

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ANA CAROLINA VALENTE SANTOS CRUZ DE ARAUJO



**Avaliação da proteção mediada pela Imunidade Treinada  
induzida pela cepa vacinal BCG contra a infecção pela  
bactéria patogênica *Brucella abortus***

Belo Horizonte - MG

2020

ANA CAROLINA VALENTE SANTOS CRUZ DE ARAUJO

**Avaliação da proteção mediada pela Imunidade Treinada  
induzida pela cepa vacinal BCG contra a infecção pela  
bactéria patogênica *Brucella abortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Orientadores:**

Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira

(Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Prof. Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho

(Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Belo Horizonte – MG

2020

043 Araujo, Ana Carolina Valente Santos Cruz de.

Avaliação da proteção mediada pela Imunidade Treinada induzida pela cepa vacinal BCG contra a infecção pela bactéria patogênica *Brucella abortus* [manuscrito] / Ana Carolina Valente Santos Cruz de Araujo. – 2020.

75 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira. Coorientador: Prof. Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. Memória Imunológica. 3. Macrófagos. 4. Brucelose. 5. *Brucella abortus*. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Marinho, Fábio Antônio Vitarelli. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA CAROLINA VALENTE SANTOS CRUZ DE ARAUJO.** Aos quatro dias do mês de agosto de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação da proteção mediada pela Imunidade Treinada induzida pela cepa vacinal BCG contra a infecção pela bactéria patogênica *Brucella abortus*", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

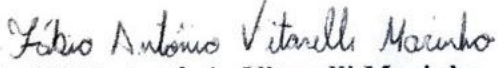
APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 04 de agosto de 2020.

  
Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

  
Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

Digitally signed by Luis Henrique Franco  
DN: cn=Luis Henrique Franco, o=BR,  
ou=Universidade Federal de Minas Gerais,  
ou=Departamento de Bioquímica e  
Imunologia, email=luisfranco@icb.ufmg.br  
Date: 2020.08.04 16:45:35 -03'00'

  
Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho - Coorientador (UFMG)

  
Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)

## Dedicatória

À toda minha família, fonte de compreensão e amor!  
Especialmente à minha mãe e ao meu pai, Nivea Valente e Antônio Marcos Valente, por sonharem comigo os meus sonhos, pela força e auxílios concedidos em todas e quaisquer situações e por serem o meu alicerce durante as etapas da vida. Sem vocês, com certeza, essa trajetória seria muito mais árdua e talvez até impossível.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer,

Primeiramente a Deus por tornar a minha trajetória mais rica e leve, por me dar força para correr atrás dos meus objetivos e por me guiar através de caminhos de constante aprendizagem;

Ao meu orientador o Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira pela confiança, pela oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisa, pela acurácia das correções e por todos os ensinamentos profissionais neste período do mestrado;

Ao meu orientador e amigo o Prof. Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho pela orientação cuidadosa, pelas incansáveis discussões, pela dedicação, pela disponibilidade, por me introduzir ao mundo científico, pelos conselhos e aprendizados, pela parceria e pelos ensinamentos profissionais neste período do mestrado;

Ao grupo “Myco”, Fábio Marinho, Nina Marí Gual e Júlia Fabel, por todos os auxílios e conselhos, pela amizade, pelas ajudas nos experimentos, incluindo os dias em que chegaram muito cedo e saíram muito tarde, para que todos os passos fossem realizados da forma mais coordenada e organizada possível.

Aos lidianos e ex-lidianos do Laboratório de Imunologia e Doenças Infeciosas (LIDI): Fábio Mambelli, Lunna, Enrico, Cláudia, Fernanda, Raiany, Daiane, Marco Túlio, Erika, Suellen e Priscila pela boa convivência, conversas e risadas. À Sandra Fernandes pelo profissionalismo e dedicação ao seu trabalho, que facilita nossos experimentos, sem nunca faltar nada. Aos Bioteristas por todo cuidado e respeito aos animais;

Aos membros da banca, Profa. Dra. Liza Felicori, Prof. Dr. Luiz Henrique Franco e Profa. Dra. Maria de Fátima Horta, pela disponibilidade e por aceitarem contribuir com este trabalho. Ao Prof. Dr. Erich Tahara que gentilmente nos disponibilizou o Laboratório de Genética Bioquímica. À Dra. Edleusa Batista que gentilmente forneceu anticorpos para investigação do imunometabolismo;

Aos demais professores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Programa de Bioquímica e Imunologia, ao Instituto de Ciências Biológicas, à UFMG, às agências de fomento que contribuem para a concretização do nosso trabalho;

Aos meus amigos de Salvador e de Belo Horizonte que estiveram presentes comigo nesta trajetória. À toda minha família, minha mãe, meu pai, minha irmã - Paloma Adriane Valente, meu - Sobrinho Eric Perseu Valente, meu avô, tios e primos! Ao meu namorado - Fábio Mambelli, pelo apoio e companheirismo, pelas vezes em que foi à Universidade comigo nos finais de semana e por me esperar finalizar os experimentos, por me ouvir e ter muita paciência! Com certeza vocês contribuíram na minha trajetória! Amo muito vocês;

Muito obrigada a todos!

"A memória imunológica é um  
fenômeno um tanto quanto onipresente  
nos sistemas biológicos."

Thomas Pradeu e Louis Du Pasquier

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 A Imunidade Treinada no contexto de memória imunológica.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Os mecanismos moleculares de manutenção da Imunidade Treinada em monócitos/macrófagos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 O Bacilo de Calmette-Guérin: efeitos heterólogos e indução da Imunidade Treinada .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 A Brucelose, o gênero <i>Brucella</i> e a <i>Brucella abortus</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5 Interação entre <i>Brucella abortus</i> e o sistema imunológico do hospedeiro .....</b>	<b>28</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Animais e grupos experimentais .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Bactérias .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Indução de Imunidade Treinada <i>in vivo</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.1 Indução de Imunidade Treinada com BCG <i>in vivo</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.2 Indução de Imunidade Treinada com BCG <i>in vivo</i> seguido por tratamento com antibióticos INH/RIF .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Análise da sobrevivência.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Determinação do número de unidades formadoras de colônia e mensuração do peso relativo do baço e do fígado.....</b>	<b>38</b>

4.6 Geração e estimulação <i>in vitro</i> de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	38
4.7 Dosagem de citocinas.....	39
4.8 Análise por Citometria de fluxo .....	39
4.9 Cinética de infecção .....	40
4.10 Análise do perfil transcricional por qPCR.....	41
4.10.1 Extração de RNA .....	41
4.10.2 Síntese de cDNA.....	41
4.10.3 PCR em tempo real quantitativo .....	42
4.11 Western blot.....	42
4.12 Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS .....	44
5.1 A vacinação prévia com BCG tem impacto na sobrevivência de camundongos RAG <sup>-/-</sup> após desafio com a <i>Brucella abortus</i> .....	44
5.2 A vacinação prévia com BCG favorece o controle da carga bacteriana no baço de camundongos C57BL/6 e RAG <sup>-/-</sup> após infecção com <i>Brucella abortus</i> e reduz peso relativo de órgãos acometidos.....	45
5.3 A vacinação prévia com o BCG potencializa a ativação de macrófagos derivados da medula óssea contra o desafio pela bactéria <i>Brucella abortus</i> .....	50
5.4 A eliminação do BCG da medula óssea após indução de Imunidade Treinada resulta em macrófagos mais ativados para controle da infecção pela <i>Brucella abortus</i> .....	52
5.5 A Imunidade Treinada induzida por BCG <i>in vivo</i> resulta em macrófagos derivados da medula óssea com maior capacidade de controle intracelular da <i>Brucella abortus</i> .....	58
6. DISCUSSÃO .....	59
7. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS .....	67
APENDICE – ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODO DO MESTRADO .....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Assinaturas epigenéticas são responsáveis pela potencialização da transcrição de genes pró-inflamatórios e consequente aumento da resposta imunológica na Imunidade Treinada .....	19
<b>Figura 2.</b> A base molecular da Imunidade Treinada é baseada na interconexão da reprogramação imunometabólica e epigénetica que são mutuamente dependentes e indispensáveis .....	21
<b>Figura 3.</b> Modelo ilustrado de indução da Imunidade Treinada - O BCG é capaz de induzir proliferação e comprometimento de HSCs com a linhagem mieloide, que posteriormente originarão macrófagos mais responsivos.....	24
<b>Figura 4.</b> A brucelose animal é uma doença amplamente distribuída no mundo, com alta incidência de infecção por <i>B. abortus</i> no Brasil .....	28
<b>Figura 5.</b> Subversão de vias intracelulares do hospedeiro para origem do nicho replicativo da <i>Brucella abortus</i> no interior de macrófagos e posterior egresso para disseminação em células vizinhas .....	30
<b>Figura 6.</b> A ativação de caspase-11 por meio do LPS de <i>B. abortus</i> culmina em piroptose e efluxo de K <sup>+</sup> , este último responsável pela ativação não-canônica do inflamassoma de NLRP3 .....	32
<b>Figura 7.</b> A vacinação prévia com BCG Moreau protege camundongos C57BL/6 RAG <sup>-/-</sup> contra a infecção pela bactéria patogênica <i>B. abortus</i> S2308 .....	45
<b>Figura 8.</b> Carga bacteriana de <i>B. abortus</i> S2308 em meio BB ágar 7 e 15 d.p.i. ....	46
<b>Figura 9.</b> Carga bacteriana de <i>B. abortus</i> no baço de animais C57BL/6 WT e peso relativo de órgãos acometidos pela <i>B. abortus</i> 7 e 15 d.p.i. ....	47
<b>Figura 10.</b> Carga bacteriana de <i>B. abortus</i> S2308 em meio BB ágar 7 d.p.i. ....	48
<b>Figura 11.</b> Carga bacteriana de <i>B. abortus</i> no baço de animais C57BL/6 RAG <sup>-/-</sup> e WT e peso relativo de órgãos acometidos pela <i>B. abortus</i> 7 d.p.i. ....	49
<b>Figura 12.</b> BMDMs provenientes de camundongos previamente imunizados com o BCG Moreau são mais responsivos à bactéria patogênica <i>Brucella abortus</i> S2308.....	51
<b>Figura 13.</b> Indução de Imunidade Treinada mediada por BCG <i>in vivo</i> .....	53

<b>Figura 14.</b> O fenômeno de Imunidade Treinada induzido por BCG <i>in vivo</i> resulta em BMDMs funcionalmente mais aptos ao combate da infecção desencadeada pela <i>B. abortus</i> S2308 .....	55
<b>Figura 15.</b> BMDMs Treinados por BCG <i>in vivo</i> apresentam maior ativação da via do mTORC1 .....	56
<b>Figura 16.</b> Indução de Imunidade Treinada <i>in vivo</i> origina BMDMs com maior nível de transcritos do receptor NLRP3 .....	57
<b>Figura 17.</b> O controle intracelular do crescimento de <i>B. abortus</i> é aprimorado devido à Imunidade Treinada induzida <i>in vivo</i> .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fenômenos de memória imunológica e seus respectivos mecanismos de manutenção. ....	17
<b>Tabela 2.</b> O gênero <i>Brucella</i> abrange doze espécies identificadas e nomeadas que diferem em relação à preferência pelo hospedeiro natural e ao potencial zoonótico. ....	26
<b>Tabela 3.</b> Iniciadores utilizados na amplificação gênica por qPCR em BMDMs .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ACL</b>	ATP citrato liase
<b>AP-1</b>	<i>Activator protein 1</i>
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígeno
<b>ASC</b>	<i>Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD</i>
<b>BB</b>	<i>Brucella Broth</i>
<b>BCA</b>	Ácido bicinchonínico
<b>BCVs</b>	<i>Brucella-containing vacuoles</i>
<b>aBCVs</b>	<i>Autophagic BCV</i>
<b>eBCVs</b>	<i>Endossomal BCV</i>
<b>rBCVs</b>	<i>Replicative BCV</i>
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmette-Guérin
<b>BM</b>	Medula óssea
<b>BMDM</b>	Macrófagos derivados de medula óssea
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>ChIP</b>	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
<b>ChIP-Seq</b>	<i>Chromatin immunoprecipitation and DNA sequencing</i>
<b>CIC</b>	<i>Citrate carrier</i>
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados a danos
<b>DCs</b>	<i>Dendritic cells</i>
<b>DMEM</b>	Meio <i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>d.p.i</b>	Dias após infecção
<b>ER</b>	<i>Endoplasmic reticulum</i>
<b>ERES</b>	<i>Endoplasmic reticulum exit site</i>
<b>GASDMD</b>	Gasdermina D
<b>GBPs</b>	<i>Guanylate-binding proteins</i>
<b>HATs</b>	Histonas acetiltransferases

<b>HEPES</b>	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid</i>
<b>HIF</b>	<i>Hipoxia-inducible factor</i>
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	<i>Hipoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
<b>HIF1<math>\beta</math></b>	<i>Hipoxia-inducible factor 1<math>\beta</math></i>
<b>HSCs</b>	Células tronco hematopoiéticas
<b>H3K27me3</b>	Trimetilação na lisina 27 da histona 3
<b>H3K4ac</b>	Acetilação na lisina 4 da histona 3
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IFN</b>	Interferon
<b>INH</b>	Isoniazida
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>IRF</b>	<i>Interferon-regulatory factor</i>
<b>i.v</b>	Intravenoso
<b>KDM5</b>	<i>Lysine demethylase 5</i>
<b>LCCM</b>	Meio condicionado de células L929
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MFI</b>	Intensidade mediana de fluorescência
<b>MHC-II</b>	<i>Major histocompatibility complex II</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção
<b>M-PER</b>	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
<b>MPPs</b>	<i>Multipotent progenitors</i>
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>mTORC1</b>	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
<b>mTORC2</b>	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear $\kappa$ B
<b>NI</b>	Não infectado
<b>NLRs</b>	<i>NOD-like receptors</i>
<b>NSEs</b>	<i>Non-specific effects</i>

<b>OADC</b>	<i>Oleic acid-albumin-dextrose-catalase</i>
<b>OIE</b>	<i>World Animal Health Organization</i>
<b>Omp</b>	<i>Outer membrane protein</i>
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcription qPCR</i>
<b>SAR</b>	<i>Systemic acquired resistance</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>STAT</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TCA</b>	Ciclo do ácido tricarbóxico
<b>TFs</b>	<i>Transcriptional factors</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>T4SS</b>	Sistema de secreção do tipo IV
<b>WAHIS</b>	<i>World Animal Health Information Database Interface</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i> (selvagem)
<b>YFV</b>	<i>Yellow fever virus</i>
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramas
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros

## RESUMO

A Imunidade Treinada é o fenômeno de memória imunológica vinculado ao sistema imune inato, desencadeado por um estímulo indutor que promove alterações celulares a nível epigenético, transcricional e funcional. Neste contexto, o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), presente na vacina contra a tuberculose, tem sido demonstrado como um eficiente indutor de Imunidade Treinada, capaz de reprogramar células inatas em prol de uma resposta imunológica mais rápida e efetiva após um segundo estímulo não-relacionado. Dentre essas células inatas, destacam-se os macrófagos, fagócitos imprescindíveis para combater diferentes patógenos. A *Brucella abortus* representa um dos principais agentes etiológicos da Brucelose, uma zoonose infecciosa e sistêmica, responsável por gerar perdas significativas para a economia brasileira. Esta bactéria apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imunológico e dentro do hospedeiro, os macrófagos representam o seu principal nicho replicativo. Neste trabalho, nós utilizamos a cepa vacinal BCG Moreau como indutora de Imunidade Treinada, a fim de gerar macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 capazes de responder de forma mais eficiente à infecção pela bactéria patogênica *Brucella abortus*. A Imunidade Treinada induzida pelo BCG foi capaz de proteger camundongos RAG<sup>-/-</sup> contra o desafio letal com a *B. abortus*. Além disso, camundongos C57BL/6 e RAG<sup>-/-</sup> previamente vacinados apresentaram redução da carga bacteriana de *B. abortus* no baço 7 e 15 dias após à infecção. A indução de Imunidade Treinada *in vivo* em camundongos C57BL/6, resultou em BMDMs gerados *in vitro* com maior capacidade de produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$ , maior expressão das moléculas CD40 e MHC-II na superfície celular e, sobretudo, maior controle da replicação bacteriana após desafio com a *B. abortus*. Antes da infecção com a *B. abortus*, macrófagos Treinados com BCG apresentaram maior ativação da via mTORC1 e níveis elevados de transcritos do receptor do inflamassoma NLRP3 quando comparado com macrófagos não infectados. Nossos achados nos permitem sugerir que os efeitos não-específicos desencadeados pelo BCG cepa Moreau decorreram da atividade potencializada do sistema imune inato, dentro do qual os macrófagos são mediadores principais do fenômeno de proteção contra a infecção pela *B. abortus*. A Imunidade Treinada representa uma nova abordagem na perspectiva de memória imunológica e este trabalho contribui para o entendimento deste fenômeno, o que pode auxiliar em aplicações biotecnológicas futuras do desenvolvimento de vacinas heterólogas. **Palavras-chave:** Imunidade Treinada; BCG; macrófagos; Brucelose; *Brucella abortus*.

## ABSTRACT

Trained Immunity is the immunological memory phenomenon related to the innate immune system. This phenomenon is triggered by an inducing stimulus that promotes cellular changes at the epigenetic, transcriptional and functional levels. In this regard, the Bacillus Calmette-Guérin (BCG), contained in the tuberculosis vaccine, has been shown to be an efficient inducer of Trained Immunity, reprogramming innate immune cells for faster and more effective immune response after a second unrelated stimulus. Among these cells, macrophages are essential phagocytes in the combat against different pathogens. *Brucella abortus* is one of the main etiological agents of Brucellosis, an infectious and systemic zoonosis, responsible for generating significant losses for Brazilian economy. This pathogen presents several immune evasion mechanisms and targets host's macrophages as its main replicative niche. In this study, we used the BCG Moreau vaccine strain in order to generate C57BL/6 bone-marrow-derived macrophages (BMDMs) able to respond to *Brucella abortus* infection. BCG-mediated Trained Immunity protected RAG<sup>-/-</sup> mice against *B. abortus* lethal challenge *in vivo*. Moreover, previously vaccinated C57BL/6 and RAG<sup>-/-</sup> mice demonstrated reduction in *B. abortus* bacterial load in the spleen, 7 and 15 days post-infection. Trained Immunity in C57BL/6 mice resulted in *in vitro* generated BMDMs with greater production of IL-6 and IL-1 $\beta$ , greater CD40 and MHC-II molecules expression on cell surface and, enhanced control of bacterial replication after challenge with *B. abortus*. Prior to infection with *B. abortus*, BCG-trained macrophages showed remarkable activation of the mTORC1 pathway and elevated levels of NLRP3 inflammasome receptor transcripts when compared to naïve macrophages. Our findings allow us to suggest that the non-specific effects triggered by BCG Moreau enhanced the innate immune system activity, mainly in macrophages, which are mediators of the observed protection against *B. abortus* infection. Trained Immunity represents a new approach from the perspective of immunological memory and this work contributes to the understanding of this phenomenon, which can assist in future biotechnological applications and the development of heterologous vaccines. **Key-words:** Trained Immunity; BCG; macrophages; Brucellosis; *Brucella abortus*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A Imunidade Treinada no contexto de memória imunológica

O termo Imunidade Treinada foi proposto pela primeira vez em 2011 pelo imunologista romeno Mihai G. Netea para conceituar a capacidade do sistema imune inato de mamíferos em gerar memória imunológica. A memória imune inata, ou de forma mais correta e usual, a Imunidade Treinada, é a habilidade do sistema imune inato em responder de forma mais acentuada e eficiente quando um contato patógeno-hospedeiro ocorrer pela segunda vez, seja ele desencadeado pelo mesmo patógeno ou por um patógeno distinto (proteção-cruzada) (Netea, Quintin, & van der Meer, 2011). A partir desse entendimento, é plausível concluir que a imunidade treinada atua de forma inespecífica quando comparada à memória imune clássica.

