LIMA M R E LASUNSKAIA E B. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC Microbiology**, 12:166. 2012.

APPELBERG, R., CASTRO, A.G., GOMES, S., PEDROSA, J., AND SILVA, M.T.. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. **Infect Immun** 63: 3381–3387. 1995.

ARONSON NE, SANTOSHAM M, COMSTOCK GW, et al. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. **JAMA** 291:2086–20912004.

BAFICA A., SCANGA C. A., FENG C. G., LEIFER C, CHEEVER A, SHER A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Experimental Medicine**. vol. 202, no. 12, pp. 1715–1724, 2005.

BARIN JG, BALDEVIANO GC, TALOR MV, WU L, ONG S, QUADER F, et al. Macrophages participate in IL-17- mediated inflammation. **Eur J Immunol**; 42: 726-36. 2012.

BEHAR SM, DASCHER CC, GRUSBY MJ, WANG CR & BRENNER MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Exp Med** 189: 1973–1980. 1999.

BRANDES M, WILLIMANN K, MOSER B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta **T Cells**. **Science**.;309:264–268. 2005.

BREWER TF, COLDITZ GA. Relationship between bacille Calmette- Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. **Clin Infect Dis**.;20:126-35. 1995.

BRIGL, M., M. B. BRENNER. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annu. Rev. Immunol**. 22: 817-890. 2004.

BROSCH, R. GORDON, SV. et al. Comparative genomics of the mycobacteria. **Int. J. Med. Microbiol**. 290, 143-152. 2000.

BRUBAKER, S.W; BONHAM,K.S; ZANONI,I. KAGAN, J.C. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. **Annu. Rev. Immunol**. 33:10.1–10.34. 2015.

BURGDORF, S;KURTS, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. **Curr. Opin. Immunol**. 20, 89–95. 2008.

CAILHIER JF, PARTOLINA M, VUTHOORI S, WU S, KO K, WATSON S, SAVILL J, HUGHES J, LANG RA. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. **J Immunol** 174:2336–2342. 2005.

CANADAY DH, WILKINSON RJ, LI Q, HARDING CV, SILVER RF, BOOM WH. CD4 and CD8 T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and fas/fas ligand-independent mechanism. **J Immunol**;167:2734–2742. 2001.

CARDONA, P.J., LLATJOS, R., GORDILLO, S., DIAZ, J., OJANGUREN, I., ARIZA, A., AND AUSINA, V. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand J Immunol** 52: 156–163. 2000.

CHIBA A, DASCHER CC, BESRA GS, BRENNER MB. Rapid NKT cell responses are self-terminating during the course of microbial infection. **J Immunol**. Aug 15;181(4):2292-302. PubMed PMID: 18684918. 2008.

COUSINS DV, *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53: 1305-142003.

CRUZ A, FRAGA AG, FOUNTAIN JJ, RANGEL-MORENO J, TORRADO E, *et al.* Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of experimental medicine** 207: 1609–1616. 2010.

CUNHA SS, RODRIGUES LC, DUPPRE NC. Current strategy for leprosy control in Brazil: time to pursue alternative preventive strategies? **Rev Panam Salud Publica**.;16:362-5. 2004.

CUNNINGHAM AF, FLORES-LANGARICA A, BOBAT S, DOMINGUEZ MEDINA CC, COOK CN, ROSS EA, LOPEZ-MACIAS C, HENDERSON IR. B1b cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination. **Front Immunol**. Oct 31;5:535. doi: 10.3389/fimmu.2014.00535. 2014.

Da SILVA CA, HARTL D, LIU W, LEE CG, ELIAS JA. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. **J Immunol**; 181: 4279-86. 2008.

DAVIDS V, HANEKOM WA, MANSOOR N et al. The effect of Bacille Calmette–Guerin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. **J Infect Dis** 193: 531–536. 2006.

DAVILA S., HIBBERD M. L., DASS R. H. et al. Genetic association and expression studies indicate a role of Toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. **PLoS Genetics**. vol. 4, no. 10, Article ID e1000218, 2008.

DE JONG R., ALTARE F., HAAGEN I. A. et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptordeficient patients. **Science**. vol. 280, no. 5368, pp. 1435–1438, 1998.

DELOGU, G., FADDA, G. The quest for a new vaccine against tuberculosis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, North America, 3, feb. 2009.