Durante as últimas duas décadas, evidências têm desafiado o dogma da imunologia que fundamenta o sistema imune adaptativo, representado por linfócitos T e B, como exclusivo detentor de memória imunológica. Dentre estas evidências, estudos recentes têm demonstrado que células da linhagem monócitos/macrófagos apresentam a capacidade de potencializar a resposta imunológica à reinfecção, até mesmo quando mediada por organismos de reinos diferentes, isto é, o primeiro estímulo desencadeado por uma bactéria e o segundo por um vírus (R. J. W. Arts *et al.*, 2018, Dos Santos *et al.*, 2019, Kaufmann *et al.*, 2018, Netea *et al.*, 2016).

A nova compreensão do conceito de memória imunológica, proposta em 2018 pelos pesquisadores Thomas Pradeu e Louis Du Pasquier, aborda sobre a importância da distinção dos diferentes mecanismos que mantêm os diversos tipos de memória imunológica (Pradeu & Du Pasquier, 2018). Portanto, é necessário ressaltar que fenômenos que podem ser classificados como memória imunológica, como por exemplo memória de linfócitos T e B, memória de monócitos/macrófagos e células NK, resistência sistêmica em plantas, proteção específica em invertebrados e “memória imunológica” em bactérias e arqueas, diferem em relação aos seus mecanismos de manutenção (**Tabela 1**). Além disso, por ocorrerem em diferentes escalas temporais e serem desencadeados por microrganismos distintos que apresentam ciclo de vida e organização fisiológica particulares, não há um sistema de mensuração universal para memória imunológica (Gourbal *et al.*, 2018, Pradeu & Du Pasquier, 2018). A memória imunológica engloba compartimentos biológicos e organismos de diferentes escalas evolutivas que apresentam

capacidade de responder através de mecanismos próprios de forma aprimorada. A diversidade do fenômeno o torna variável em relação a parâmetros que caracterizam a sua dimensão: intensidade, duração, velocidade e especificidade (Pradeu & Du Pasquier, 2018).

Os linfócitos T e B, após reconhecimento de antígenos por meio de TCRs e BCRs, respectivamente, sofrem expansão clonal e mudanças irreversíveis na sequência de DNA durante rearranjo gênico desses receptores. Após expansão clonal e combate de infecções por células efectoras, permanecem células T e B de memória com receptores altamente específicos, que em um segundo reconhecimento do mesmo epitopo irão montar uma resposta imune mais rápida e robusta. No processo de indução da Imunidade Treinada por meio de um estímulo, células imunes inatas naïve passam por uma série de mudanças epigenéticas e imunometabólicas, que resultam em respostas secundárias mais eficazes contra uma ampla gama de estímulos não-relacionados (Moorlag, Roring, Joosten, & Netea, 2018, Netea *et al.*, 2016).

Destacando a Imunidade Treinada desenvolvida por células da linhagem de monócitos/macrófagos, a indução deste fenômeno envolve mudanças no imunometabolismo celular de maneira indissociável da reprogramação epigenética para controle da acessibilidade gênica e consequente alteração da expressão de genes associados à resposta imunológica. Neste panorama, macrófagos tornam-se ativamente mais competentes para controle de infecções posteriores (R. J. Arts, Joosten, & Netea, 2016).

**Tabela 1. Fenômenos de memória imunológica e seus respectivos mecanismos de manutenção.**

Memória imunológica	Mecanismos de manutenção
(Memória imune clássica) Linfócitos T e B	Recombinação somática e expansão clonal
<b>(Imunidade Treinada)</b> <b>Monócitos/macrófagos e células NK</b>	<b>Reprogramação imunometabólica e epigenética</b>
Resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas	Acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese, (Durrant & Dong, 2004) vias de sinalização de hormônios vegetais e reprogramação epigenética (Jaskiewicz, Conrath, & Peterhansel, 2011).
Proteção específica em invertebrados	Estudos iniciais sugerem reprogramação transcricional em subconjunto de hemócitos (Gourbal <i>et al.</i> , 2018).
Bactérias e archeas	CRISPR-Cas

**Observação:** em destaque a Imunidade Treinada pertencente ao sistema imune inato de mamíferos. Adaptado de (Netea *et al.*, 2011, Pradeu & Du Pasquier, 2018).

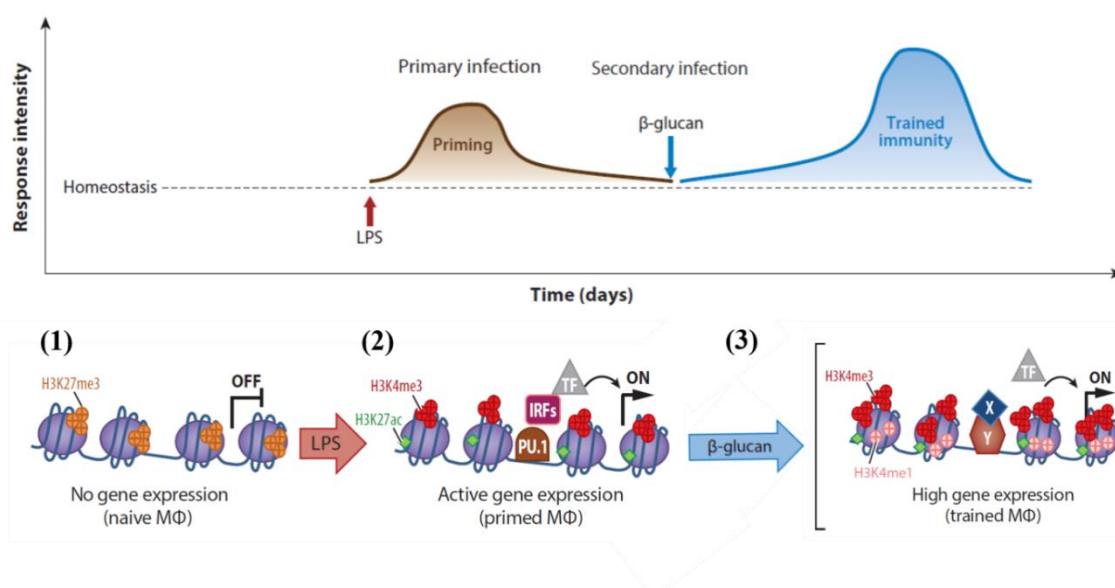
## 1.2 Os mecanismos moleculares de manutenção da Imunidade Treinada em monócitos/macrófagos

Os macrófagos teciduais derivados dos monócitos são componentes imprescindíveis para combater sinais patológicos, visto que apresentam características como adaptabilidade para diferentes microambientes e respostas a diferentes insultos patogênicos. Estes fagócitos possuem a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de uma ampla gama de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como “*Toll-like Receptors*” (TLR), “*NOD-like receptors*” (NLR), inflamassomas e receptores do tipo lectina que estão estrategicamente presentes nas membranas celulares, no citoplasma e em compartimentos endossomais (Locati, Curtale, & Mantovani, 2020).

Dentre os mecanismos que regem a plasticidade dos macrófagos, assinaturas epigenéticas e vias de sinalização são pilares para contextualização da heterogeneidade destas células. Os sinais específicos de microambiente e/ou estímulo, através da dinâmica modulatória da cromatina, resultam em perfis transcricionais e funcionais distintos (Molawi & Sieweke, 2013). Dessa forma, um cenário combinatório de assinaturas epigenéticas exerce controle sobre a responsividade e o nível inflamatório/anti-inflamatório de fagócitos em fenômenos como diferenciação, ativação, polarização, tolerância e imunidade treinada. Quando macrófagos estão em repouso, regiões gênicas induzíveis associadas a processos inflamatórios se encontram em um relativo estado repressivo de cromatina condensada. Esta conformação repressiva, mediante um estímulo, é rapidamente alterada como consequência do aumento de acetilação, aumento e prolongamento da ligação de fatores de transcrição (TFs) e ligação de RNA polimerase II (Smale, Tarakhovsky, & Natoli, 2014).

A acetilação e a metilação de histonas são ferramentas de modelação que fornecem alteração estrutural proteica e consequente associação diferencial com o DNA. Após determinados estímulos iniciais, promotores de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) ou até mesmo elementos regulatórios associados poderão apresentar enriquecimento de assinaturas epigenéticas relacionadas à maior acessibilidade da cromatina, como a acetilação na lisina 27 da histona 3 (H3K27ac) e a trimetilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) (R. J. Arts *et al.*, 2016, Locati *et al.*, 2020). Estas marcas epigenéticas são ligações covalentes estáveis que perduram nas células após a ativação

de macrófagos. Por conseguinte, mediante a um segundo estímulo, a resposta imunológica ocorrerá de forma mais rápida e eficaz, o que fundamenta a Imunidade Treinada (Netea *et al.*, 2016) (**Figura 1**). A ativação da expressão gênica em um segundo estímulo é desencadeada pelo recrutamento de fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B, AP-1 e membros da família STAT) para promotores e acentuadores gênicos. Estas regiões gênicas que além de comumente pré-marcadas com fatores de transcrição determinantes de linhagem como PU.1 (Molawi & Sieweke, 2013), são regiões gênicas enriquecidas por H3K27ac e H3K4me3 (R. J. Arts *et al.*, 2016), o que fornece maior acessibilidade à maquinaria de transcrição.



**Figura 1. Assinaturas epigenéticas são responsáveis pela potencialização da transcrição de genes pró-inflamatórios e consequente aumento da resposta imunológica na Imunidade Treinada.** Macrófagos naïve apresentam regiões gênicas associadas a processos inflamatórios no estado repressivo (1). Após estímulo primário, exemplificado pelo LPS, as histonas passam por modificações químicas (H3K4me3 e H3K27ac) que favorecem a montagem da maquinaria transcritora (2). Essas modificações são estáveis e perduram nas células. Portanto, em um segundo estímulo, exemplificado pelo  $\beta$ -glucano – polissacarídeo fúngico constituinte da parede celular –, regiões favorecidas pela acessibilidade apresentarão transcrição potencializada (3). (PU.1 – família de fator de transcrição importante para o comprometimento de células-tronco hematopoiéticas com a linhagem mielóide e posterior diferenciação em macrófagos/ IRFs – família de fator de transcrição com importante papel durante a especialização funcional de macrófagos (Molawi & Sieweke, 2013)). Adaptado de (Locati *et al.*, 2020).

A Imunidade Treinada é um fenômeno complexo que envolve a interconexão de mecanismos. Evidências demonstram que a reprogramação epigenética e imunometabólica estão integradas e são substratos moleculares para a Imunidade Treinada. No estabelecimento da Imunidade Treinada, vias de sinalização intracelular se

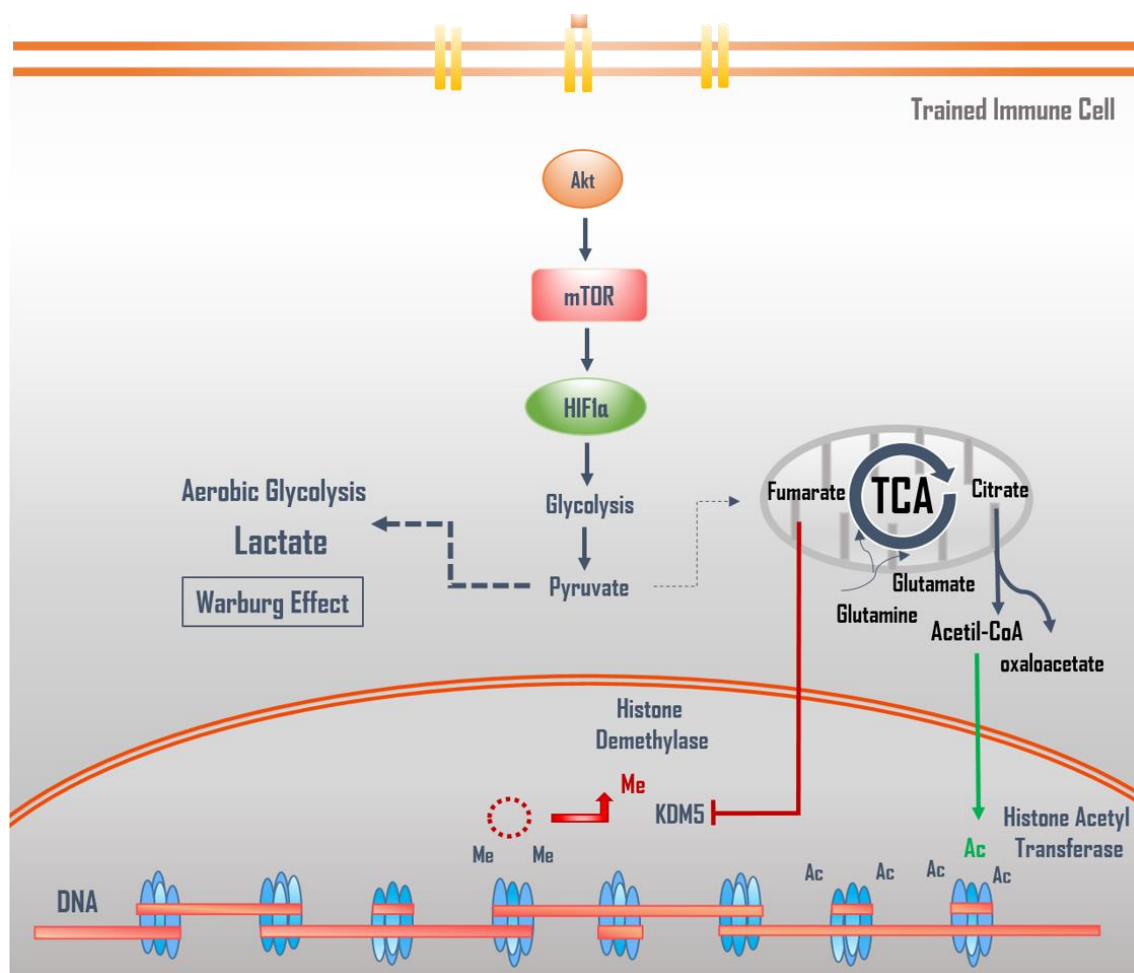
reconfiguram. As mudanças no imunometabolismo incluem o enriquecimento da via da glicólise aeróbia em detrimento da fosforilação oxidativa (Cheng *et al.*, 2014), comumente conhecido como Efeito de Warburg (Warburg, 1956). O aumento do consumo de glicose e da produção de lactato é devido ao papel crucial da via de sinalização Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  (Cheng *et al.*, 2014) (**Figura 2**). A Imunidade Treinada induzida por  $\beta$ -glucano (um indutor de imunidade treinada) é anulada por meio do uso de inibidores químicos que bloqueiam a via Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  (Cheng *et al.*, 2014). Além disso, em camundongos deficientes para HIF-1 $\alpha$  (fator 1 $\alpha$  induzível por hipóxia) em células da linhagem mielóide (mHIF-1 $\alpha^{-/-}$ ), o perfil de treinamento não é observado. Consequentemente, estes camundongos não desenvolvem proteção contra infecções letais posteriores, de forma contrária ao observado em camundongos selvagens (WT) (Cheng *et al.*, 2014).

O sensor metabólico mTOR (*mammalian target of rapamycin*) é formado por dois complexos multiproteicos distintos (mTORC1 e mTORC2). Sua atividade é regulada por uma variedade de sinais imunes extracelulares e metabólicos, com via de sinalização intracelular complexa. Em células imunes inatas, mTOR pode ser ativado por ligantes de TLR e citocinas (Weichhart, Hengstschlager, & Linke, 2015). Entretanto na ausência de sinais de ativação, a via de sinalização do mTOR é inativa. Após estímulo, Akt é fosforilado e é responsável pela ativação de mTORC1. Além disso, a atividade desta via inclui a ativação posterior do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  (Weichhart *et al.*, 2015).

A proteína HIF por sua vez é um importante regulador da imunidade contra patógenos intracelulares e a expressão e estabilização desta molécula pode ser desencadeada por hipóxia. Quando sinais são recebidos ocorre a dimerização das subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  e o dímero se transloca para o núcleo, se associando a genes alvos contendo sequências consenso para resposta a hipóxia. Dessa forma, é iniciado a transcrição de uma série de genes de enzimas da via glicolítica e genes inflamatórios (como TLR2/4 e IL-1 $\beta$ ). A função de HIF é principalmente controlada pela estabilidade da subunidade  $\alpha$ . Em normoxia, HIF é poliubiquitinado e degradado pelo proteassoma (Liu *et al.*, 2020).

Dessa forma, uma das principais funções do mTORC1 é estimular a mudança imunometabólica da fosforilação oxidativa para a glicólise aeróbia horas após infecção em células imunes inatas (Weichhart *et al.*, 2015). Outra via metabólica importante para manutenção do fenótipo treinado é o metabolismo da glutamina. Devido ao enriquecimento do ciclo do TCA pela via acessória do metabolismo da glutamina, há o

acúmulo de metabólitos na Imunidade Treinada (**Figura 2**). O acúmulo de fumarato inibe a atividade da enzima KDM5 histona demetilase. Com isso, ocorre a manutenção do fenótipo de acessibilidade da cromatina pelo enriquecimento da marca epigenética H3K4me3. Além disso, outro exemplo desta relação, pode ser visto entre o citrato e enzimas histonas acetiltransferases (HATs). Ao ser exportado para o citosol através da enzima transportadora de citrato (CIC), o citrato é posteriormente convertido em acetil-CoA e oxalacetato pela enzima ATP citrato liase (ACL) (Liu *et al.*, 2020). O acetil-CoA produzido pela ACL é importante por atuar como doador do grupamento acetil para acetilação de histonas por meio das HATs (Bekkering *et al.*, 2018, Wellen *et al.*, 2009). Ademais, já foi visto que a inibição do metabolismo da glutamina resulta em decréscimo da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) na Imunidade Treinada (R. J. Arts *et al.*, 2016).



**Figura 2.** A base molecular da Imunidade Treinada é baseada na interconexão da reprogramação imunometabólica e epigenética que são mutuamente dependentes e indispensáveis. Após um estímulo, a fosforilação da proteína quinase serina/teonina Akt ativa a via do mTOR. Por conseguinte, mTOR promove a tradução e atividade de HIF, resultando em aumento da glicólise aeróbia. O enriquecimento do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) pelo

metabolismo da glutamina resulta em acúmulo de componentes deste ciclo. Citrato e fumarato são importantes para a reprogramação epigenética devido ao controle de enzimas que promovem alterações pós-traducionais nas histonas. O citrato é transportado da mitocôndria para o citoplasma por meio da enzima transportadora de citrato (CIC) ao mesmo tempo em que há o influxo de malato. No citoplasma, o citrato é convertido em acetil-CoA e oxalacetato. A disponibilidade do acetil-CoA proveniente do citrato é importante, pois esta molécula atua como doador de acetil para histonas acetil transferases (Wellen *et al.*, 2009). De forma similar, a interligação entre componentes do ciclo do TCA e a reprogramação epigenética pode ser demonstrada através do fumarato e da enzima KDM5 histona demetilase. O acúmulo de fumarato inibe a ação desta enzima, favorecendo, portanto, alterações epigenéticas associadas ao aumento da acessibilidade da cromatina (H3K4me3) (Bekkering *et al.*, 2018).

### **1.3 O Bacilo de Calmette-Guérin: efeitos heterólogos e indução da Imunidade Treinada**

De acordo com recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO), a vacina viva atenuada correspondente ao bacilo de Calmette-Guérin (BCG) está inserida no cronograma de vacinação de países endêmicos para a tuberculose (TB) e é administrada em recém-nascidos ou no primeiro contato com os serviços de saúde visando a proteção contra formas severas da TB (WHO, 2018). Além da consistente proteção contra formas severas da doença, o BCG também protege crianças contra a TB pulmonar, o que contrasta com a variável proteção contra a TB pulmonar em adolescentes e adultos (WHO, 2018).

O BCG foi obtido através de 230 sucessivas passagens da cepa virulenta *Mycobacterium bovis* e seu uso tem sido conduzido desde 1924 (Luca & Mihaescu, 2013). A vacina foi distribuída para diferentes produtores que implementaram o seu próprio modo de produção, o que atualmente reflete em diferentes cepas do BCG utilizadas ao redor do mundo com vários graus de atenuação e eficácia (Luca & Mihaescu, 2013). Dentre elas, o BCG Moreau é a cepa utilizada no Brasil na vacinação de recém-nascidos contra a TB (WHO, 2018).

A vacinação com BCG também apresenta potencial de indução de efeitos benéficos não-específicos (Higgins *et al.*, 2016). Os efeitos não-específicos (NSEs) são efeitos heterólogos resultantes da vacinação, como por exemplo: a proteção contra patógenos não-relacionados, propriedades antitumorais e redução geral da mortalidade infantil (Uthayakumar *et al.*, 2018). Estudos epidemiológicos randomizados acerca de NSEs desencadeados por BCG demonstram o impacto na redução geral da mortalidade infantil (Aaby *et al.*, 2011, Rosenthal *et al.*, 1961). Um dos mais importantes deles foi conduzido em 2.320 crianças na Guinéa-Bissau (Aaby *et al.*, 2011). Neste estudo foi observado que

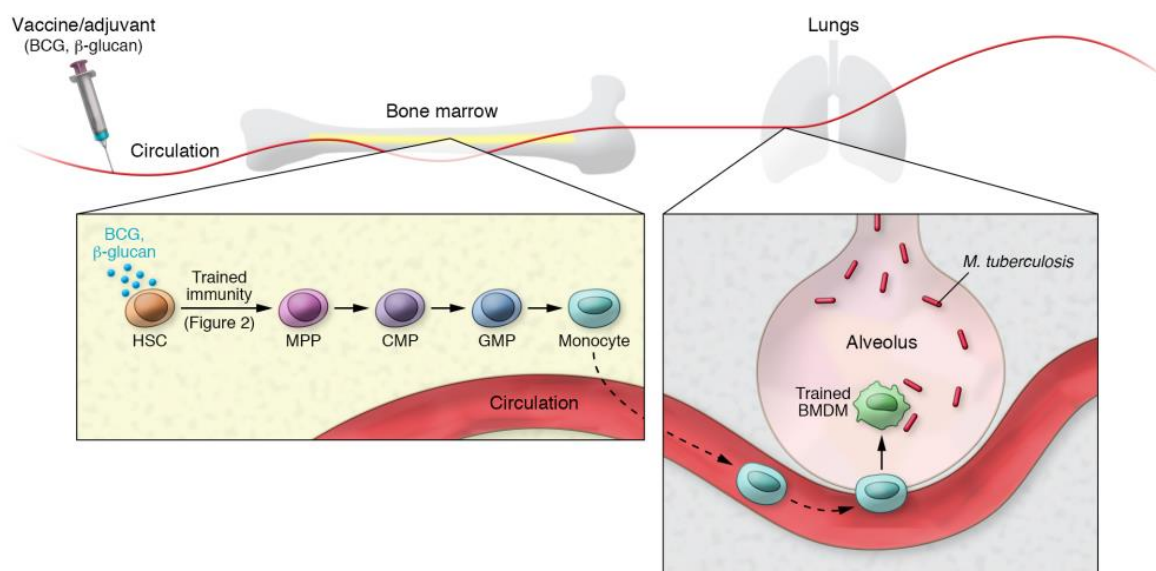
a administração de BCG em recém-nascidos de baixo peso resultou em uma redução de mais de 40% da taxa de mortalidade neonatal no primeiro mês após vacinação, quando comparado com crianças que receberam a vacinação com atraso de 6 semanas. Essa taxa foi associada ao aumento dos mecanismos iniciais de defesa contra sepse neonatal, infecções respiratórias/problemas respiratórios e febre (Aaby *et al.*, 2011). Apesar de estudos epidemiológicos conduzidos para observação de NSEs desencadeados por BCG indicarem efeitos benéficos, existe uma limitação, pois a maioria deles possui alto risco de viés, com inúmeras variáveis como: idade, gênero, status nutricional, status socioeconômico, co-intervenções (administração de outras vacinas), a maioria dos estudos foram conduzidos na Guiné-Bissau e utilização de diferentes cepas de BCG ao redor do mundo (Uthayakumar *et al.*, 2018).

Recentes modelos experimentais demonstram que NSEs desencadeados pelo BCG são biologicamente plausíveis e a Imunidade Treinada tem sido demonstrada como crucial no contexto desse fenômeno (R. J. Arts *et al.*, 2016, Kaufmann *et al.*, 2018). De uma maneira geral, a indução da Imunidade Treinada por meio de indutores como BCG ou  $\beta$ -glucano é descrita por gerar o aumento da capacidade responsiva de monócitos/macrófagos na imunidade contra: *Staphylococcus aureus* (Cheng *et al.*, 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (Kaufmann *et al.*, 2018), *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Ciarlo *et al.*, 2019), *Candida albicans* (R. J. W. Arts *et al.*, 2018); e até mesmo protozoários, como a *Leishmania brasilienses* (Dos Santos *et al.*, 2019).

Na Imunidade Treinada induzida pelo BCG foi demonstrado um aumento das marcas epigenéticas H3K27ac e H3K4me3, sobretudo em regiões acentuadoras. O enriquecimento dessas marcas epigenéticas foi associado com macrófagos mais aptos ao combate de infecções, o que resultou em maior liberação de citocinas pró-inflamatórias e maior capacidade de eliminação de patógenos (Kaufmann *et al.*, 2018). Além disso, já foi elucidado em monócitos humanos treinados por BCG, o enriquecimento das marcas H3K27ac e H3K4me3 e a redução da marca H3K27me3 (comumente associada à repressão gênica) em regiões promotoras de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$  (R. J. W. Arts *et al.*, 2016). Dados provenientes de ChIP-Seq demonstram que monócitos humanos treinados com BCG apresentam enriquecimento para a marca H3K27ac em regiões gênicas associadas à via PI3K/Akt/mTOR (R. J. W. Arts *et al.*, 2018, Cheng *et al.*, 2014). Os macrófagos treinados com BCG, ao serem submetidos à rapamicina, inibidor da via do mTOR, perdem o efeito de potencialização da acessibilidade da cromatina. A inibição dessa via imunometabólica é acompanhada pela

redução da marca epigenética H3K4me3, assim como do aumento da marca epigenética H9K4me3 em regiões promotoras de citocinas pró-inflamatórias (R. J. W. Arts *et al.*, 2016), o que resulta em perda do fenótipo treinado.

Uma abordagem importante no desenvolvimento de Imunidade Treinada é a capacidade do BCG em induzir este fenômeno a partir de células-tronco hematopoiéticas (HSCs). Ao atingir e se estabelecer na medula óssea (BM) de camundongos C57BL/6, o BCG apresenta a capacidade de estimular extracelularmente HSCs e favorecer a expansão e o comprometimento de HSCs com a linhagem mieloide (**Figura 3**). O BCG atua em estágios iniciais da mielopoiese ao estimular HSCs e progenitores multipotentes (MPPs) na BM a se desenvolver em macrófagos mais responsivos com programas epigenéticos específicos (Kaufmann *et al.*, 2018).



**Figura 3. Modelo ilustrado de indução da Imunidade Treinada - O BCG é capaz de induzir proliferação e comprometimento de HSCs com a linhagem mieloide, que posteriormente originarão macrófagos mais responsivos.** Após vacinação com BCG, a BM é estimulada e HSCs apresentam elevada taxa proliferativa. O aumento da proliferação é acompanhado do aumento do comprometimento das células com a linhagem mieloide e da diminuição do comprometimento com a linhagem linfóide. Após completa diferenciação destes precursores na linhagem monócitos/macrófagos, estas células apresentam funções efetoras potencializadas para maior combate à infecções. Como ilustrado, após diferenciação, há a migração de monócitos pela corrente sanguínea até o pulmão, que é o foco da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. No pulmão BMDMs treinados atuam no controle da infecção ao reduzir de forma potencializada a carga bacteriana neste órgão. Fonte da imagem (Khader *et al.*, 2019).

A indução da Imunidade Treinada pelo BCG a partir de HSCs é de vital importância para proteção a longo prazo, visto que monócitos e macrófagos são células de vida útil

relativamente curta e por consequência menos propensas a transmitir memória imunológica de forma sustentada. As HSCs, por sua vez, são células de vida longa com propriedade de autorrenovação, residem na BM e sua reprogramação funcional é herdada por macrófagos (Khader *et al.*, 2019) capazes de responder de maneira potencializada. A utilização dessa abordagem contra microrganismos que subvertam os fagócitos para sua sobrevivência e replicação dentro do organismo hospedeiro pode resultar em melhora do quadro de sua patogênese e patobiologia.

#### 1.4 A Brucelose, o gênero *Brucella* e a *Brucella abortus*

O gênero *Brucella* compreende bactérias que apresentam o formato de cocobacilos Gram-negativos, imóveis, não esporogênicos e intracelulares facultativos (Percin, 2013). Estas bactérias são responsáveis por causar a Brucelose, uma zoonose negligenciada amplamente distribuída no mundo, em que qualquer órgão ou tecido do organismo pode ser acometido com incidência variável (Atluri, Xavier, de Jong, den Hartigh, & Tsolis, 2011). A brucelose foi identificada, pela primeira vez, pelo patologista e microbiologista David Bruce na Ilha de Malta em 1887, ao isolar um cocobacilo identificado por ele como “*Micrococcus melitensis*” (atualmente denominado como *Brucella melitensis*) do fígado de um soldado que pereceu em decorrência da Febre de Malta (Bruce, 1887). Após dez anos, em 1897, o veterinário Bernard Bang isolou o “*Bang’s Bacillus*” ou “Bacilo do aborto de gado” (Bang, 1910), atualmente denominado como *Brucella abortus*.

As bactérias do gênero *Brucella* exibem características antigênicas e metabólicas distintas, e são classificadas de acordo com sua preferência pelo hospedeiro animal (**Tabela 2**). Este gênero, atualmente, abrange doze espécies isoladas e nomeadas (Hull & Schumaker, 2018), dentre as quais *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* são os principais agentes etiológicos da brucelose humana (De Bolle, Crosson, Matroule, & Letesson, 2015). A *Brucella melitensis* é a mais patogênica e a *Brucella abortus* a mais difundida no mundo (Corbel, 1997).

As principais formas de transmissão zoonótica de *B. abortus* é a partir da ingestão de produtos, como produtos lácteos contaminados que não foram submetidos ao processo de pasteurização (Lindhahl-Rajala *et al.*, 2017) e carne crua proveniente de animais infectados (Casalnuovo, Ciambone, Cacia, & Ripa, 2016), além do contato direto com tecidos animais infectados e inalação de aerossóis que contêm o patógeno (Pappas,

Akritidis, Bosilkovski, & Tsianos, 2005). A contaminação de pesquisadores, agropecuaristas, açougueiros, trabalhadores de matadouros e médicos veterinários pode ocorrer em ambiente laboratorial e ocupacional (Seleem, Boyle, & Sriranganathan, 2010, Singh, 2009). A brucelose é reconhecida como a infecção mais comum adquirida em laboratórios (Singh, 2009), isso porque a dose infecciosa é baixa,  $\leq 10^2$  células bacterianas por aerossol ou rota subcutânea (Hull & Schumaker, 2018, Mense, Borschel, Wilhelmsen, Pitt, & Hoover, 2004). Em seres humanos, a alta incidência de Brucelose é atualmente encontrada em regiões da África, Ásia, América Latina e Oriente Médio (Franc, Krecek, Hasler, & Arenas-Gamboa, 2018).

**Tabela 2. O gênero *Brucella* abrange doze espécies identificadas e nomeadas que diferem em relação à preferência pelo hospedeiro natural e ao potencial zoonótico.**

Espécies	Hospedeiro natural preferencial	Potencial zoonótico
<i>B. melitensis</i>	ovelhas, cabras e camelos	Sim – elevado
<i>B. abortus</i>	bovinos, alces e búfalos	Sim – elevado
<i>B. suis</i>	porcos, lebres, e renas	Sim – elevado
<i>B. canis</i>	cães doméstico e selvagem	Sim - moderado
<i>B. ovis</i>	ovelhas	Nenhuma infecção reportada
<i>B. neotomae</i>	ratos de madeira do deserto	Nenhuma infecção reportada
<i>B. ceti</i>	cetáceos	Sim – baixo
<i>B. pinnipedialis</i>	pinípedes	Sim – baixo
<i>B. microti</i>	raposas vermelhas e ratazanas	Nenhuma infecção reportada
<i>B. inopinata</i>	desconhecido	Sim - elevado
<i>B. papionis</i>	primatas não-humanos	Nenhuma infecção reportada
<i>B. vulpis</i>	raposa vermelha	Nenhuma infecção reportada

**Observação:** em destaque as espécies com potencial zoonótico mais elevado. Adaptado de (Hull & Schumaker, 2018).

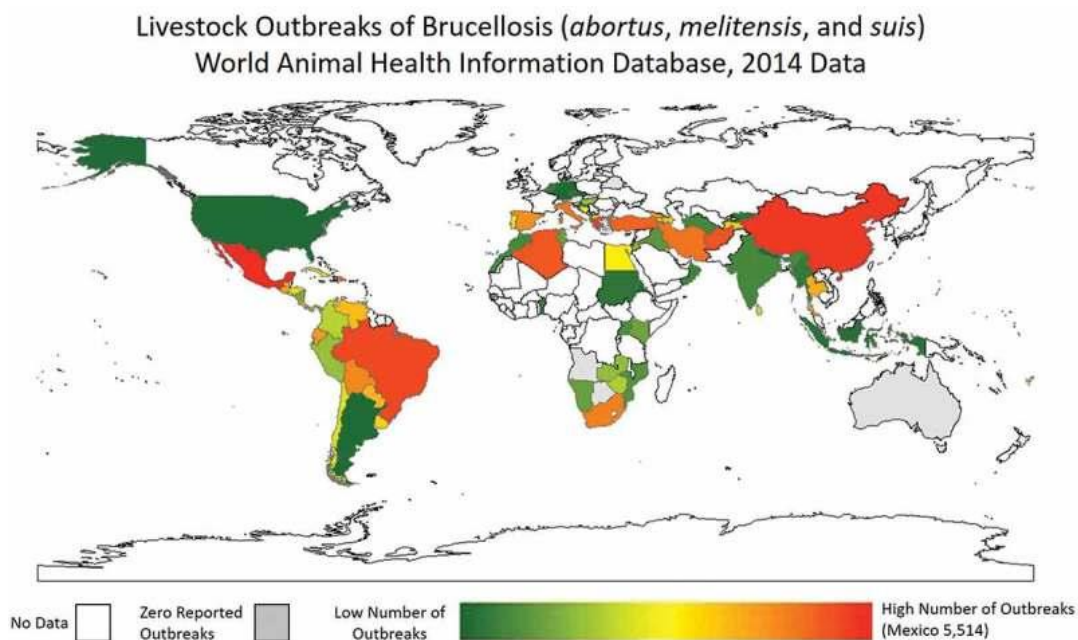
A Brucelose em humanos raramente é fatal, porém é uma doença severamente debilitante e incapacitante que apresenta tendência à cronicidade e persistência (Atluri *et al.*, 2011, WHO, 2006). Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, artralgia, suores, linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia. As manifestações osteoarticulares como artrite periférica, sacroiliíte e espongilite são as formas mais comuns localizadas da doença (Pappas *et al.*, 2005, Pourbagher *et al.*, 2006). Além disso, a Brucelose potencialmente pode causar diversas morbidades, dentre elas: febre ondulante provocada

devido a episódios de bacteremia seguido por novo foco de infecção, artrite, endocardite, osteomielite e complicações neurológicas (Baldi & Giambartolomei, 2013, Franc *et al.*, 2018). Pela diversidade de sintomas parecidos com outras patologias, a Brucelose é de difícil diagnóstico (WHO, 2006). É suposto que a incidência de Brucelose seja cinco vezes superior aos dados oficiais, principalmente devido ao não diagnóstico e ao não cumprimento de notificação obrigatória (WHO, 2006). E, apesar de não haver uma vacina para seres humanos, o paciente acometido é submetido a regime de tratamento com antibióticos (WHO, 2006). Por apresentar dificuldade de detecção, fácil disseminação e patogênese prolongada, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) Norte-americano classificou o gênero *Brucella* como categoria B, o que significa se tratar de organismos com risco de uso como arma biológica e bioterrorismo (Sarkar-Tyson & Atkins, 2011).

No Brasil, a brucelose bovina ocasionada pela *B. abortus* está amplamente distribuída por todo território e é responsável pela redução de rebanhos (Ministério da Agricultura, 2006). Essa redução está vinculada ao tropismo por órgãos reprodutivos do animal (Anderson, Meador, & Cheville, 1986), levando ao aborto espontâneo em ruminantes, uma marca da infecção (Olsen & Palmer, 2014), e ao possível quadro de esterilidade permanente em uma de cada cinco fêmeas infectadas (Ministério da Agricultura, 2006). Os tecidos fetais e placentários associados aos fluidos expelidos nos eventos de aborto é a principal rota de transmissão entre a população animal (Franc *et al.*, 2018, Poester, Samartino, & Santos, 2013). Além disso, o reservatório animal da doença é globalmente negligenciado (Hull & Schumaker, 2018). A infecção por *B. abortus* promove redução na produção de leite e carne (Ministério da Agricultura, 2006), além do impedimento desses produtos pelas barreiras sanitárias do mercado internacional, o que gera o prejuízo de milhões de dólares ao ano para a economia brasileira (Poester, Goncalves, & Lage, 2002).

De acordo com a WHO, a brucelose é a zoonose mais difundida e uma das doenças mais negligenciadas no mundo (WHO, 2006). O banco de dados *World Animal Health Information Database Interface* (WAHIS) dispõe de dados compilados sobre a incidência de brucelose animal originada por *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* no mundo. Entretanto, esses dados ficam comprometidos por serem adquiridos de relatórios voluntários realizados pela *World Animal Health Organization* (OIE) e por existir maior notificação em países que apresentam melhores recursos para a vigilância sanitária. A compilação completa de informações mais recentes é a referente ao ano de 2014. Neste documento,

o Brasil apresentou 1.142 casos de surtos de *B. abortus* (**Figura 4**). O México é o país com mais casos de surtos notificados, no total 5.514, dentre eles 5.174 originados por *B. abortus* e 340 por *B. melitensis* (Hull & Schumaker, 2018).