DERRICK SC, EVERING TH, SAMBANDAMURTHY VK, JALAPATHY KV, HSU T, CHEN B, et al. Characterization of the protective T-cell response generated in CD4-deficient mice by a live attenuated Mycobacterium tuberculosis vaccine. **Immunology**.;120(2):192-206. 2007.

DESVIGNES L, ERNST JD. Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Immunity** 31: 974–985. 2009.

DHIMAN R, INDRAMOHAN M, BARNES PF, NAYAK RC, PAIDIPALLY P, RAO LVJ, VANKAYALAPATI R. IL-22 Produced by Human NK Cells Inhibits Growth of Mycobacterium tuberculosis by Enhancing Phagolysosomal Fusion. **The Journal of Immunology**, 183: 6639–6645. 2009.

DHIMAN R, PERIASAMY S, BARNES PF, JAISWAL AG, PAIDIPALLY P, BARNES AB, TVINNEREIM A, VANKAYALAPATI R. NK1.1+ cells and IL-22 regulate vaccine-induced protective immunity against challenge with Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol.**; 189 (2): 897–905 2012.

DHIMAN R, VENKATASUBRAMANIAN S, PAIDIPALLY P, BARNES PF, TVINNEREIM A, VANKAYALAPATI R. Interleukin 22 Inhibits Intracellular Growth of Mycobacterium tuberculosis by Enhancing Calgranulin A Expression. **Journal of Infectious Diseases**. DOI: 10.1093/infdis/jit4952013.

DORHOI A, KAUFMANN SH. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. **Semin Immunol**. Jun;26(3):203-209. 2014.

DOZ, E; et al. Mycobacteria-Infected Dendritic Cells Attract Neutrophils That Produce IL-10 and Specifically Shut Down Th17 CD4 T Cells through Their IL-10 Receptor. **J Immunol**; 191:3818-3826; 2013.

DRENNAN M. B., NICOLLE D., QUESNIAUX V. J. F. et al. Tolllike receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. **American Journal of Pathology**. vol. 164, no. 1, pp. 49–57, 2004.

DRISS V, HERMANN E, LEGRAND F, LOISEAU S, DELBEKE M, KREMER L, GUERARDEL Y, DOMBROWICZ D, CAPRON M. CR3-dependent negative regulation of human eosinophils by Mycobacterium bovis BCG lipoarabinomannan. **Immunology Letters** 143 202– 207 2012.

DUHINDAN, N., FARLEY A. J., HUMPHREYS S., PARKER C., ROSSITER B., BROOKS C. G. Patterns of lymphokine secretion amongst mouse gamma delta T cell clones. **Eur. J. Immunol**. 27:1704-1712. 1997.

EDDENS T, KOLLS JK. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. **Curr Opin Immunol** 24: 424–430. 2012.

ELIAS D, AKUFFO H, PAWLOWSKI A, HAILE M, SCHON T, et al. Schistosoma mansoni infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent Mycobacterium tuberculosis. **Vaccine** 23: 1326–1334. 2005.

ELIAS D, BRITTON S, ASEFFA A, ENGERS H, AKUFFO H. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF- beta production. **Vaccine** 26: 3897–3902. 2008.

ERB KJ, HOLLOWAY JW, SOBECK A, MOLL H, LE GROS G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen- induced airway eosinophilia. **J Exp Med**; 187:561-9. 1998.

ERUSLANOV, E.B., LYADOVA, I.V., KONDRATIEVA, T.K., MAJOROV, K.B., SCHEGLOV, I.V., ORLOVA, M.O., AND APT, A.S. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. **Infect Immun** 73: 1744–1753. 2005.

ERWIG LP, KLUTH DC, WALSH GM, REES AJ. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J Immunol** 161:1983–1988. 1998.

EYERICH S, EYERICH K, CAVANI A, SCHMIDT-WEBER C. 2010. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. **Trends Immunol.** Sep;31(9):354-61.. Epub Aug 4. 2010.

FADOK, V.A., BRATTON, D.L., KONOWAL, A., FREED, P.W., WESTCOTT, J.Y., AND HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest** 101: 890–898. 1998.

FANG JW, LI JC, AU KY, YIM HC, LAU AS. Interleukin-17A differentially modulates BCG induction of cytokine production in human blood macrophages. **J Leukoc Biol**; 90: 333-41. 2011.