**Figura 4.** A brucelose animal é uma doença amplamente distribuída no mundo, com alta incidência de infecção por *B. abortus* no Brasil. Segundo os dados do *World Animal Health Information Database Interface*, o México é o país que mais registrou casos de surto de brucelose animal, o que totaliza 5.514 casos de surto registrados em 2014, sendo eles 5.174 originados por *B. abortus*, 340 por *B. melitensis* e 0 por *B. suis*. A China registrou um total de 2.138, sendo eles 2.126 originados por *B. abortus*, 0 por *B. melitensis* e 12 por *B. suis*. O Brasil registrou 1.142 casos, todos eles originados por *B. abortus* Fonte da imagem (Hull & Schumaker, 2018).

### 1.5 Interação entre *Brucella abortus* e o sistema imunológico do hospedeiro

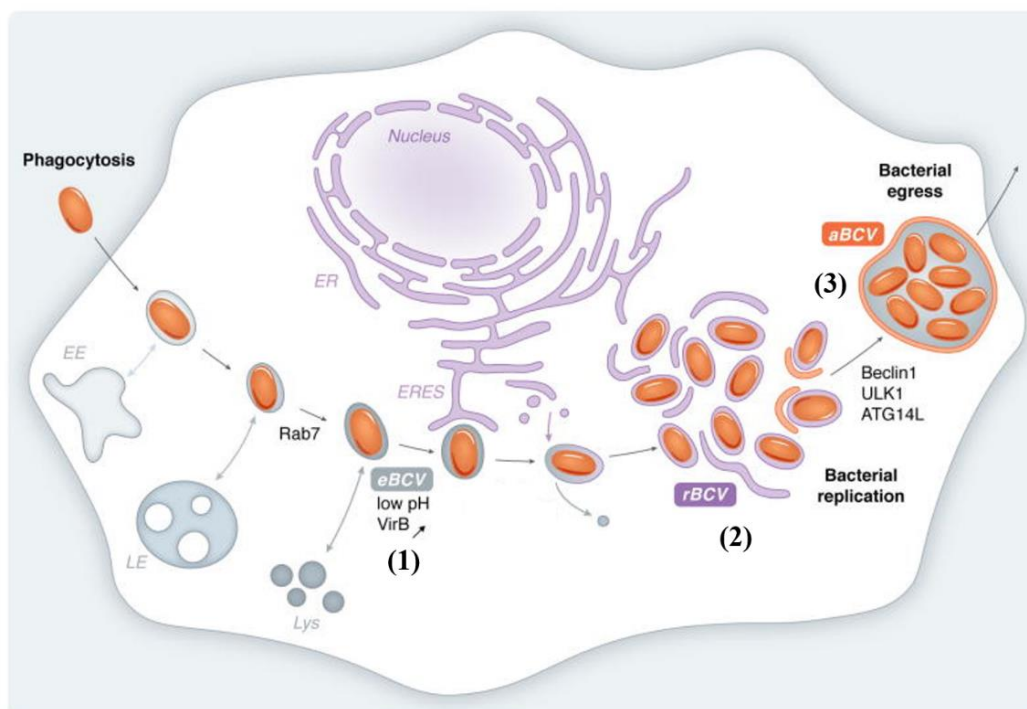
Nas etapas iniciais de infecção por *B. abortus*, mecanismos de evasão do sistema imunológico são imprescindíveis para patogênese da Brucelose. Tais mecanismos englobam a capacidade de sobreviver e proliferar dentro de fagócitos, como células dendríticas (DCs) e macrófagos, estes últimos considerados o melhor nicho replicativo para estas bactérias (Archambaud *et al.*, 2010, Celli, 2015). Uma vez fagocitada, *B. abortus* é envolta por um vacúolo de membrana dupla, conhecido como vacúolo contendo *Brucella* (BCV). Dentro do BCV, a *B. abortus* é capaz de alterar a rota natural intracelular de degradação e estruturar seu nicho replicativo (Celli, 2015). No seu processo intracelular de estabelecimento e crescimento existem sucessivas alterações moleculares

no BCV, que ocorrem mediante à interação do vacúolo com diferentes rotas celulares: eBCVs (BCV endossomal), rBCV (BCV replicativo) e por fim aBCV (BCV relacionado à autofagia) (**Figura 5**) (Celli, 2015, Comerci, Martinez-Lorenzo, Sieira, Gorvel, & Ugalde, 2001, Starr, Ng, Wehrly, Knodler, & Celli, 2008).

Inicialmente, este vacúolo interage com a via endocítica (eBCV) e adquire moléculas características de endossomos iniciais, que posteriormente darão lugar à presença de marcadores de endossomos tardios (Bellaire, Roop, & Cardelli, 2005, Celli *et al.*, 2003, Starr *et al.*, 2008). Concomitantemente a este processo, a rápida acidificação do vacúolo ocorre devido à fusão controlada com lisossomos (Starr *et al.*, 2008). Apesar da acidificação resultar em morte de grande parcela de bactérias, ela é essencial para a expressão do seu maior determinante de virulência – o sistema de secreção do tipo IV *virB* (T4SS), responsável pela injeção de efetores no citoplasma celular (Boschiroli *et al.*, 2002, Celli, 2015, Celli *et al.*, 2003). O T4SS modula as funções do hospedeiro envolvidas na via secretória primária, permitindo a biogênese do rBCV através da fusão do eBCV maduro com cisternas do ER (ERES) (Celli *et al.*, 2003, Celli, Salcedo, & Gorvel, 2005, Starr *et al.*, 2008). A extensa replicação dessas bactérias é iniciada no rBCV e seguida pelo englobamento dos rBCVs em estruturas multimembranares semelhantes aos autofagossomos (aBCV) (Starr *et al.*, 2012). Esse processo de conversão do rBCV em aBCV envolve as proteínas de iniciação autofágica Beclin1, ULK1 e ATG14L (Celli, 2015). O aBCV é importante na liberação da *B. abortus* da célula do hospedeiro após a sua multiplicação e, portanto, fundamental na conclusão do ciclo intracelular da bactéria (Starr *et al.*, 2012). A sobrevivência e o crescimento da *B. abortus* dentro de fagócitos profissionais resulta na disseminação sistêmica desse patógeno, o qual posteriormente infecta outras células da linhagem mieloide como macrófagos do fígado e do baço, nos quais pode persistir em lesões granulomatosas (Atluri *et al.*, 2011).

Na superfície celular da *B. abortus* estão presentes moléculas que são fatores essenciais para a sua patogenicidade. Uma delas é o LPS não-usual apresentado por cepas lisas e virulentas (Sangari & Agüero, 1996). A porção do lipídeo A dessa molécula apresenta cadeias mais longas, o que diminui suas propriedades endotóxicas, visto que essas cadeias longas não são eficientemente reconhecidas por TLR4 (Tsolis, Young, Solnick, & Baumler, 2008). Diferente de outras endotoxinas, o LPS de *Brucella* não é pirogênico e falha em ativar o complemento. Além disso, são necessárias concentrações 100 vezes maiores de LPS de *Brucella* para levar o hospedeiro a óbito, quando comparado ao LPS de enterobactérias (Giambartolomei *et al.*, 2004). Dessa forma, as peculiaridades

do LPS de *B. abortus* podem representar uma estratégia de evasão do sistema imune por essa bactéria (Tsolis *et al.*, 2008).



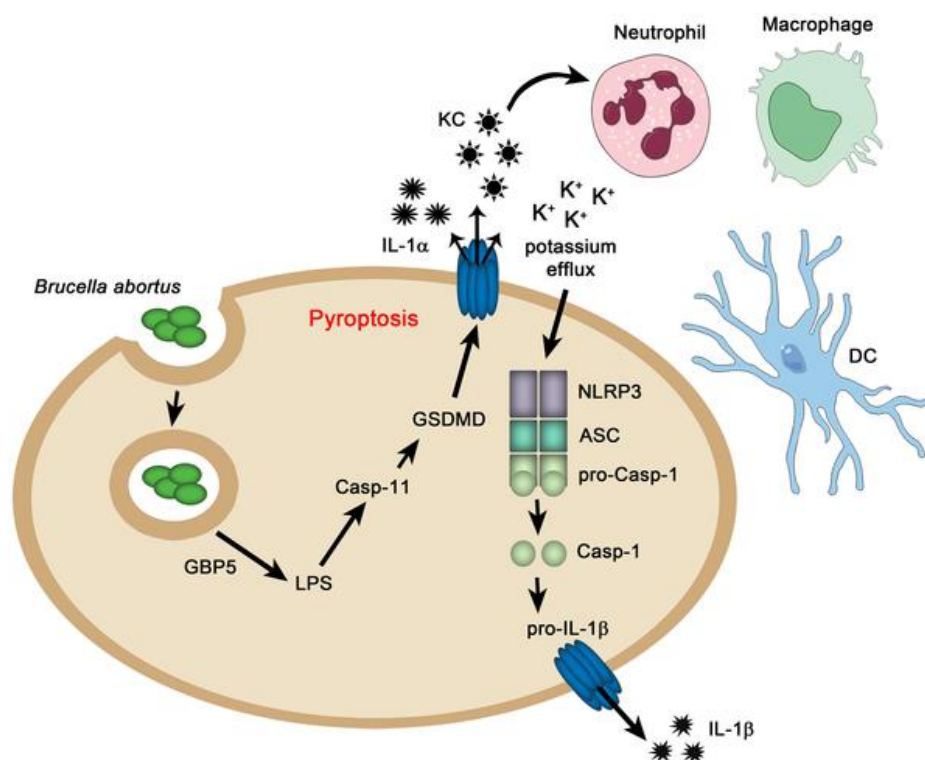
**Figura 5. Subversão de vias intracelulares do hospedeiro para origem do nicho replicativo da *Brucella abortus* no interior de macrófagos e posterior egresso para disseminação em células vizinhas.** A *Brucella abortus* no ambiente intracelular interage com as rotas naturais de degradação. A capacidade de usufruir de mecanismos do hospedeiro sustenta a sua permanência. A acidificação do endossomo tardio ativa a expressão do seu maior fator de virulência: o sistema de secreção do tipo IV *virB* (T4SS) (1). O T4SS é um mecanismo de evasão essencial para *Brucella*, que permite sua intensa replicação após fusão de eBCVs com as cisternas do ER (rBCV) (2). Após intensa replicação nessa organela, a *Brucella* utiliza proteínas da via autofágica (Beclin 1, ULK1 e ATG14L) como subsídio para seu egresso de uma célula (3), para então infecção de uma outra vizinha. Adaptado de (Celli, 2015).

Outra classe de molécula pertencente à *B. abortus* são as lipoproteínas de membrana externa (Omp - *outer membrane proteins*), como as Omp16 e Omp19, que são capazes de se ligar aos receptores TLR2 e TLR4, e desencadear a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-10, fator importante para o controle inicial da infecção (Giambartolomei *et al.*, 2004, Pasquevich *et al.*, 2010). Além de modular o sistema imune inato do hospedeiro, a *B. abortus* apresenta capacidade de interferir no papel da imunidade adaptativa e, portanto, persiste e estabelece infecção crônica (Barrionuevo & Giambartolomei, 2019). Após a apresentação de antígenos para células TCD4<sup>+</sup> mediado por DCs, esses linfócitos migram para órgãos alvos, porém não conseguem erradicar a *Brucella* do organismo (Barrionuevo & Giambartolomei, 2019). A permanência da

*Brucella* no hospedeiro pode ser parcialmente atribuída ao seu potencial em diminuir a expressão de MHC-II induzido por IFN- $\gamma$ , o que interfere no processamento e na apresentação de antígenos pela linhagem monócitos/macrófagos para linfócitos TCD4<sup>+</sup> (Barrionuevo & Giambartolomei, 2019, Velasquez *et al.*, 2017). A inibição da expressão do MHC-II na infecção por *B. abortus* é dependente da ligação prolongada do inibidor-chave desse processo – Omp19 - ao receptor TLR2 e pode ser observada de 12 a 48 horas após infecção (Barrionuevo *et al.*, 2008, Velasquez *et al.*, 2017). Além disso, a *B. abortus* pode inibir a apresentação de antígenos pelo MHC-II através do seu LPS não-canônico que é capaz de formar macrodomínios na membrana plasmática de APCs (Forestier, Deleuil, Lapaque, Moreno, & Gorvel, 2000). Esses mecanismos que envolvem o escape intracelular de macrófagos, têm impacto significativo na alteração da resposta imune adaptativa em pacientes com Brucelose (Barrionuevo *et al.*, 2008).

Os inflamassomas representam um grupo de PRRs que atuam como complexos citoplasmáticos multiproteicos sensores de PAMPs e DAMPs. Essas plataformas multiproteicas controlam a ativação da enzima proteolítica caspase-1. Em última análise, a caspase-1 é responsável pela maturação das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-18 (IL-18) (Latz, Xiao, & Stutz, 2013). Dois sinais são necessários para a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18. O primeiro sinal regula a expressão dos componentes do inflamassoma, assim como a síntese de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18. O segundo sinal promove a montagem e ativação do inflamassoma (Jo, Kim, Shin, & Sasakawa, 2016). Uma vez ativados, os inflamassomas recrutam a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD*), que atua como uma ponte molecular entre os inflamassomas ativados e a proteína efetora pró-caspase-1. O recrutamento de pró-caspase-1 desencadeia a sua auto-catálise em caspase-1 (Hoss, Rodriguez-Alcazar, & Latz, 2017). Recentemente, foi elucidado em nosso laboratório a ativação do inflamassoma NLRP3 através da via não-canônica dependente de caspase-11 na infecção por *B. abortus*. O LPS não-canônico de *B. abortus* escapa da vigilância da superfície celular por TLR4, entretanto no citosol ele é reconhecido por meio da caspase-11. O nosso grupo demonstrou que caspase-11 reconhece o LPS de *B. abortus* e ativa a piroptose em macrófagos com auxílio das proteínas ligadoras de guanilato GBP4 e GBP5, que contribuem por se associar aos BCVs e atuar no rompimento do vacúolo e liberação de PAMPs para o citoplasma (**Figura 6**) (Cerqueira *et al.*, 2018, M. T. R. Gomes, Cerqueira, Guimaraes, Campos, & Oliveira, 2019). Após clivagem da Gasdermina-D (GSDMD) pela caspase-11 ativada pelo LPS, a subunidade N-terminal oligomeriza para formação

de poros na membrana celular, através dos quais ocorre o efluxo de  $K^+$ . O efluxo de  $K^+$  ativa o inflamassoma NLRP3, o que desencadeia o recrutamento e ativação de caspase-1, e então a produção e liberação de  $IL-1\beta$  (Cerqueira *et al.*, 2018, M. T. R. Gomes *et al.*, 2019). A piroptose leva à secreção de  $IL-1\beta$ ,  $IL-1\alpha$  e eicosanóides, moléculas que possuem papel no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, promovendo a fagocitose de células infectadas e contribuindo para o controle da infecção (Jorgensen, Lopez, Laufer, & Miao, 2016).



**Figura 6.** A ativação de caspase-11 por meio do LPS de *B. abortus* culmina em piroptose e efluxo de  $K^+$ , este último responsável pela ativação não-canônica do inflamassoma de NLRP3. Após ser fagocitada, a *B. abortus* se estabelece no interior do BCV. Com auxílio das GBP4 e GBP5, o LPS é liberado no ambiente citoplasmático e ativa caspase-11. Em seguida, caspase-11 cliva GSDMD e a porção N-terminal desta molécula oligomeriza e forma poros na membrana plasmática por meio dos quais há o efluxo de potássio. O efluxo de potássio ativa NLRP3. Portanto, a produção de  $IL-1\beta$  pelo inflamassoma NLRP3 na infecção por *B. abortus* é decorrente da ativação não-canônica. Fonte da imagem (Cerqueira *et al.*, 2018).

Diante do exposto, torna-se evidente que a *B. abortus* possui mecanismos eficientes de subversão do sistema imune inato e adaptativo. Uma vez que a linhagem monócitos/macrófagos é o principal nicho replicativo dessas bactérias, acreditamos que a Imunidade Treinada induzida por BCG em macrófagos possa potencializar mecanismos de controle contra a infecção por *B. abortus*. A hipótese desse trabalho é que a BCG

Moreau seja capaz de induzir Imunidade Treinada a partir de células da medula óssea para originar macrófagos que apresentem características transcricionais e funcionais intensificadas e por conseguinte seja capaz de controlar com eficiência a infecção por *B. abortus*.

## 2. JUSTIFICATIVA

A Imunidade Treinada induzida na linhagem monócitos/macrófagos é um fenômeno que está sendo elucidado na literatura no decorrer dos últimos anos. As bases moleculares são foco de intensa pesquisa, mas há visível importância do eixo reprogramação imunometabólica/reprogramação epigenética. Somado a isso, a Brucelose é uma zoonose difundida mundialmente e negligenciada, que acomete a saúde humana e animal. Além da possível contaminação dos consumidores de produtos de origem animal, a Brucelose pode causar perda da produtividade em rebanhos bovinos e tornar a carne, leite e seus derivados vulneráveis às barreiras sanitárias no mercado internacional. A Brucelose animal resulta numa perda econômica anual de aproximadamente 32 milhões de dólares para a economia brasileira (Poester *et al.*, 2002). Embora pouco reportada, a Brucelose no Brasil representa um problema de saúde pública devido aos custos de tratamento e ao impacto social, que pode levar à incapacidade dos pacientes acometidos, à redução da qualidade de vida e em menor frequência ao óbito.

A elucidação dos possíveis efeitos protetores desencadeados pela Imunidade Treinada da linhagem monócitos/macrófagos que resultem no controle da Brucelose é de fundamental importância para que novas estratégias profiláticas e terapêuticas possam ser desenvolvidas. Os Macrófagos Treinados por meio do BCG Moreau (cepa vacinal utilizada no Brasil) podem resultar em um maior controle intracelular da carga bacteriana, contribuir para resposta mais eficaz por meio da maior produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e impactar na melhora da comunicação entre sistema imune inato e sistema imune adaptativo por meio do aumento da expressão de moléculas coestimuladoras. A Imunidade Treinada representa uma nova abordagem na perspectiva de memória imunológica e o entendimento deste mecanismo pode contribuir para aplicações futuras, como, por exemplo, na tecnologia do desenvolvimento de vacinas que atualmente é baseada apenas na memória imune clássica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar os mecanismos de proteção mediados pela Imunidade Treinada induzida pela cepa vacinal BCG contra a infecção pela bactéria patogênica *B. abortus*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

A fim de atingir o objetivo geral proposto foram executados os seguintes objetivos específicos:

- (i) Estabelecer protocolos para investigação da Imunidade Treinada induzida pelo BCG *in vivo*;
- (ii) Avaliar a sobrevivência de camundongos com ausência de imunidade adaptativa (RAG<sup>-/-</sup>) vacinados ou não-vacinados com o BCG e posteriormente desafiados pela *B. abortus*;
- (iii) Analisar os parâmetros imunológicos de camundongos C57BL/6 e RAG<sup>-/-</sup> vacinados ou não-vacinados com BCG e posteriormente desafiados pela *B. abortus*, através da mensuração do peso relativo dos órgãos e contagem das unidades formadoras de colônia;
- (iv) Avaliar a responsividade de macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos C57BL/6 treinados ou não-treinados por BCG *in vivo* e desafiados pela *B. abortus in vitro* por meio da mensuração de citocinas pró-inflamatórias, expressão de moléculas coestimuladoras e capacidade de controle da carga bacteriana;
- (v) Comparar, entre células da medula óssea provenientes de camundongos treinados ou não-treinados, e entre macrófagos treinados e macrófagos não-treinados pelo BCG, o nível de transcritos do gene do receptor NLRP3 e o nível de expressão gênica do complexo mTORC1.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais e grupos experimentais

Camundongos C57BL/6 deficientes para a enzima RAG-1 e, portanto, desprovidos de imunidade adaptativa (RAG<sup>-/-</sup>) e C57BL/6 (WT), fêmeas e machos, com idade entre 6 e 8 semanas foram utilizados nos experimentos, sendo mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB/UFMG em condições livres de patógenos específicos (SPF), com livre acesso a alimento. Os procedimentos para experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais - CEUA/UFMG sob número de protocolo 45/2018.