FINE PEM, CARNEIRO IAM, MILSTIEN JB, CLEMENTS CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programs World Health Organization. 1999.

FLETCHER HA. Correlates of immune protection from tuberculosis. **Curr Mol Med** 7: 319–325. 2007.

FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, TRIEBOLD KJ, KOLLER B & BLOOM BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 12013–12017. 1992.

FREIRE-DE-LIMA, C.G., NASCIMENTO, D.O., SOARES, M.B., BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., DE MELLO, G.C., *et al.* Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403: 199–203. 2000.

GEISSMANN F, MANZ MG, JUNG S, SIEWEKE MH, MERAD M *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656–661. 2010.

GHOSH EEB, CASSADO AA, GOVONI GR, FUKUHARA T, YANG Y, MONACK DM, BORTOLUCI KM, ALMEIDA SR, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *European journal of immunology* Vol. 107 no. 6, 2568-2573. 2009.

GOPAL R, LIN Y, OBERMAJER N, SLIGHT S, NUTHALAPATI N, *et al.* IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following Mycobacterium bovis BCG vaccination. *European journal of immunology* 42: 364–373. 2012.

GORAK-STOLINSKA, P. *et al.* Immunogenicity of Danish-SSI 1331 BCG vaccine in the UK: Comparison with Glaxo-Evans 1077 BCG vaccine. *Vaccine* volume 24, Issues 29–30, 17 July, Pages 5726–5733. 2006.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* ;3(1):23-35. 2003.

GOURION B, BERRABAH F, RATET P, STACEY G. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* Dec 24. pii: S1360-1385(14)00297-0. 2014.

GRODE L, SEILER P, BAUMANN S, HESS J, BRINKMANN V, NASSER EDDINE A, *et al.* Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis Bacille Calmette–Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*; 115:2472–9. 2005.

GUIRADO EVELYN & LARRY S. SCHLESINGER & GILLA KAPLAN. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin Immunopathol* 35:563–583 10.1007/s00281-013-0388-2. 2013.

HAMEL K, DOODES P, CAO Y, WANG Y, MARTINSON J, *et al.* Suppression of proteoglycan-induced arthritis by anti-CD20 B Cell depletion therapy is mediated by

reduction in autoantibodies and CD4+ T cell reactivity. **J Immunol** 180: 4994–5003. 2008.

HAN, E.-R., CHOI, I. S., CHOI, H.-G., & KIM, H.-J. Therapeutic effects of mycobacterial secretory proteins against established asthma in BALB/c mice. **Allergy, asthma & immunology research**, 4(4), 214–21. doi:10.4168/aaair.2012.4.4.214. 2012.

HANEKOM, W.A. The Immune Response to BCG Vaccination of Newborns. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1062: 69–78. 2005.

HARDING MG, ZHANG K, CONLY J, KUBES P. Neutrophil Crawling in Capillaries; A Novel Immune Response to *Staphylococcus aureus*. **PLoS Pathog** 10(10): e1004379.10.1371/journal.ppat.1004379. 2014.

HERZ U, GERHOLD K, GRÜBER C, BRAUN A, WAHN U, RENZ H, PAUL K. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. **J Allergy Clin Immunol**;102:867-74. 1998.

HINES, M.E., KREEGER, J.M., AND HERRON, A.J. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. **Lab Anim Sci** 45: 334–351. 1995.

HOKEY DA, GINSBERG A. The current state of tuberculosis vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**; 9:2142 – 2146. 2013.

HOPFENSPIRGER MT, AGRAWAL DK. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice. **J Immunol**;168: 2516-22. 2002.

HSUEH, W., KUHN, C. NEEDLEMAN, P. Relationship of prostaglandin secretion by rabbit alveolar macrophages to phagocytosis and lysosomal enzyme release. **Biochem J** 184: 345–354. 1979.

HUSSEY GD, WATKINS MLV, GODDARD EA et al. Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies. **Immunology** 105: 314–324. 2002.

IKEUCHI, H., KUROIWA T, HIRAMATSU N, KANEKO Y, HIROMURA K, UEKI K, NOJIMA Y.. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. **Arthritis Rheum.** 52: 1037–1046. 2005.

JOVANOVIC DV, DI BATTISTA JA, MARTEL-PELLETIER J, JOLICOEUR FC, HE Y, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **Journal of immunology** 160: 3513–3521. 1998.

JUNQUEIRA-KIPNIS A.P., KIPNIS A., JAMIESON A., JUARRERO M.G., DIEFENBACH A., RAULET D. H., TURNER J., ORME I. M. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. **Journal of Immunology** 171: 6039-45. 2003.

JUNQUEIRA-KIPNIS AP, DE OLIVEIRA FM, TRENTINI MM, TIWARI S, CHEN B, et al. Prime–Boost with Mycobacterium smegmatis Recombinant Vaccine Improves Protection in Mice Infected with Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE** 8(11): e78639. doi:10.1371/journal.pone.00786392013.

KAUFMANN SH, SCHAIBLE UE. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. **Curr Opin Immunol** 17:79–87. 2005.

KAUFMANN SHE. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends Immunol.** 26:660-7. 2005.

KAWAI, K. ET AL. Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. **Cancer Sci.** Volume 104, Issue 1, pages 22–27, 2012.

KE Y, SUN D, JIANG G, KAPLAN HJ, SHAO H. IL-22-induced regulatory CD11b+ APCs. **Trends Immunol.** 26:667-9. 2011.

KELLER, C., HOFFMANN, R., LANG, R., BRANDAU, S., HERMANN, C., AND EHLERS, S. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. **Infect Immun** 74: 4295–4309. 2006.

KINOSHITA, M; UCHIDA, T; SATO, A; NAKASHIMA, M; NAKASHIMA, H; SHONO, S; HABU, Y; MIYAZAKI, H; HIROI, S; SEKI, S. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. **J Hepatol.** Nov;53(5):903-10. 2010.

KLEINNIJENHUIS J, et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **PNAS** vol. 109 17537–17542. 2012.

KOH YI, CHOI IS, KIM WY. BCG infection in allergen-prensensitized rats suppresses T2 immune response and prevents the development of allergic asthmatic reaction. **J Clin Immunol**;21:51-9. 2001.

KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol.** Vol. 13. Iss. 3 pages 159-173. 10.1038/nri3399. 2013.

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol** 27: 485–517. 2009.

KOZAKIEWICZ L, CHEN Y, XU J, WANG Y, DUNUSSI-JOANNOPOULOS K, et al. B Cells Regulate Neutrophilia during Mycobacterium tuberculosis Infection and BCG Vaccination by Modulating the Interleukin-17 Response. **PLoS Pathog** 9(7): e1003472. doi:10.1371/journal.ppat.1003472. 2013.

LADEFOGED A, BUNCH-CHRISTENSEN K, GULD J. Tuberculin sensitivity in guinea-pigs after vaccination with varying doses of BCG of 12 different strains. **Bull World Health Organ.**;53:435-43. 1976.

LING W. L., WANG L. J., PONG J.C.H., LAU A. S. Y., LI J.C. B. A role of IL-17A in modulating intracellular survival of *Mycobacterium bovis* BCG in murine macrophages. John Wiley & Sons Ltd, **Immunology**, 140, 323–334. 2013.

LUND FE, RANDALL TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. **Nature reviews Immunology** 10: 236–247. 2010.

MADDUR MS, MIOSSEC P, KAVERI SV, BAYRY J. Th17 Cells: Biology, Pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. **Am J Pathol**; 181: 8-18. 2012.

MAGLIONE PJ, CHAN J. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. **European journal of immunology** 39: 676–686. 2009.

MANSOOR N, SCRIBA TJ, DE KOCK M, TAMERIS M, ABEL B, et al. HIV-1 infection in infants severely impairs the immune response induced by Bacille Calmette-Guerin vaccine. **J Infect Dis** 199: 982–990. 2009.

MANTOVANI, A., CASSATELLA, M. A., COSTANTINI, C., JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.** **11**, 519–531. 2011.

MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A., LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology** - Vol. 25, Issue 12, pp. 677-686 2004.

MARTINEAU, A.R., NEWTON, S.M., WILKINSON, K.A., KAMPMANN, B., HALL, B.M., NAWROLY, N., et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. **J Clin Invest** 117: 1988–1994. 2007.

MATSUSHITA T, YANABA K, BOUAZIZ JD, FUJIMOTO M, TEDDER TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **The Journal of clinical investigation** 118: 3420–3430. 2008.

MEANS T. K., JONES B. W., SCHROMM A. B. et al. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. **Journal of Immunology**. vol. 166, no. 6, pp. 4074–4082, 2001.