Os animais utilizados foram aleatoriamente designados para grupos experimentais estabelecidos: grupo imunizado, o qual recebeu uma imunização com a bactéria da espécie *Mycobacterium bovis* BCG cepa vacinal Moreau; grupo desafiado, o qual recebeu o desafio com a bactéria da espécie *Brucella abortus* cepa virulenta 2308 e grupo imunizado/desafiado, o qual recebeu ambos, uma imunização prévia com *Mycobacterium bovis* BCG e o desafio posterior com *Brucella abortus*.

### 4.2 Bactérias

*Mycobacterium bovis* BCG da cepa Moreau foram crescidas em meio líquido Difco™ Middlebrook 7H9 (BD Biosciences) suplementado com 10% OADC (do inglês *oleic acid-albumin-dextrose-catalase*) até a fase de crescimento exponencial (21 dias). A cultura foi então lavada em água de injeção, coletada por centrifugação 15 minutos, 4000 rpm a 4°C, suspendida em glicerol 10% e estocada a -80 °C. Para quantificação do estoque, alíquotas foram serialmente diluídas em solução aquosa contendo 0,05% de Tween 80, plaqueadas em meio Difco™ Middlebrook 7H11 (BD Biosciences) e incubadas a 37°C durante 21-35 dias. Após incubação foi contado o número de unidades formadoras de colônia (CFUs).

*Brucella abortus* da cepa S2308 foram crescidas em meio BB (*Brucella Broth*) (BD Biosciences) por 72 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. A cultura foi então lavada em

PBS, coletada por centrifugação 10 minutos, 4800 rpm a 4°C, suspendidas em PBS:glicerol na proporção de 9:1 e estocadas a -80°C. Para quantificação do estoque, alíquotas foram serialmente diluídas em solução salina, plaqueadas em meio BB ágar e incubadas a 37°C durante 3 dias. Após incubação foi contado o número de CFUs.

### **4.3 Indução de Imunidade Treinada *in vivo***

#### **4.3.1 Indução de Imunidade Treinada com BCG *in vivo***

Para indução de Imunidade Treinada *in vivo*, camundongos C57BL/6 e RAG<sup>-/-</sup>, previamente anestesiados com 2% xilazina e 5% quetamina diluídos em solução 0.9% NaCl na proporção de 1:3:8, foram submetidos a uma imunização com 1x10<sup>6</sup> CFUs de BCG Moreau diluídas em 200 µL de solução salina pela via intravenosa.

#### **4.3.2 Indução de Imunidade Treinada com BCG *in vivo* seguido por tratamento com antibióticos INH/RIF**

A indução de Imunidade Treinada *in vivo* foi conduzida da mesma forma como descrito em 4.3.1. Além disso, após 30 dias de imunização com BCG Moreau, os camundongos foram submetidos a um regime de tratamento por via oral com dois antibióticos eficazes contra *Mycobacterium*. Isoniazida (INH) e Rifampicina (RIF) foram diluídos em água para ingestão (100 mg/L) e fornecidos *ad libitum*. Esse período de tratamento com antibióticos perdurou 30 dias e foi sucedido pelo retorno da ingestão de água pura por esses camundongos durante 15 dias (período de *wash out*). Como controle interno do experimento, 1x10<sup>6</sup> células da medula óssea foram diluídas serialmente em solução aquosa contendo 0,05% de Tween 80 para posterior plaqueio em meio sólido seletivo para BCG Difco™ Middlebrook 7H11 (BD Biosciences).

### **4.4 Análise da sobrevida**

Após 14 dias de indução de Imunidade Treinada *in vivo*, camundongos RAG<sup>-/-</sup> foram desafiados pela via intraperitoneal com dose elevada de *Brucella abortus* cepa S2308 (1x10<sup>8</sup>, 5x10<sup>8</sup> ou 1x10<sup>9</sup> CFUs/animal) diluída em 100 µL de solução salina. Os

animais foram monitorados acerca da sobrevivência e em relação ao ganho ou perda de peso relativo. Aqueles que apresentaram perda de peso equivalente a 20% do peso inicial foram sacrificados.

#### **4.5 Determinação do número de unidades formadoras de colônia e mensuração do peso relativo do baço e do fígado**

Após 30 dias de indução de Imunidade Treinada *in vivo*, camundongos RAG<sup>-/-</sup> e WT foram desafiados com  $1 \times 10^6$  CFUs de *Brucella abortus* S2308 diluídas em 100  $\mu$ L de solução salina pela via intraperitoneal. Os camundongos foram pesados e subseqüente ao sacrifício, o baço e o fígado foram coletados e pesados após 7 e 15 dias de infecção. O peso do baço e do fígado foi expresso como peso relativo do peso corporal total do animal (%BW). 1/3 do baço foi macerado e homogeneizado em solução salina (NaCl 0,9%) com o auxílio de pequenas telas de aço, para então serem diluídos serialmente. As diluições foram plaqueadas em meio BB ágar. As placas foram incubadas à 37°C e a contagem de CFUs foi realizada 3 dias após o plaqueamento com auxílio de uma lupa. Os resultados foram expressos como a média de CFUs por órgão.

#### **4.6 Geração e estimulação *in vitro* de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)**

Para obtenção de células da medula óssea, camundongos C57BL/6 (WT) foram sacrificados para extração dos fêmures e tíbias. A extremidade proximal e distal destes ossos foi seccionada e a medula foi lavada com 5 mL de salina fria por osso. A suspensão de células obtida foi então centrifugada a 600g por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi suspenso em meio para cultivo DMEM (GIBCO) suplementado com 10% de FBS (GIBCO) e as células foram submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 $\mu$ m (BD FALCON) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Logo em seguida, as células foram centrifugadas a 600g por 10 minutos a 4°C, suspensas em 1 mL de DMEM suplementado e enumeradas em câmara de Neubauer.

As células extraídas da medula foram então diferenciadas em macrófagos semeando cerca de  $1 \times 10^7$  células em 10mL de meio em placas de petri. As células foram mantidas

em DMEM (GIBCO) suplementado com 10% de FBS (GIBCO), 1% de HEPES 1M (GIBCO), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e 20% de LCCM (do inglês *L929 cell conditioned medium*), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos). As placas foram então incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Quatro dias após o plaqueamento inicial, foram adicionados 10mL de meio suplementado novo, e no sétimo dia de cultura as células já estão completamente diferenciadas em macrófagos e prontas para uso.

BMDMs foram cultivados na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 wells com fundo em U (NUNC) ou na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 wells. Em seguida, foram estimulados com *B. abortus* S2308 (MOI 100) por 24 horas. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo e as estimuladas com LPS de *E. coli* (1 µg/mL) por 24 horas ou LPS de *E. coli* (1 µg/mL) por 4 horas seguido de nigericina serviram como controle positivo. Após estímulos *in vitro* os macrófagos foram incubados a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.7 Dosagem de citocinas

Macrófagos gerados *in vitro* após protocolos de indução de Imunidade Treinada foram cultivados em placas de 96 poços e estimulados conforme descrito acima. As dosagens de IL-1β, IL-6 e TNF-α foram realizadas nos sobrenadantes das culturas celulares por método de ELISA do tipo sanduíche utilizando kit comercial (R&D Systems) de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.8 Análise por Citometria de fluxo

Macrófagos gerados *in vitro* após protocolos de indução de Imunidade Treinada foram cultivados em placas de 96 poços e estimulados conforme descrito acima. Posteriormente, as células foram submetidas a um protocolo de marcação para citometria de fluxo. Para tal, as células foram centrifugadas a 600 g durante 7 min a 4°C e lavadas com PBS. As células foram então incubadas com anti-CD16/CD32 (FcBlock;1:50) diluído em FACS buffer (PBS/BSA 0,25%) durante 20 min a 4°C. Em seguida, as células

foram centrifugadas, lavadas e então incubadas durante 20 min a 4°C com os seguintes marcadores de superfície: anti-F4/80 murino conjugado com biotina (clone BM8; 1:200); anti-CD11b murino conjugado com APC-Cy7 (clone M1/70; 1:200); anti-CD40 murino conjugado com PE (clone 3/23; 1:200) e anti-MHC-II murino conjugado com APC (clone AF6-120.1; 1:500). Todos os anticorpos foram obtidos da BD Bioscience. As células foram centrifugadas e lavadas novamente e, quando necessário, foram incubadas com estreptavidina conjugada com PerCP-Cy5.5 (1:200; BD Bioscience) por 20 minutos a 4°C. Os controles de isotipos apropriados foram utilizados. Por fim, as células foram lavadas, suspensas em tampão PBS e avaliadas utilizando equipamento Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Cerca de 10.000 eventos foram coletados e os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA). A estratégia de *gating* utilizada foi a seguinte: macrófagos foram selecionados dentro dos eventos totais como uma população CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> duplo positiva. E então, a intensidade média de fluorescência ou as subpopulações CD40<sup>+</sup> ou MHC-II<sup>+</sup> foram analisadas.

#### 4.9 Cinética de infecção

Para análise da cinética de infecção, BMDMs foram cultivados na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços. No dia seguinte, BMDMs foram infectados com inóculo de *Brucella abortus* S2308 preparado a partir de 100 µL do estoque diluído em 10 mL de meio BB. As bactérias foram crescidas por 24 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. A OD do inóculo foi mensurada, sendo  $OD\ 1.0 = 3 \times 10^9$  *Brucella abortus*/mL. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas por 10 minutos, 4800 rpm a 4°C e suspensas em DMEM suplementado com 10% FBS e 1% HEPES.

BMDMs foram infectados com MOI 10:1 de *B. abortus* diluído em 300 µL de meio/poço durante 4 horas. Logo após infecção, as placas de cultura foram centrifugadas 600g durante 5 minutos, para que as bactérias entrassem em contato com os macrófagos. Ao término do período de infecção, os poços foram lavados 2 vezes com salina para retirada das bactérias não internalizadas e foi adicionado 1 mL/poço de DMEM suplementado com 10% FBS e 1% HEPES. As placas de cultura foram então incubadas à 37°C, sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. A capacidade dos macrófagos de limitar o crescimento intracelular bacteriano foi avaliado por até 48 horas após a infecção. Nos

períodos determinados (0, 24 e 48 horas) as células foram lisadas com água de injeção e diluídas serialmente em salina, para posterior plaqueio em meio BB ágar e avaliação do crescimento intracelular da bactéria através da contagem de CFUs.

#### 4.10 Análise do perfil transcricional por qPCR

##### 4.10.1 Extração de RNA

O procedimento de extração de RNA total foi conduzido por meio do uso de TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. O *pellet* foi suspendido em *nuclease free water* e a concentração do RNA foi dosada por meio do NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro.

##### 4.10.2 Síntese de cDNA

As reações foram preparadas de forma que cada uma contivesse 1 µg de RNA acrescidos de oligodT com concentração final de 0,125 µg/µL e *nuclease free water* q.s.p 8 µL. Em seguida as reações foram levadas ao termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) para hibridização. Após esta etapa, as reações foram acrescidas de dNTPs com concentração final de 0,625mM, Reverse Transcriptase Buffer 1X, DTT 0,01M, Reverse Transcriptase 0,1 U e *nuclease free water* q.s.p 20 µL. As reações foram novamente submetidas ao termociclador com programação de 42°C por 60 min, 70°C por 15 min. Foram preparadas como controle negativo reações sem transcriptase reversa. Os seguintes primers foram utilizados:

**Tabela 3. Iniciadores utilizados na amplificação gênica por qPCR em BMDMs.**

Gene	Primer	Sequência
<b>β-actina</b>	β-actina-Fw	5' -GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3'
	β-actina-Rv	5' -CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'
<b>NLRP3</b>	NLRP3-Fw	5' -TGC TCT TCA CTG CTA TCA AGC CCT-3'
	NLRP3-Rv	5' -ACA AGC CTT TGC TCC AGA CCC TAT-3'

#### 4.10.3 PCR em tempo real quantitativo

O PCR em tempo real quantitativo foi conduzido utilizando o agente intercalante SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), oligo-dT cDNA (diluídos 10x), 0,5 $\mu$ M de primers e *nuclease free water* q.s.p 10  $\mu$ L. A reação foi realizada em QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) usando os seguintes parâmetros: 60°C por 10min, 95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 1 min, e um estágio de dissociação de 95°C por 15s, 60°C por 1 min, 95°C por 15s, e 60°C por 15s. Os dados foram analisados usando o método  $\Delta\Delta C_T$  e foram apresentados como unidades de expressão relativa depois da normalização com o gene constitutivo. As análises foram feitas em triplicata.

#### 4.11 Western blot

BMDMs Treinados provenientes de camundongos C57BL/6 foram lavados e lisados utilizando M-PER *Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 1mM ortovanadato de sódio, 10 mM NaF e 1:100 de *protease inhibitor cocktail* (Sigma-Aldrich) e estocadas a -80°C. A concentração proteica do lisado celular foi determinada pelo ensaio de BCA. A mesma quantidade de proteína total (40  $\mu$ g) de cada amostra foram resolvidas em gel SDS-PAGE 10% e foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). As membranas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com TBS-T (TBS contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado) e incubadas overnight com anticorpo primário monoclonal anti-p-mTOR (clone D9C2; 1:1000) ou anti- $\beta$ -actina (clone 13E5; 1:5000) a 4°C. Ambos os anticorpos são provenientes da empresa Cell Signaling. Subsequentemente, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e incubadas por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente com anticorpo secundário IgG (anti-rabbit) 1:1000. As bandas proteicas foram visualizadas por meio de Luminol chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) em um Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K). A análise de densitometria foi efetuada por meio do software ImageJ.

#### 4.12 Análise estatística

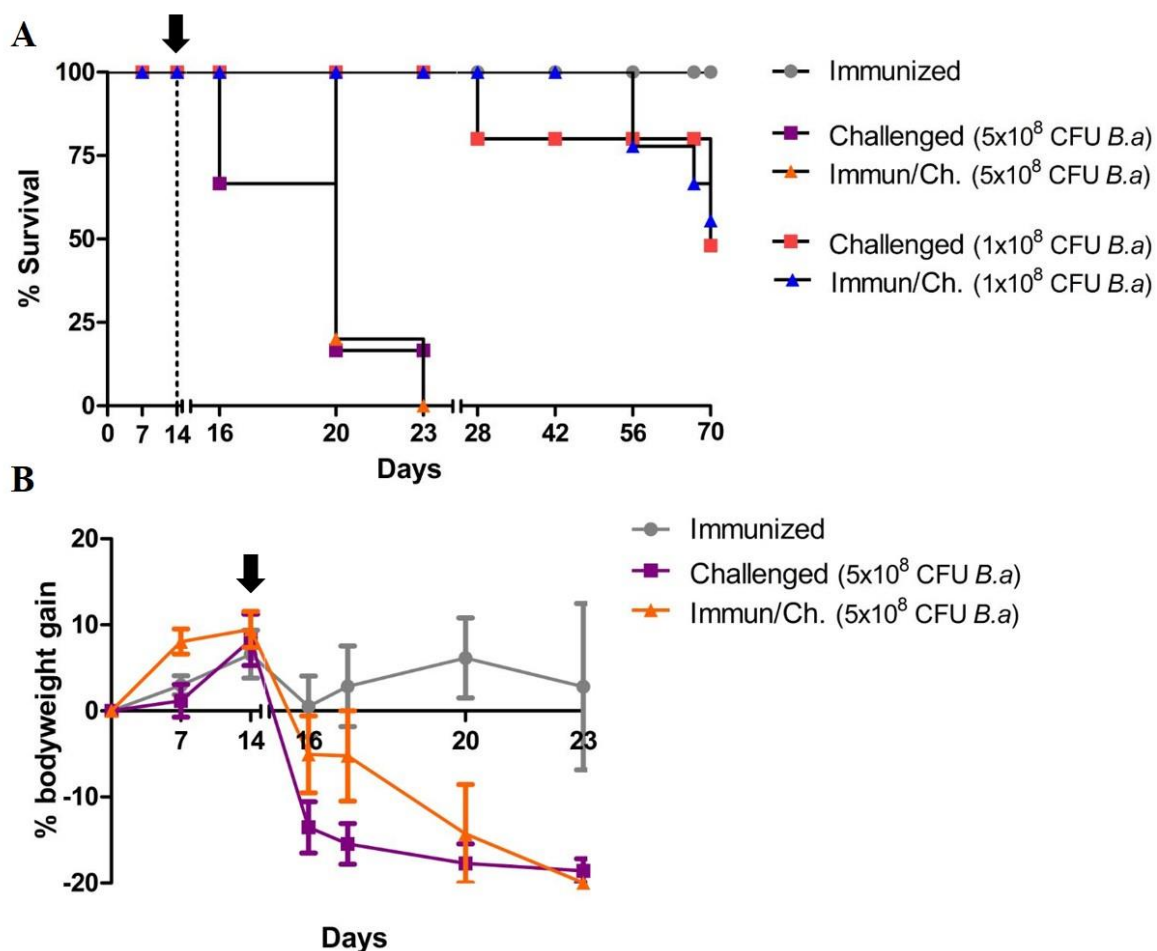
Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  DP. As diferenças estatísticas entre os resultados foram avaliadas através de two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni ( $p < 0.05$ ), one-way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) ou Teste T Student ( $p < 0.05$ ). Análises estatísticas foram conduzidas por meio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 A vacinação prévia com o BCG tem impacto na sobrevida de camundongos RAG<sup>-/-</sup> após desafio com a *Brucella abortus*

Uma das abordagens de verificação da proteção, mediante à prévia inoculação sistêmica ou local de indutores de Imunidade Treinada em camundongos, tem sido a comparação do percentual de sobrevida entre animais previamente inoculados e animais controle (Ciarlo *et al.*, 2019). A fim de avaliar se a vacinação prévia com BCG Moreau resulta em prolongamento da sobrevida após desafio com alta dose da *B. abortus*, a imunização de camundongos RAG<sup>-/-</sup> (deficientes para a enzima RAG-1 e, portanto, desprovidos de linfócitos T e B funcionais) foi conduzida com  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (CFU) de BCG Moreau/animal i.v. Após 14 dias, esses animais receberam doses elevadas da bactéria patogênica *Brucella abortus* S2308 i.p ( $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  ou  $1 \times 10^9$  CFU). Três grupos experimentais foram delineados: **grupo imunizado**, que recebeu uma imunização com BCG Moreau; **grupo desafiado**, que recebeu um desafio com *B. abortus* e **grupo imunizado/desafiado**, que recebeu uma imunização com BCG Moreau e após 14 dias recebeu um desafio com *B. abortus*.