MELO MD, CATCHPOLE IR, HAGGAR G, STOKES RW. Utilization of CD11b knockout mice to characterize the role of complement receptor 3 (CR3, CD11b/CD18) in the growth of Mycobacterium tuberculosis in macrophages. **Cell Immunol** 205:13–23. 2000.

MIA, S., WARNECKE, A., ZHANG, X.-M., MALMSTRÖM, V. AND HARRIS, R. A. An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. **Scandinavian Journal of Immunology**, 79: 305–314. doi: 10.1111/sji.12162 2014.

MOSSEC P, KOLLS JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat Rev Drug Discov** 11: 763–776. 2012.

MURRAY PJ, WYNN TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol** 11:723–737 2011.

NACKERS F, DRAMAIX M, JOHNSON RC, ZINSOU C, ROBERT A, BIURRUN BAKEDANO E, et al. BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer: a case-control study in Benin. **Am J Trop Med Hyg**;75:768–74. 2006.

NETEA MG, VAN CREVEL R. BCG-induced protection: Effects on innate immune memory. **Semin Immunol**. Oct 23;26(6):512-517. 2014.

OHASHI K., BURKART V., FLOH'E S., KOLB H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. **Journal of Immunology**. vol. 164, no. 2, pp. 558–561, 2000.

OTTENHOF, THM; VERNECK, FAW; HOEVE, MA; VAN DER VOSSE, E. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis**; Volume 85, Issues 1-2, Pages 53–64, January–March. 2005.

OTTENHOFF T. H. M., VERRECK F. A. W., LICHTENAUER-KALIGIS E. G. R., HOEVE M. A., SANAL O., VAN DISSEL J. T. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. **Nature Genetics**, vol. 32, no. 1, pp. 97–105, 2002.

PAGÁN, A.J; RAMAKRISHNAN, L. Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. **Cold Spring Harb. Perspect Med**. Nov 6. pii: a018499. 2014.

PARHAM C, CHIRICA M, TIMANS J, VAISBERG E, TRAVIS M, CHEUNG J, PFLANZ S, ZHANG R, SINGH KP, VEGA F, TO W, WAGNER J, O'FARRELL AM, MCCLANAHAN T, ZURAWSKI S, HANNUM C, GORMAN D, RENNICK DM, KASTELEIN RA, DE WAAL MALEFYT R, MOORE KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. **J Immunol**. Jun 1;168(11):5699-708 2002.

PARRA M, DERRICK SC, YANG A, TIAN J, KOLIBAB K, et al. Malaria Infections Do Not Compromise Vaccine-Induced Immunity against Tuberculosis in Mice. **PLoS ONE** 6(12): e28164. doi:10.1371/journal.pone.0028164 2011.

PITHIE AD, LAMMAS DA, FAZAL N, RAHELU M, BARTLETT R, GASTON JS, KUMARARATNE DS. CD41 cytolytic T cells can destroy autologous and MHC-matched macrophages but fail to kill intracellular *Mycobacterium bovis*-BCG. **FEMS Immunol Med Microbiol**;11:145–154. 1995.

POMPEI L., JANG S., ZAMLYNNY B. ET AL. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. **Journal of Immunology**. vol. 178, no. 8, pp. 5192–5199, 2007.

RAJA A.. Immunology of Tuberculosis. **Indian J. Med. Res.** 120: 213-223. 2004

REILING N., H'OLSCHER C., FEHRENBACH A. et al. Cutting edge: toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**. vol. 169, no. 7, pp. 3480–3484, 2002.

RIBEIRO-GOMES, F.L., OTERO, A.C., GOMES, N.A., MONIZ-DE- SOUZA, M.C., CYSNE-FINKELSTEIN, L., ARNHOLDT, A.C., et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol** 172: 4454–4462. 2004.

RITZ N, et al. Non-specific effect of Bacille Calmette-Guérin vaccine on routine immunisations. **Vaccine** 4454–4462. 2013.

RITZ, N; DUTTA B, DONATH S, CASALAZ D, CONNELL TG, TEBRUEGGE M, ROBINS-BROWNE R, HANEKOM WA, BRITTON WJ, CURTIS N. The Influence of Bacille Calmette-Guérin Vaccine Strain on the Immune Response against Tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med** Vol 185, Iss. 2, pp 213–222. 2011.