Camundongos que foram previamente vacinados com o BCG e posteriormente foram desafiados com elevada dose da *B. abortus* de  $1 \times 10^8$  ou  $5 \times 10^8$  CFU/animal apresentaram atraso na mortalidade quando comparado aos camundongos que não receberam a vacinação (**Figura 7A**). A dose de  $1 \times 10^9$  CFU da *B. abortus* não foi uma dose ideal para observação do fenótipo, já que todos os camundongos pereceram rapidamente (dados não mostrados). Além disso, após desafio com a *B. abortus*, os camundongos foram acompanhados diariamente para avaliação da porcentagem de ganho de peso corpóreo. Corroborando com a sobrevida, os camundongos previamente vacinados e posteriormente desafiados com  $5 \times 10^8$  CFU da *B. abortus* apresentaram uma menor perda de peso entre 15 e 23 dias quando comparado aos camundongos que não receberam a vacinação (**Figura 7B**), intervalo dentro do qual foi possível observar, também, a diferença entre os grupos em relação à sobrevida. Um atraso na mortalidade dos animais RAG<sup>-/-</sup> previamente vacinados com o BCG foi observado, assim como a porcentagem de ganho de peso corpóreo foi maior para este grupo, o que sugere um papel protetor desencadeado pela vacinação com o BCG Moreau durante a fase inicial de infecção pela *B. abortus* em camundongos RAG<sup>-/-</sup>.

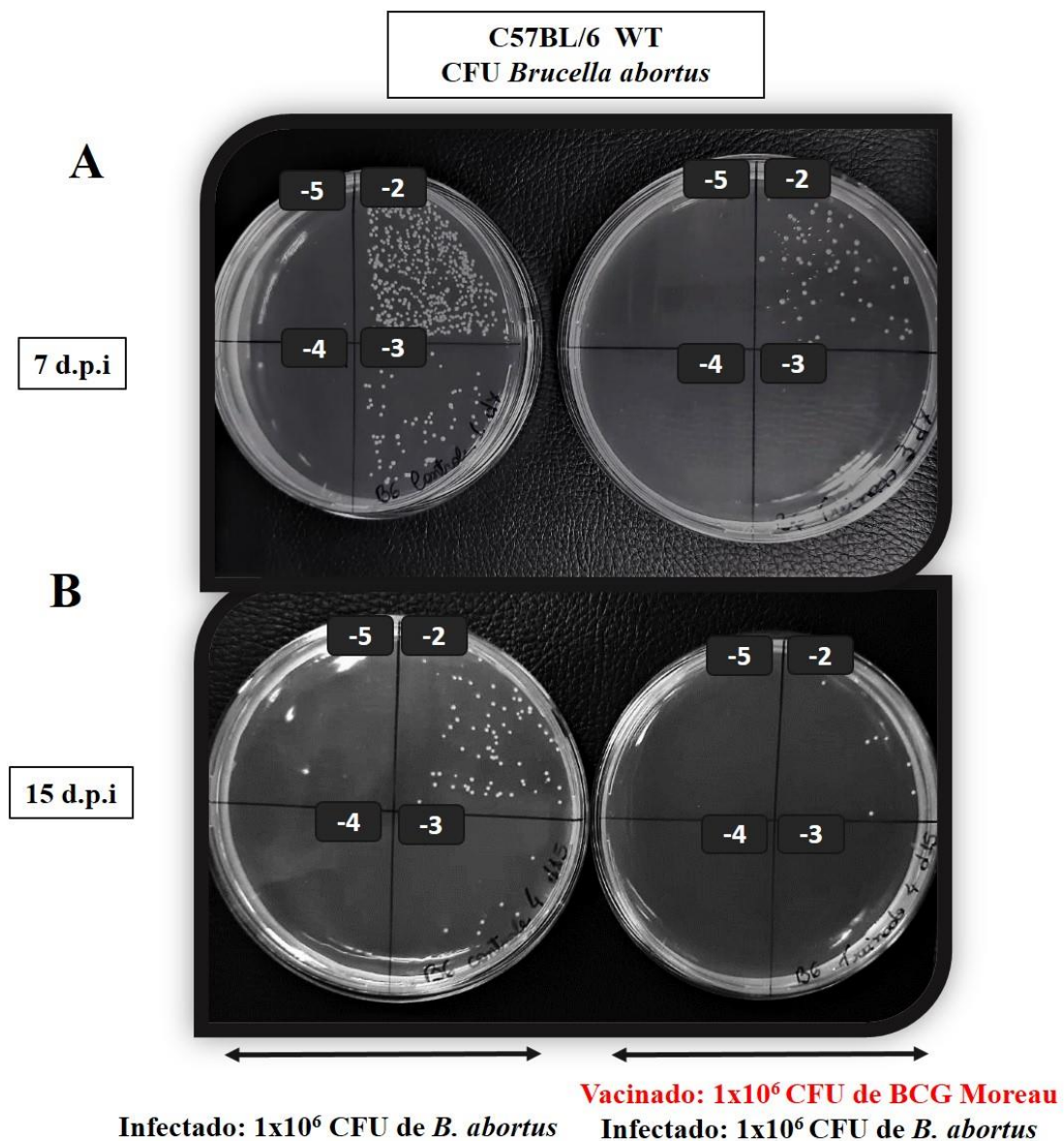


**Figura 7.** A vacinação prévia com BCG Moreau protege camundongos C57BL/6 RAG<sup>-/-</sup> contra a infecção pela bactéria patogênica *B. abortus* S2308. (A) Animais previamente vacinados com 1x10<sup>6</sup> CFU de BCG apresentaram atraso na mortalidade após desafio com dose elevada de 5x10<sup>8</sup> ou 1x10<sup>8</sup> CFU/animal de *B. abortus* quando comparado ao grupo não-vacinado. (B) Após desafio com 5x10<sup>8</sup> CFU/animal de *B. abortus*, o grupo previamente imunizado apresentou menor perda de peso. (Setas e pontilhado representam o dia referente ao desafio com *B. abortus*). *B.a*: *Brucella abortus*.

## 5.2 A vacinação prévia com BCG favorece o controle da carga bacteriana no baço de camundongos C57BL/6 e RAG<sup>-/-</sup> após infecção com *Brucella abortus* e reduz peso relativo de órgãos acometidos

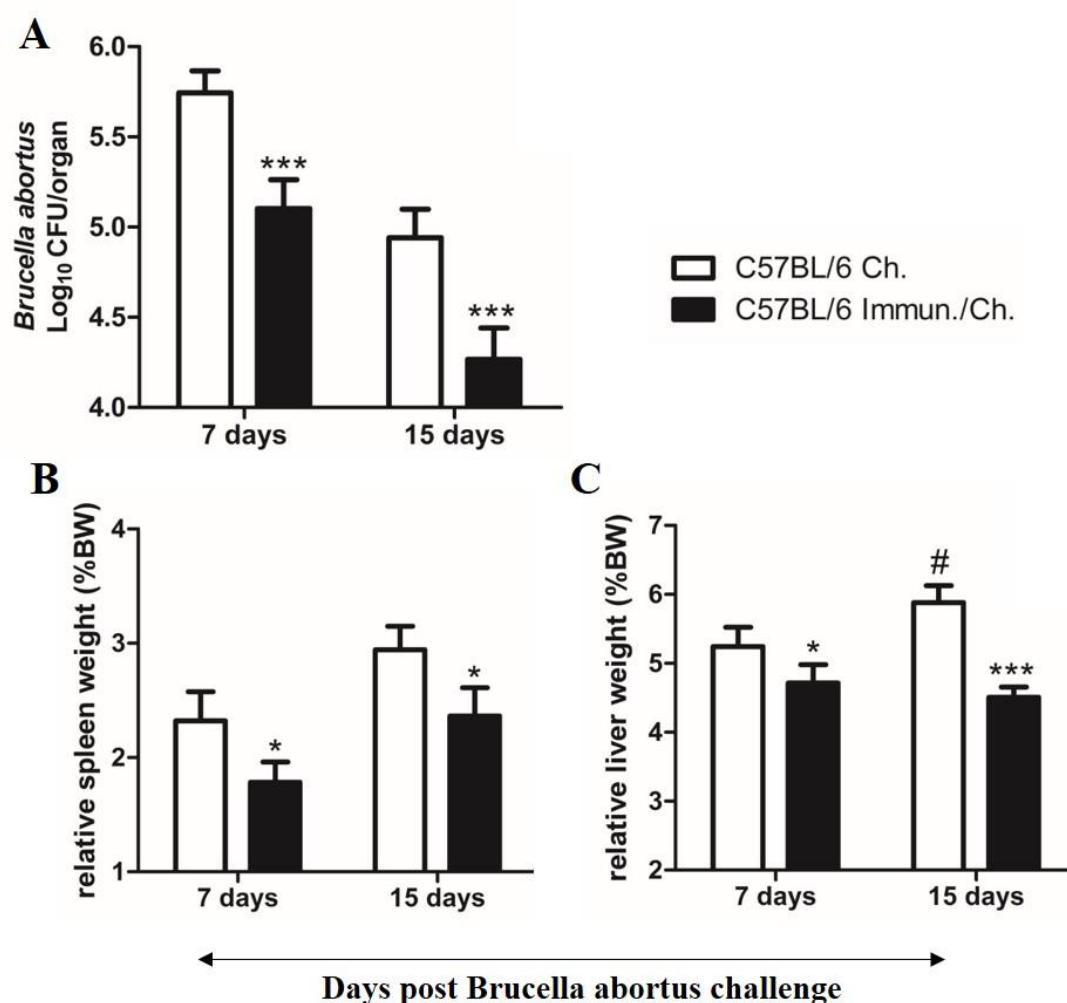
O pico da proliferação e diferenciação de HSCs em células da linhagem mieloide em resposta à vacinação com o BCG, ocorre após 30 dias de inoculação (Kaufmann *et al.*, 2018). Por essa razão, após 30 dias de vacinação com 1x10<sup>6</sup> CFU do BCG Moreau, camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1x10<sup>6</sup> CFU da *B. abortus*. A condução desse modelo experimental foi realizada com o intuito de observar se a ativação do sistema imune pelo BCG pode auxiliar no controle da infecção pela *B. abortus*. As

análises foram realizadas 7 e 15 dias após infecção (d.p.i) com a *B. abortus* para animais C57BL/6. Após 7 e 15 d.p.i com *B. abortus*, entre camundongos C57BL/6 vacinados com o BCG e não-vacinados, a diferença da carga bacteriana de *B. abortus* no baço foi notável em meio BB ágar (**Figura 8**). A posterior quantificação por meio da contagem de CFUs de *B. abortus* no baço confirmou diferença significativa de 0,6 log após 7 e 15 dias de infecção, com o grupo previamente vacinado apresentando menor quantidade de CFUs, o que evidencia o impacto da vacinação prévia no controle da infecção (**Figura 9 A**).



**Figura 8.** Carga bacteriana de *B. abortus* S2308 em meio BB ágar 7 e 15 d.p.i. (A e B) Placas com meio seletivo para *B. abortus* contendo as diluições (-2, -3, -4 e -5) do baço de animais C57BL/6 não-vacinados e vacinados com o BCG, 7 e 15 d.p.i, respectivamente.

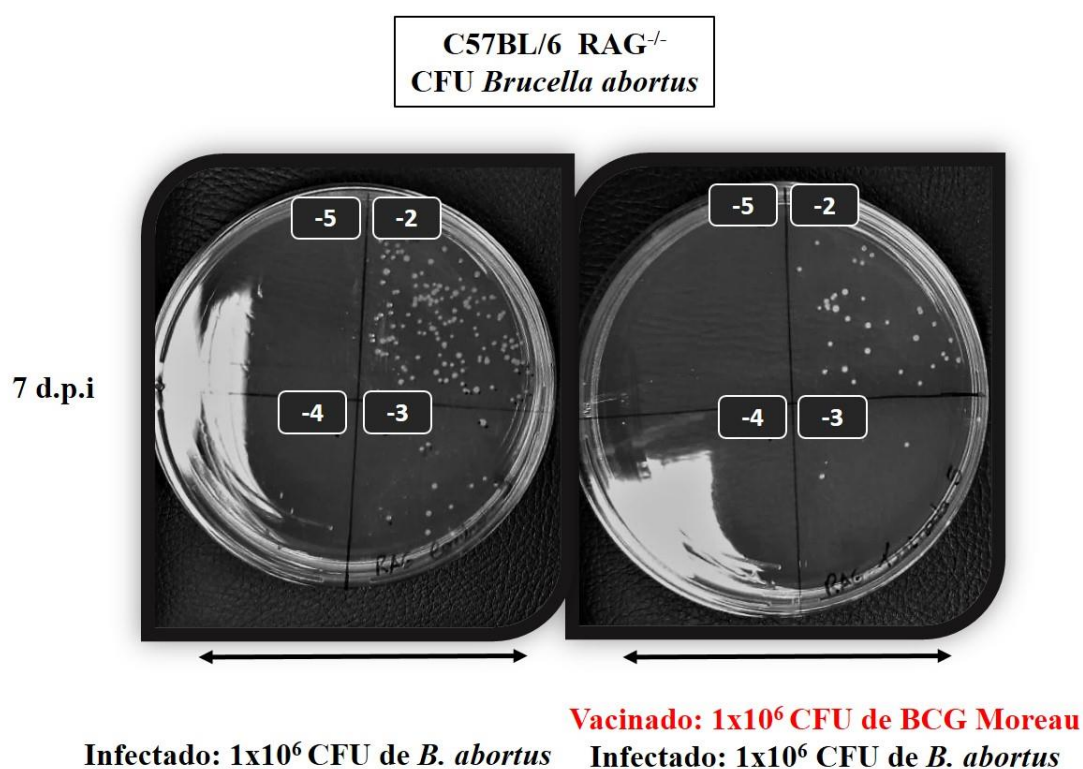
A *B. abortus* causa infecção sistêmica e dentre as alterações encontradas estão a esplenomegalia e a hepatomegalia (Pappas *et al.*, 2005, Pourbagher *et al.*, 2006). Após 7 e 15 dias de infecção com a *B. abortus*, o peso relativo do baço e do fígado em relação ao peso corporal do animal (% BW) foram mensurados. Camundongos C57BL/6 previamente imunizados com o BCG apresentaram baço e fígado significativamente menores quando comparado aos camundongos não imunizados nos dois tempos analisados (**Figura 9 B e C**).



**Figura 9.** Carga bacteriana de *B. abortus* no baço de animais C57BL/6 WT e peso relativo de órgãos acometidos pela *B. abortus* 7 e 15 d.p.i. (A) Carga bacteriana de *Brucella abortus* no baço. (B e C) Peso relativo do baço e do fígado em relação ao peso corporal (%BW), respectivamente. Comparação entre animais previamente vacinados com  $1 \times 10^6$  CFU de BCG Moreau e animais que não receberam a vacinação 7 e 15 d.p.i com a bactéria *B. abortus* S2308. Teste T \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao animal não vacinado no mesmo tempo de análise. #  $p < 0,05$  em relação ao animal não vacinado em tempos diferentes de análise. **Ch.**: desafiado com *Brucella abortus*; **Immun./Ch.**: vacinado com BCG e após 30 dias desafiado com *Brucella abortus*.

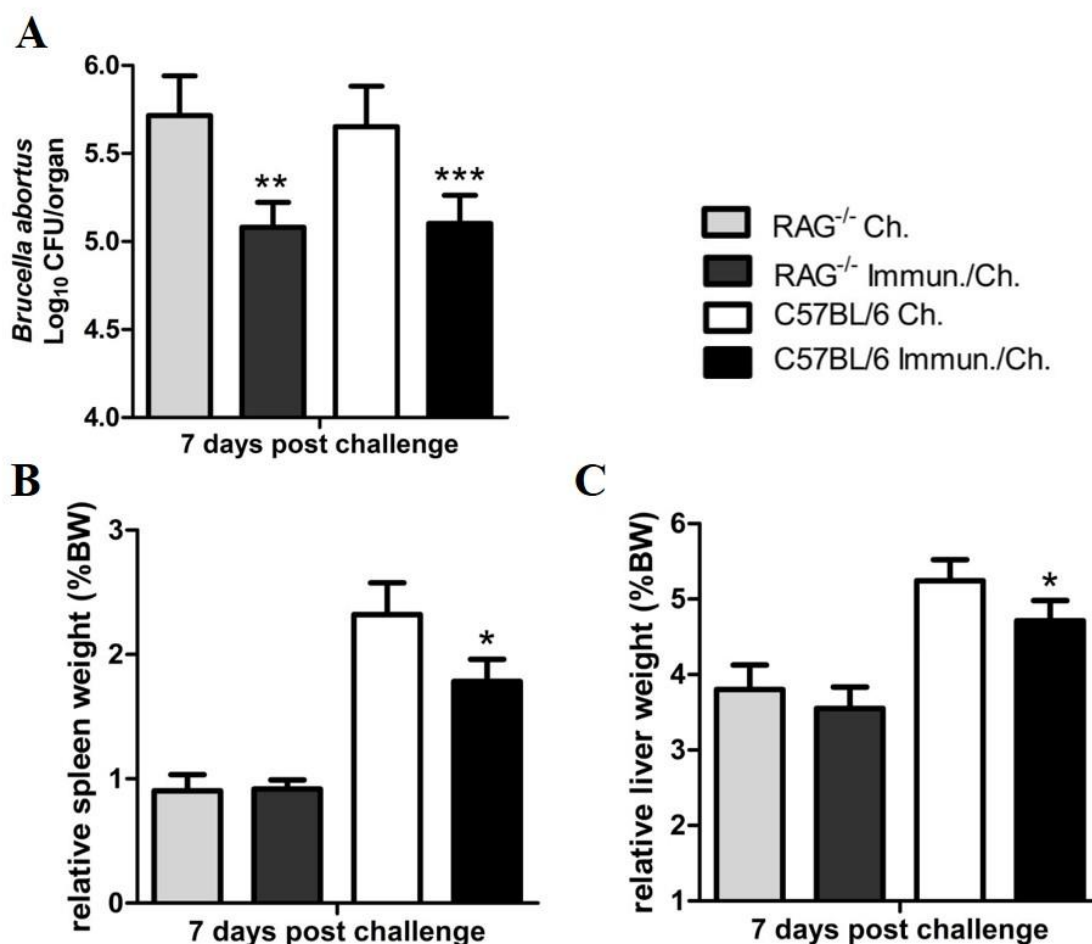
O peso relativo do fígado de camundongos C57BL/6, que não receberam a imunização prévia, apresentou aumento significativo entre 7 e 15 d.p.i. (**Figura 9 C**), de forma distinta ao observado com o fígado de animais previamente imunizados com o BCG Moreau, em que não houve variação significativa no peso relativo deste órgão entre 7 e 15 d.p.i. O menor peso relativo dos órgãos de camundongos previamente vacinados com o BCG, corrobora com a redução da carga bacteriana de *B. abortus*, já que o menor CFU e consequentemente menor quantidade de PAMPs ocasionará uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias e o menor recrutamento de células imunes para o sítio de infecção (Roset *et al.*, 2014). A inflamação é a consequência do reconhecimento de PAMPs pelo hospedeiro e a esplenomegalia na infecção pela *B. abortus* já foi elucidada como uma alteração decorrente do recrutamento de células imunes para este órgão (Roset *et al.*, 2014).

Com a finalidade de avaliar se o maior controle da *B. abortus* em camundongos que receberam a vacinação prévia com BCG Moreau é devido ao papel do sistema imune inato, análises foram realizadas em animais RAG<sup>-/-</sup>. No baço proveniente de camundongos RAG<sup>-/-</sup> também foi observada diferença notável da carga bacteriana de *B. abortus* em meio BB ágar, entre camundongos vacinados com o BCG e não-vacinados, depois de 7 d.p.i com essa bactéria (**Figura 10**).



**Figura 10.** Carga bacteriana de *B. abortus* S2308 em meio BB ágar 7 d.p.i. Placas com meio seletivo para *B. abortus* contendo as diluições (-2, -3, -4 e -5) do baço de animais RAG<sup>-/-</sup> não-vacinados e vacinados com o BCG, respectivamente.

Da mesma forma, a posterior quantificação por meio da contagem de CFUs da *B. abortus* no baço confirmou diferença significativa de 0,7 log após 7 dias de infecção, com o grupo previamente vacinado com o BCG apresentando menor quantidade de CFUs (**Figura 11 A**). Apesar disso, não houve diferença entre o peso relativo dos órgãos 7 d.p.i com a *B. abortus* para essa linhagem de camundongos (**Figura 11 B e C**).



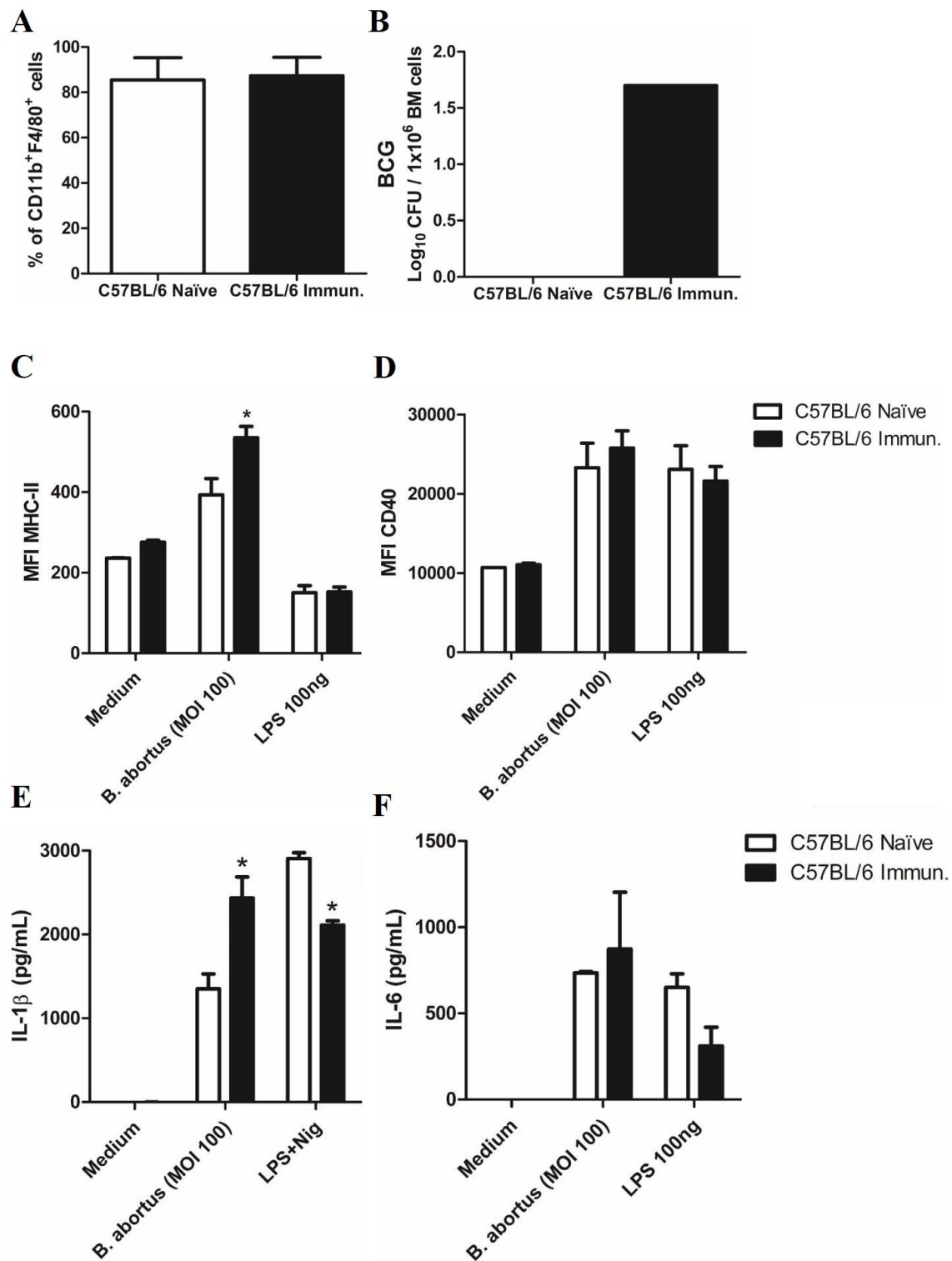
**Figura 11.** Carga bacteriana de *B. abortus* no baço de animais C57BL/6 RAG<sup>-/-</sup> e WT e peso relativo de órgãos acometidos pela *B. abortus* 7 d.p.i. (A) Carga bacteriana de *Brucella abortus* no baço. (B e C) Peso relativo do baço e do fígado em relação ao peso corporal (%BW), respectivamente. Comparação entre animais previamente vacinados com  $1 \times 10^6$  CFU de BCG Moreau e animais que não receberam a vacinação 7 d.p.i com a bactéria *B. abortus* S2308. Os dados de camundongos WT referentes a 7 d.p.i foram incluídos nesse gráfico para uma melhor comparação dos dados. Teste T \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao animal não vacinado da mesma linhagem. **Ch:** desafiado com *Brucella abortus*; **Immun./Ch.:** vacinado com BCG Moreau e após 30 dias desafiado com *Brucella abortus*.

Após 15 dias da infecção, em camundongos C57BL/6 previamente vacinados com o BCG, a redução do número de *B. abortus* no baço foi expressiva com poucas CFUs sendo visualizadas e consequentemente quantificadas, enquanto que para camundongos

não vacinados com o BCG, foi possível observar uma quantidade mais elevada de CFUs. Dessa forma, existe um mecanismo mais rápido e mais eficaz de controle da *Brucella abortus* em camundongos previamente vacinados com o BCG. A redução significativa da carga bacteriana da *B. abortus*, tanto no baço de camundongos WT quanto no baço de camundongos RAG<sup>-/-</sup> 7 d.p.i, demonstra que a capacidade de controle bacteriano potencializada devido aos efeitos heterólogos da vacinação prévia com o BCG é, no mínimo parcialmente, vinculada ao sistema imune inato. Em conjunto, esses resultados demonstram que a vacinação prévia com o BCG favorece o controle da *B. abortus* em camundongos C57BL/6 devido à redução da carga bacteriana no baço e do menor peso relativo do baço e do fígado. A potencialização do controle da *Brucella abortus* em animais RAG<sup>-/-</sup> evidencia a importância do papel desencadeado pelo sistema imune inato, visto que esses animais são desprovidos de sistema imune adaptativo.

### **5.3 A vacinação prévia com o BCG potencializa a ativação de macrófagos derivados da medula óssea contra o desafio pela bactéria *Brucella abortus***

A *Brucella* apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imunológico, muitos dos quais envolvem a interação intracelular com vias de controle bacteriano de macrófagos. Com isso, a bactéria consegue sobreviver e se proliferar dentro deste fagócito, que representa o seu principal nicho replicativo (Celli, 2015). As HSCs representam uma perspectiva de geração de Imunidade Treinada de longo prazo, já que estas células possuem a capacidade de autorrenovação e são capazes de originar macrófagos com repertório epigenético, transcricional e funcional potencializados (Khader *et al.*, 2019). A fim de investigar se BMDMs provenientes de camundongos imunizados com o BCG apresentam papel aprimorado no controle da infecção pela *B. abortus*, camundongos C57BL/6 foram vacinados com  $1 \times 10^6$  CFU do BCG Moreau e após 14 dias de vacinação foram sacrificados para coleta da medula óssea e posterior derivação em macrófagos *in vitro*. Cerca de 90% das células da medula se diferenciaram em macrófagos (BMDMs) sob estímulo de LCCM ao final do processo de derivação, tanto as provenientes de camundongos naïve quanto as provenientes de camundongos imunizados com o BCG (**Figura 12 A**). Além disso, uma fração das células da medula óssea foram plaqueadas em meio sólido pertinente, a fim de verificar se o BCG conseguia acesso a esse sítio anatômico. O BCG Moreau atingiu a medula óssea dos camundongos podendo estimular diretamente HSCs (**Figura 12 B**).



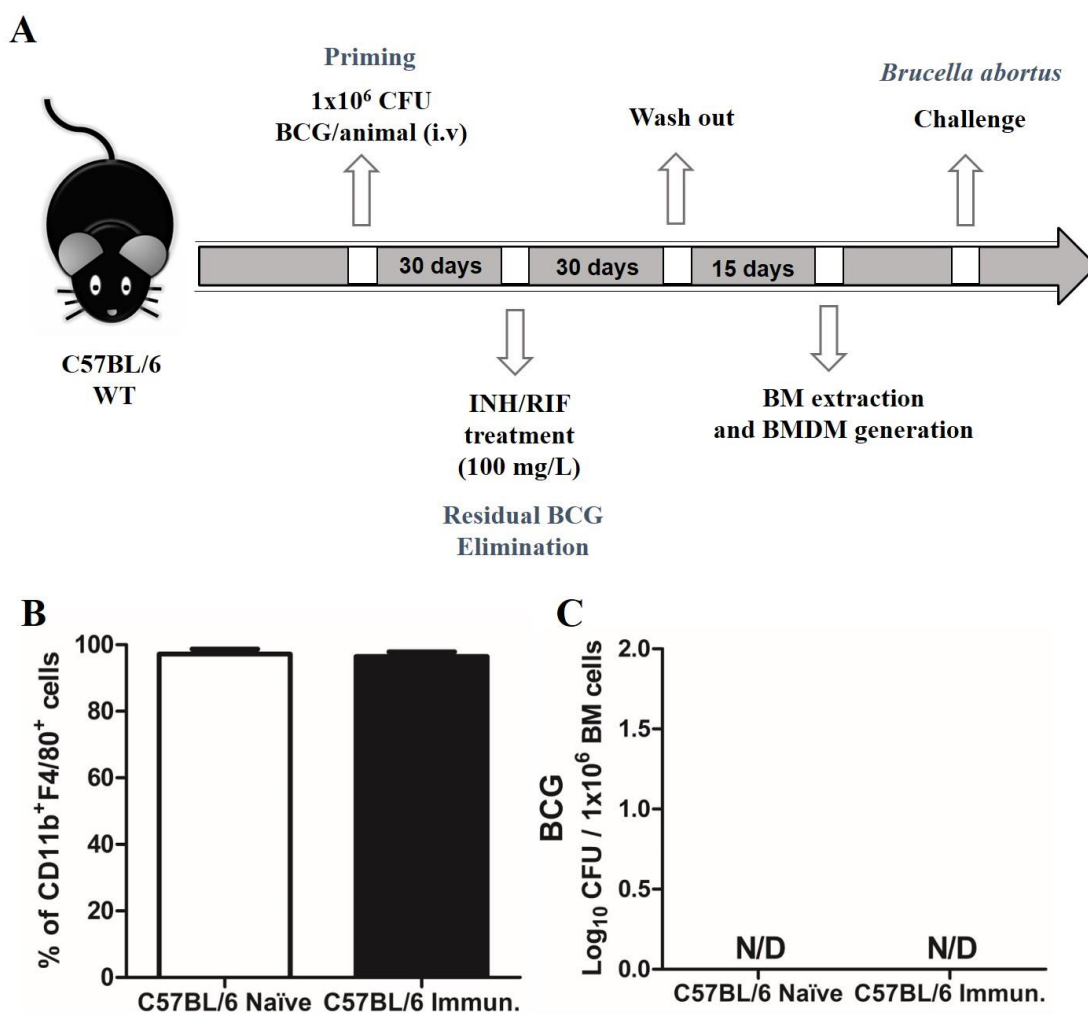
**Figura 12. BMDMs provenientes de camundongos previamente imunizados com o BCG Moreau são mais responsivos à bactéria patogênica *Brucella abortus* S2308. (A)** Ao fim do processo de derivação, cerca de 90% das células da medula óssea apresentaram marcadores característicos de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). **(B)** Células da medula óssea plaqueadas em meio 7H11 seletivo para o BCG. **(C e D)** Presença do MHC-II e da molécula coestimuladora CD40 na superfície de BMDMs, respectivamente. **(E e F)** Produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 por BMDMs, respectivamente. Two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. \* P<0,05 em relação aos macrófagos provenientes de camundongos naïve submetidos ao mesmo estímulo. **Immun.:** previamente vacinado com BCG Moreau.

Para avaliar a responsividade de macrófagos, nós averiguamos a expressão de MHC-II e da molécula coestimuladora CD40 na superfície celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A avaliação por intensidade média de fluorescência (MFI) indica a média da frequência de determinado marcador nas células dentro de uma população investigada, parâmetro importante para elucidação da Imunidade Treinada, já que a capacidade individual de cada fagócito implicará na amplificação da resposta no organismo. Os macrófagos provenientes de camundongos previamente vacinados com o BCG e aqueles provenientes de camundongos naïves foram posteriormente estimulados com a *B. abortus* por 24 horas. Os fagócitos provenientes de camundongos previamente imunizados apresentaram MFI significativamente maior de MHC-II, o que significa que a população de macrófagos expressou uma quantidade mais elevada de MHC-II na sua superfície celular (**Figura 12 C**). Além disso, esses macrófagos produziram quantidades maiores de IL-1 $\beta$  em resposta à *B. abortus* (**Figura 12 E**). Apesar da maior MFI associada a molécula CD40 dentro da população de macrófagos provenientes de camundongos previamente imunizados e da maior produção da citocina IL-6, não houve diferença estatística entre os grupos (**Figura 12 D e F**). Estes dados sugerem que a cepa BCG Moreau é capaz de induzir a geração de macrófagos mais responsivos, a partir de células provenientes da medula óssea, contra à bactéria patogênica *Brucella abortus*.

#### **5.4 A eliminação do BCG da medula óssea após indução de Imunidade Treinada resulta em macrófagos mais ativados para controle da infecção pela *Brucella abortus***

Após constatar que macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 vacinados com o BCG apresentaram características de maior ativação celular e que estas são decorrentes do estímulo mediado pelo BCG em células da medula óssea, nós visamos o aprimoramento do protocolo de indução da Imunidade Treinada *in vivo* com base na literatura (Kaufmann *et al.*, 2018). O aprimoramento consiste em assegurar a eliminação do BCG do organismo após 30 dias de indução da Imunidade Treinada. Dessa forma, depois de 30 dias da administração do BCG Moreau i.v em camundongos C57BL/6, iniciou-se o regime de tratamento com os antibióticos INH/RIF, que são eficazes contra micobactérias (**Figura 13 A**). O período de tratamento com INH/RIF correspondeu a 30 dias, nos quais os camundongos ingeriram os antibióticos diluídos na água para beber. Em seguida, os camundongos foram submetidos ao período de *wash out* para completa

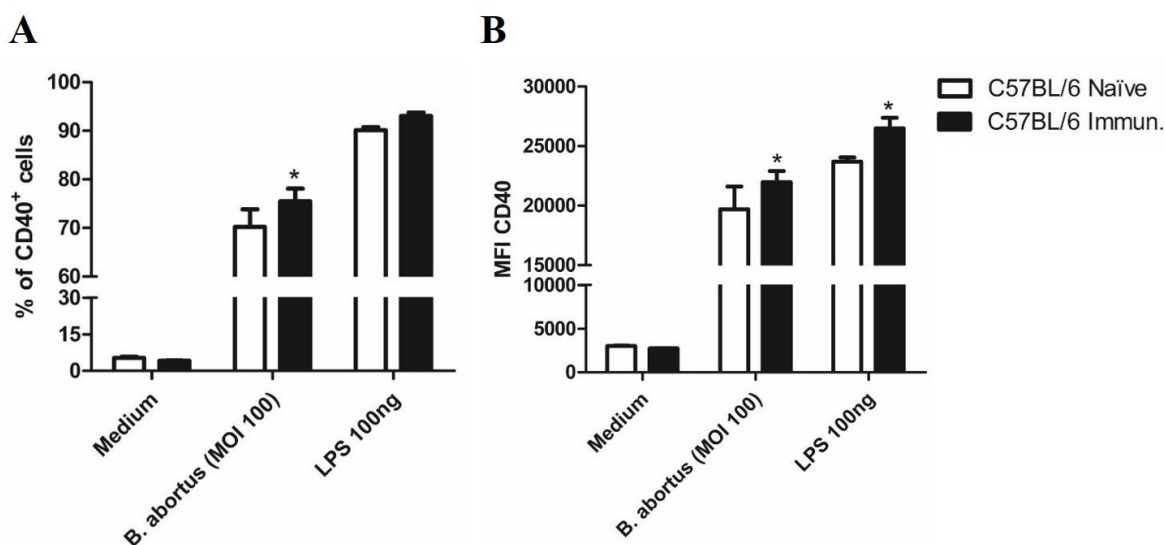
eliminação dos antibióticos do organismo, etapa que consistiu no retorno do fornecimento de água pura durante 15 dias. Somente após esses procedimentos é que as células da medula óssea foram coletadas para prosseguimento da derivação em macrófagos *in vitro*. Com o aprimoramento do protocolo, houve a obtenção de cerca de 95% de BMDMs sob estímulo de LCCM ao final do processo de derivação, tanto para células provenientes de camundongos naïve quanto para células provenientes de camundongos imunizados com o BCG (**Figura 13 B**). A fração das células da medula óssea plaqueadas em meio sólido pertinente, inclusive as provenientes de camundongos Treinados, não exibiu crescimento do BCG, o que demonstra que o regime de tratamento INH/RIF é eficiente na eliminação do BCG residual (**Figura 13 C**).



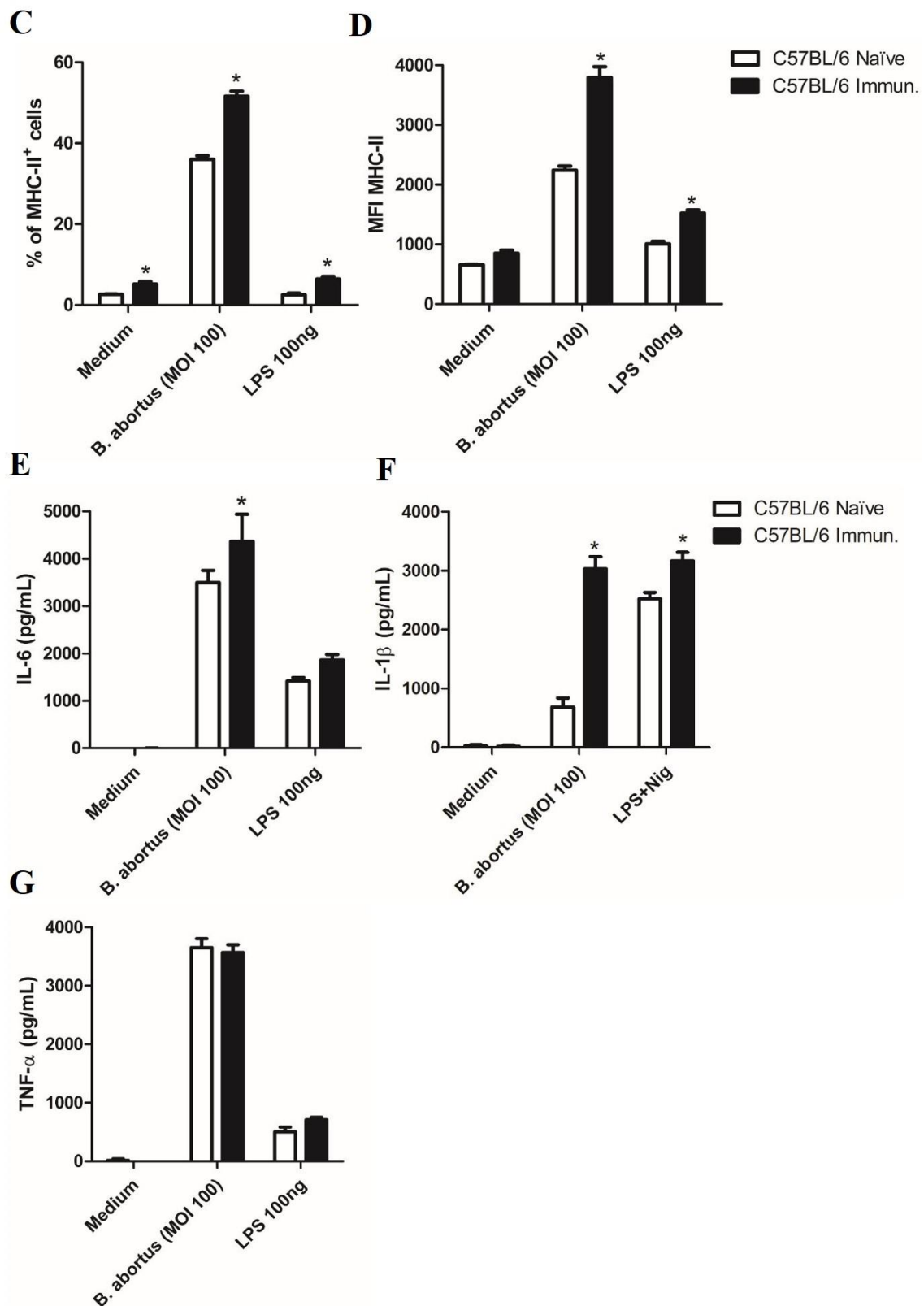
**Figura 13. Indução de Imunidade Treinada mediada por BCG *in vivo*.** (A) Protocolo experimental aprimorado de indução de Imunidade Treinada *in vivo* em camundongos C57BL/6 WT, com período de eliminação do BCG residual, *wash out* e prosseguimento com coleta e derivação de células da medula óssea *in vitro*. (B) Ao fim do protocolo, cerca de 95% das células recuperadas apresentaram marcadores característicos de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). (C) Células da medula óssea plaqueadas em meio 7H11 seletivo para o BCG. A ausência de

crescimento do BCG dentro as células plaqueadas demonstra a eficiência do tratamento com INH e RIF para eliminação do BCG residual.

A fim de avaliar se a Imunidade Treinada induzida por BCG *in vivo* resulta em uma maior responsividade de macrófagos contra a infecção pela *B. abortus* após eliminação do BCG residual, nós conduzimos a infecção de BMDMs *in vitro* com MOI 100:1. Após 24 horas de infecção, BMDMs provenientes de camundongos imunizados com o BCG apresentaram maior expressão de MHC-II e da molécula coestimuladora CD40 na superfície celular, quando comparado aos BMDMs provenientes de camundongos naïve. Tanto a porcentagem de células positivas para CD40 e MHC-II, quanto a MFI de CD40 e MHC-II foram mais elevados em BMDMs Treinados (**Figura 14 A, B, C e D**). Além disso, uma diferença significativa na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$  foi vista entre os grupos. BMDMs Treinados apresentaram maior produção dessas citocinas, sobretudo de IL-1 $\beta$ . No entanto não houve alteração nos níveis de produção de TNF- $\alpha$  (**Figura 14 E, F e G**).

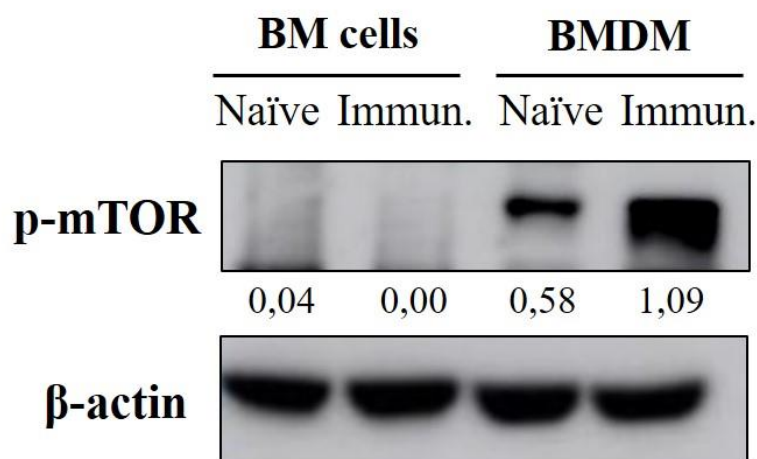


**Nota:** continuação da Figura 14 na página posterior.



**Figura 14.** O fenômeno de Imunidade Treinada induzido por BCG *in vivo* resulta em BMDMs funcionalmente mais aptos ao combate da infecção desencadeada pela *B. abortus* S2308. (A e B) Porcentagem de BMDMs positivos para CD40 e intensidade média de fluorescência (MFI) para essa molécula. (C e D) Porcentagem de BMDMs positivos para MHC-II e intensidade média de fluorescência (MFI) para essa molécula. (E, F e G) Produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Two-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  em relação aos macrófagos provenientes de camundongos naïve submetidos ao mesmo estímulo **Immun.**: previamente vacinado com BCG Moreau.

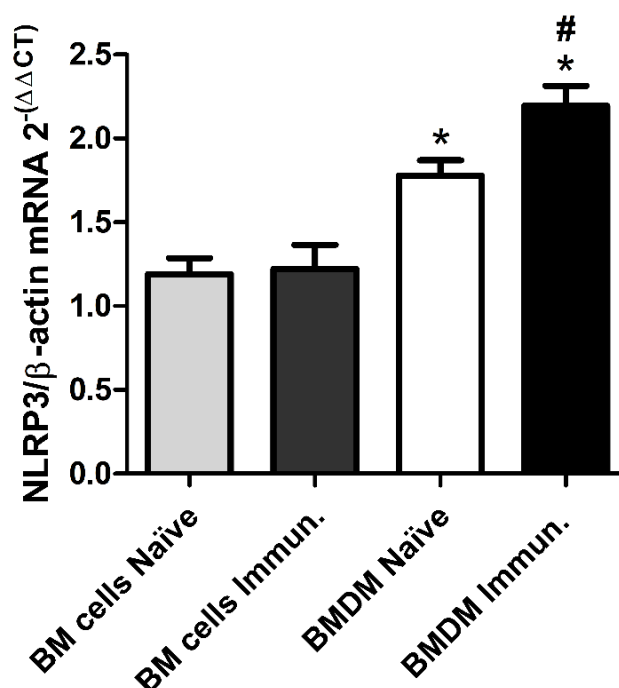
A ativação da via do mTOR tem sido demonstrada como essencial para a manutenção do fenótipo de Imunidade Treinada. Neste contexto, a abordagem da utilização de inibidores desta via resulta em perda da capacidade potencializada de controle de infecções (R. J. Arts *et al.*, 2016). A fim de avaliar se células da medula óssea e BMDMs provenientes de camundongos Treinados por meio do protocolo aprimorado de indução de Imunidade Treinada apresentam uma maior ativação desta via, nós investigamos a fosforilação do complexo mTORC1 decorrente da via PI3K/Akt. Nossos resultados demonstram que macrófagos Treinados com o BCG Moreau apresentam maior ativação da via do mTORC1 quando comparado aos macrófagos naïve (**Figura 15**).



**Figura 15. BMDMs Treinados por BCG *in vivo* apresentam maior ativação da via do mTORC1.** Células da medula óssea e BMDMs ao fim do processo de derivação foram lisados com M-PER suplementado com inibidores de proteases e fosfatases. A realização de Western Blot foi conduzida a fim de avaliar a fosforilação do complexo mTORC1 na Ser2448 decorrente da via PI3K/Akt. Os valores sob as bandas indicam a quantificação relativa à  $\beta$ -actina, em unidades arbitrárias. **Immun.:** previamente vacinado com BCG Moreau.

Estudos recentes têm demonstrado a conexão entre a via do complexo mTORC1, a via glicolítica e o inflamassoma NLRP3 em macrófagos (Dai, Jiang, Chen, & Chai, 2019, Finucane, Sugrue, Rubio-Araiz, Guillot-Sestier, & Lynch, 2019, Moon *et al.*, 2015). Além disso, devido ao fato de Macrófagos Treinados apresentarem maior produção da citocina IL-1 $\beta$  devido à vacinação prévia com o BCG, nós consideramos pertinente investigar o nível transcricional do receptor NLRP3 em células da medula óssea e em BMDMs. Previamente ao estímulo, BMDMs Treinados apresentaram maior nível de transcritos do receptor NLRP3 quando comparado a BMDMs provenientes de

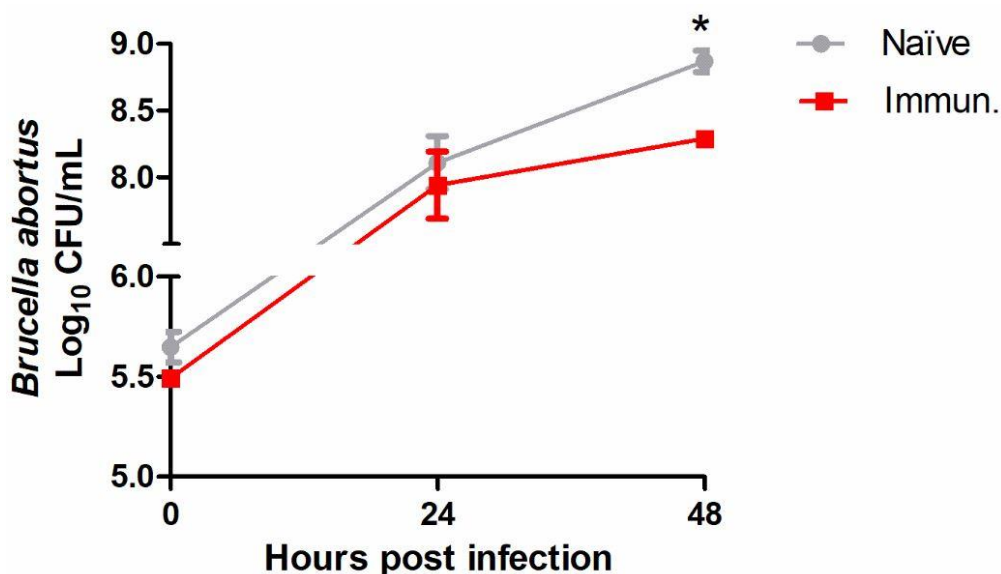
camundongos naïve (**Figura 16**). O receptor NLRP3 é responsável pela principal forma de ativação de inflamassoma durante a infecção pela *B. abortus* e consequente produção de IL-1 $\beta$  na forma madura (Cerqueira *et al.*, 2018, M. T. Gomes *et al.*, 2013). Esses resultados, em conjunto, evidenciam que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos Treinados pelo BCG Moreau apresentam características funcionais potencializadas em resposta à infecção pela *B. abortus*, representadas pela maior expressão de moléculas na superfície celular e pela maior produção de citocinas pró-inflamatórias, mesmo após a eliminação completa do BCG do organismo. Além disso, BMDMs Treinados com maior ativação de mTORC1 apresentaram maior nível transcricional do receptor NLRP3. O aumento dos transcritos deste inflamassoma pode ser considerado uma característica intrínseca do fenômeno de Treinamento por BCG, que culminou em uma maior produção de IL-1 $\beta$  após a infecção pela bactéria *B. abortus*.



**Figura 16. Indução de Imunidade Treinada *in vivo* origina BMDMs com maior nível de transcritos do receptor NLRP3.** Células da medula óssea e BMDMs ao fim do processo de derivação tiveram o RNA extraído com TRIZol para subsequente realização de qPCR. Os dados foram analisados usando o método  $\Delta\Delta C_T$ . \*  $p < 0,05$  em relação às células da BM provenientes do mesmo grupo. #  $p < 0,05$  em relação a BMDMs provenientes de camundongos naïve. **Immun.:** previamente vacinado com BCG Moreau.

### 5.5 A Imunidade Treinada induzida por BCG *in vivo* resulta em macrófagos derivados da medula óssea com maior capacidade de controle intracelular da *Brucella abortus*

Após geração de BMDMs por meio do protocolo aprimorado de indução de Imunidade Treinada *in vivo*, nós também avaliamos se a maior ativação de BMDMs proveniente de camundongos imunizados culminaria em uma maior capacidade de reduzir a replicação intracelular da bactéria *B. abortus*. Após 48 horas de infecção com MOI 10:1 de *B. abortus*, nós identificamos um maior controle do crescimento desta bactéria por BMDMs Treinados quando comparado aos BMDMs naïve (**Figura 17**). De forma importante, esses dados demonstram que macrófagos Treinados por BCG Moreau têm uma maior capacidade intracelular de eliminação desta bactéria quando comparado com as células controle.



**Figura 17.** O controle intracelular do crescimento de *B. abortus* é aprimorado devido à Imunidade Treinada induzida *in vivo*. BMDMs foram infectados com *Brucella abortus* S2308 MOI 10:1 por 4 horas. Após esse período as células foram lavadas para retirar as bactérias do meio extracelular e a infecção foi monitorada por até 48 horas. Test T \*  $p < 0,05$  em relação aos macrófagos provenientes de camundongos naïve.

## 6. DISCUSSÃO

A vacina viva atenuada *Mycobacterium bovis* BCG apresenta capacidade de gerar efeitos não-específicos (NSEs) tanto em camundongos quanto em humanos. Um pilar importante desses efeitos ocasionados é a Imunidade Treinada, um fenômeno de memória imunológica pertencente ao sistema imune inato de mamíferos, que representa resposta mais eficiente contra um estímulo secundário distinto. A indução da Imunidade Treinada já foi relatada sendo mediada por diferentes cepas de BCG, como a BCG-TICE (cepa utilizada na América do Norte) (Kaufmann *et al.*, 2018) e a BCG-SSI (cepa utilizada na Dinamarca) (R. J. W. Arts *et al.*, 2018). Entretanto, não foi relatada anteriormente por ser induzida pela BCG Moreau (cepa vacinal utilizada no Brasil). Portanto, a indução de Imunidade Treinada por esta última é apresentada de forma original neste trabalho.

A Imunidade Treinada desenvolvida em macrófagos tem sido foco de estudo no decorrer dos últimos anos, não apenas pelo efeito aprimorado da resposta imunológica desenvolvida por este fagócito, mas também pelo enfoque a nível celular de desenvolvimento deste fenômeno iniciado pelas células-tronco hematopoiéticas (HSCs). Devido à sua capacidade de autorrenovação, essas células podem ser responsáveis pelo fenômeno de memória imunológica vinculado ao sistema imune inato de longa duração (Khader *et al.*, 2019). Ao atingir e se estabelecer na medula óssea de camundongos C57BL/6, o BCG apresenta a capacidade de estimular extracelularmente HSCs e favorecer a expansão e o comprometimento de HSCs com a linhagem mieloide, com pico da fase proliferativa 30 dias após a vacinação (Kaufmann *et al.*, 2018). Apesar do crescente número de estudos envolvendo a elucidação da Imunidade Treinada, existe uma escassez de ensaios reportados na literatura acerca do modelo experimental de treinamento a partir de HSCs. A maioria dos protocolos descritos demonstram o treinamento por meio da coleta e isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), com indução da Imunidade Treinada por  $\beta$ -glucano (Cheng *et al.*, 2014, Ciarlo *et al.*, 2019, Dos Santos *et al.*, 2019).

Esta é a primeira vez que o BCG Moreau é avaliado em relação à sua capacidade indutora de Imunidade Treinada, e que a proteção deste fenômeno é avaliada contra a infecção pela bactéria patogênica *Brucella abortus*. A Brucelose representa um problema de saúde pública, pois é responsável pela morbidade de indivíduos acometidos que manifestam um amplo espectro de sintomas, pela redução da qualidade de vida e, menos

frequentemente pode levar a óbito (Franc *et al.*, 2018). Além disso, esta patologia gera aborto em ruminantes e comprometimento de produtos derivados como carne e leite, o que resulta em grandes perdas econômicas (Hull & Schumaker, 2018). No Brasil, a brucelose animal já representou uma perda econômica anual de aproximadamente 32 milhões de dólares (Poester *et al.*, 2002). Embora existam duas cepas vacinais vivas comercialmente disponíveis para o controle da Brucelose (S19 e RB51), ambas apresentam limitações, não podendo inclusive ser utilizadas em humanos (Gomez, Alvarez, Betancur, & Onate, 2018). Assim, a prevenção desta doença é dependente até o momento de sua erradicação ou controle no animal hospedeiro. A *Brucella abortus* possui via de replicação intracelular refinada e apresenta mecanismos que em conjunto são responsáveis pela evasão do sistema imunológico. A linhagem monócitos/macrófagos é o principal nicho replicativo dessas bactérias e a *B. abortus* possui modos de escapar da eliminação por esses fagócitos, a fim de se multiplicar e passar de uma célula para outra. Por meio das células apresentadoras de antígenos (APCs), *B. abortus* se dissemina pelo organismo e é capaz de sobreviver dentro dessas células, e acometer diversos órgãos com lesões granulomatosas. Além disso, a *B. abortus* apresenta a capacidade de interferir com a apresentação de antígenos pelos macrófagos e reconhecimento dessas células por linfócitos (Barrionuevo & Giambartolomei, 2019, Celli, 2015).

Neste trabalho, após vacinação com a cepa BCG Moreau, camundongos C57BL/6 e RAG<sup>-/-</sup> foram desafiados com a bactéria patogênica *Brucella abortus*. A ativação do sistema imunológico efetuada pelo BCG Moreau resultou em controle parcial da *Brucella abortus*, evidenciado através do prolongamento da sobrevivência de camundongos RAG<sup>-/-</sup> acompanhado da menor perda de peso desses animais, da redução da carga bacteriana no baço de animais RAG<sup>-/-</sup> e C57BL/6, assim como do menor peso relativo de órgãos acometidos pela *Brucella* em camundongos C57BL