RITZ, N; HANEKOM WA, ROBINS-BROWNE R, BRITTON WJ, CURTIS N. Influence of BCG vaccine strain on the immuneresponse and protection against tuberculosis. **FEMS Microbiol Rev** 32 821–841 2007.

SADA-OVALLE I, CHIBA A, GONZALES A, BRENNER MB, BEHAR SM. Innate Invariant NKT Cells Recognize *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages,

Produce Interferon- γ , and Kill Intracellular Bacteria. **PLoS Pathog** 4(12): e1000239. doi: 10.1371/journal.ppat.1000239. 2008.

SARAAV, I; SINGH, S; SHARMA, S. Outcome of Mycobacterium tuberculosis and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion?. **Immunology and Cell Biology**, 2014.

SCHUSTER S., HURRELL B., TACCHINI-COTTIER F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. **J Leukoc Biol** 94:671-675 2013.

SCRIBA TJ. et al. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4₊ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti- Mycobacterial Immune Response. **J Immunol** 180:1962-1970. 2008.

SILVA, BDSS; TRENTINI, MM; DA COSTA, AC; JUNQUEIRA-KIPNIS, AP; KIPNIS, A. Different phenotypes of CD8⁺ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. **Immunology Letters** 160 23–32 2014.

SILVA, M. T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. **J. Leukoc. Biol.** **87**, 805–813. 2010.

SOARES, A.P. Longitudinal Changes in CD4⁺ T-Cell Memory Responses Induced by BCG Vaccination of Newborns. **JD** 2013:207 2012.

SOLOVJOV D.A., PLUSKOTA E., PLOW EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alpha₅beta₂. **J. Biol. Chem.** 280 1336-1345. 2005.

SONG C, LUO L, LEI Z, LI B, LIANG Z, LIU G, et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. **J Immunol**; 181: 6117-24. 2008.

SOUDI S., A. Z. HOSSEINI & S. M. HASHEMI, Co-administration of rectal BCG and autoclaved Leishmania major induce protection in susceptible BALB/c mice. **Parasite Immunology**, 2011, 33, 561–571 2011.

STOUT RD, SUTTLES J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **J Leukoc Biol** 76:509–5132004.

STOUT RD, WATKINS SK, SUTTLES J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. **J Leukoc Biol** 86:1105 11092009.

TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**. vol. 16, no. 1, pp. 3–9, 2004.

TAPPING R. I.; TOBIAS P. S. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. **Journal of Endotoxin Research**. vol. 9, no. 4, pp. 264–268, 2003.

TEO, W.H., NURUL, A.A, NORAZMI, M.N. Immunogenicity of recombinant BCG-based vaccine expressing the 22 kDa of serine repeat antigen (SE22) of Plasmodium falciparum. **Tropical Biomedicine** 29(2): 239–253. 2012.

TORRADO E, COOPER AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine & growth factor reviews** 21: 455–462. 2010.

UNDERHILL D. M., OZINSKY A., SMITH K. D., ADEREM A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. vol. 96, no. 25, pp. 14459–14463, 1999.

VANCREVEL, R. OTTENHOFF, TM, et al. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Rev.** April vol. 15 no. 2 294-3092002.

VIJAYALAKSHMI V, MURTHY KJ, KUMAR S & KIRAN AL. Comparison of the immune responses in children vaccinated with three strains of BCG vaccine. **Indian Pediatr** 32: 979–982. 1995.

VYKHOVANETS EV, MACLENNAN GT, VYKHOVANETS OV, GUPTA S. IL-17 Expression by macrophages is associated with proliferative inflammatory atrophy lesions in prostate cancer patients. **Int J Clin Exp Pathol**; 4: 552-65. 2011.

WANG CC, ROOK GA. Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed *Mycobacterium vaccae*. **Immunology**;93:307-13. 1998.

WEIR RE, BLACK GF, NAZARETH B, FLOYD S, STENSON S, STANLEY C, et al. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to Bacille Calmette–Guerin vaccination in southern England and northern Malawi. **Clin Exp Immunol**;146:390–9. 2006.

WERNER, JL, et al. Neutrophils Produce Interleukin 17A (IL-17A) in a Dectin-1- and IL-23-Dependent Manner during Invasive Fungal Infection. **Infect. Immun.** October vol. 79 no. 10 3966-3977v. 2011.

WHO (World Health Organization), Tuberculosis Facts. 2011.

WHO (World Health Organization), Tuberculosis Facts. 2012.

WHO (World Health Organization), Tuberculosis Facts. 2013.

WOLK K, KUNZ S, WITTE E, FRIEDRICH M, ASADULLAH K, SABAT R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. **Immunity**;21:241–54. 2004.

WOLK K, SABAT R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. **Cytokine and Growth Factor Reviews** 17:367–80. 2006.

WOLK K, WITTE E, HOFFMANN U, DOECKE WD, ENDESFELDER S, ASADULLAH K, et al. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. **Journal of Immunology**;178:5973–81. 2007.

WOLK, K., S. KUNZ, E. WITTE, M. FRIEDRICH, K. ASADULLAH, R. SABAT. IL-22 increases the innate immunity of tissues. **Immunity** 21: 241–254. 2004.

WU B, HUANG C, GARCIA L et al. Unique Gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guerin. **Infect Immun** 75: 3658–3664. 2007.

YE P, RODRIGUEZ FH, KANALY S, STOCKING KL, SCHURR J, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **The Journal of experimental medicine** 194: 519–527. 2001.

ZHANG G, WANG P, QIU Z, QIN X, LIN X, LI N, HUANG H, LIU H, HUA W, CHEN Z, ZHAO H, LI W, SHEN H. Distant lymph nodes serve as pools of Th1 cells induced by neonatal BCG vaccination for the prevention of asthma in mice. **Allergy**; 68: 330–338. 2013.

ZHANG M, ZHENG X, ZHANG J, ZHU Y, ZHU X, et al. CD19(+)CD1d(+)CD5(+) B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. **Cell Immunol** 274: 89–97. 2012.

ZODPEY SP, AMBADEKAR NN, THAKUR A. Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India. **Public Health.**;119:209-162005.

ZUANY-AMORIM C, SAWICKA E, MANLIUS C, LE MOINE A, BRUNET LR, KEMENY DM, BOWEN G, ROOK G, WALKER C. Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells. **Nat Med**;8:625-9. 2002.

ZUMLA A, RAO M, PARIDA SK, KESHAVJEE S, CASSELL G, WALLIS R, AXELSSON-ROBERTSSON R, DOHERTY M, ANDERSSON J, MAEURER M. Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies (*Review*). **J Intern Med**; doi: 10.1111/joim. 12256. 2014.

ZWERLING A, COJOCARIU M, MCINTOSH F, PIETRANGELO F, BEHR MA, et al. TB Screening in Canadian Health Care Workers Using Interferon-Gamma Release Assays. **PLoS ONE** 7(8): e43014. doi:10.1371/journal.pone.0043014. 2012.

9- Anexos

ANEXO 1- Parecer do comitê de ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 12 de maio de 2014

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA/ENSINO, PROTOCOLADO NESTA COMISSÃO SOB O Nº 027/14

I - Finalidade do projeto:

(x) Pesquisa () Ensino

II - Identificação:

Título do projeto:

Avaliação da resposta imune específica induzida pela vacina mc²-CMX em camundongos IL-17KO, IL-22KO e INOSKO frente à infecção com *M. tuberculosis*

Pesquisador Responsável/ Unidade:

Ana Paula Junqueira Kipnis –IPTST - UFG

Pesquisadores Participantes:

André Kipnis
Monalisa Martins Trentini
Fábio Muniz de Oliveira
Adeliane Castro da Costa
Joyce Moreira Camargo

Unidade onde será realizado: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Data de apresentação ao CEUA: 14/04/2014

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Avaliar a resposta imune específica induzida pela vacina mc²-CMX em camundongos IL-17KO, IL-22KO e INOSKO frente a infecção com *M. tuberculosis*.

A justificativa se baseia no fato de que há quase um século, a BCG (Bacilo Calmette-Guérin) é a única vacina utilizada para o controle da TB, apresentando uma boa eficácia em crianças protegendo-as das formas graves da doença (meningite e TB miliar). Porém a proteção conferida em adultos é muito variável,

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com



principalmente para a forma pulmonar, e esta não inibi a reativação do Mtb. Com isso, o desenvolvimento de novas vacinas que induzam uma resposta imune eficaz e duradoura é de grande valia.

IV - Sumário do projeto:

Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:

O trabalho se encontra numa fase em que o teste em animais é necessário, uma vez que análises em métodos alternativos como cultura de células não se aplicam para testes ensaios de avaliação de resposta a uma vacina. Sendo importante a avaliação num sistema biológico vivo.

Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc): O estudo será realizado utilizando camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 (n=17), IL-17KO (nocaute) (n=17), IL-22KO (nocaute) (n=17), INOS-KO (nocaute) (n=17), fêmeas com idade entre 6-8 semanas, provenientes do biotério de criação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG.

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

O proponente relata que as condições de temperatura, umidade e ventilação serão mantidos por estante ventilada em sala com dupla contenção e circulação de ar próprias. As trocas das gaiolas serão realizadas em fluxo laminar classe 2B2. O uso dos camundongos será conduzido de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). Os camundongos serão reunidos em grupos de 5 e mantidos em microisoladores autoclaváveis contendo filtros HEPA, mantendo os animais em condições “Specific Pathogen Free” (SPF), acoplados à estante ventilada com água e dieta ad libitum. As estantes possuem controladores de temperatura e umidade, que serão mantidas a 22-24°C e 55% ±10 respectivamente. O ciclo de iluminação do ambiente será de 12hs, e qualquer fonte de ruídos que proporcionem estresse aos animais serão minimizadas. Todos os materiais utilizados na rotina do biotério são autoclavados (água, ração, gaiolas, palha e material cirúrgico) antes do uso para manter os animais em condições SPF, e depois para evitar contaminação

Utilização de agente infeccioso/severidade da infecção a ser observada:

O proponente relata que há risco de infecção e que todos os procedimentos serão realizados por pessoal treinado e numa estrutura adequada: ambiente protegido (Sala Vacinômica) com troca de roupas numa antessala com colocação de IPIs (luvas, óculos, máscaras N95, jaleco, prope). Todo o material utilizado será submetido ao método de acondicionamento duplo de desinfecção. Toda a manipulação dos animais ocorrerá em fluxo laminar de nível III de biossegurança.

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

O proponente relata que os animais serão mantidos e manejados de acordo com os critérios do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA). Os animais permanecerão em microisoladores que

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufg@gmail.com



propiciam um ambiente livre de patógenos, com água e ração ad libitum. Adicionalmente, estes microisoladores são acoplados a cabines reguladas para gerar um ambiente/habitat com condições que mimetizam o natural destes animais. Todos os procedimentos invasivos bem como a eutanásia serão realizados ao final dos experimentos, por pessoal treinado, minimizando o sofrimento dos animais. Além disso, os animais serão observados durante toda a duração do protocolo e num sinal de sofrimento do animal devido ao tratamento com o antibiótico o mesmo será eutanasiado sendo retirado do protocolo.

Método de eutanásia: Deslocamento cervical

Destino do animal: Desinfecção e incineração.

IV – Comentários do relator frente às orientações da SBCAL

Estrutura do protocolo: Ficha de protocolo preenchida corretamente.

Necessidade do número de animais:

Obtida por testes estatísticos.

Análise de sofrimento imposto, métodos alternativos e benefícios:

Os procedimentos descritos no projeto estão de acordo os objetivos, justificando a realização do mesmo. Uma vez que os autores relatam não haver métodos alternativos.

Análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:

De acordo com o projeto os envolvidos já tem experiência no manuseio de animais e utilizarão recursos: Luvas, jalecos dentre outros, minimizando ao máximo o risco de acidentes, bem como estrutura adequada.

V - Parecer do CEUA:

De acordo com a documentação apresentada a esta Comissão consideramos o projeto **APROVADO**. **O CEUA recomenda ao proponente que o mesmo sempre cite o número total dos animais tanto no projeto quanto na folha de protocolo, pois a ausência deste parâmetro passará a ser considerada como pendência.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Solicitação aos pesquisadores:

As pendências devem ser atendidas impreterivelmente dentro do prazo de 60 dias (sessenta). Após este período, o projeto será considerado retirado e posteriormente, havendo interesse, deverá ser apresentado novo protocolo e reiniciado o processo de registro nesta comissão.

VI - Data da reunião: 12/05/2014

p/hy
Profa. Dra. Sheila Araújo Teles
Coordenadora Geral de Pesquisa/UFG
Mat. SIAPE 0300203

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG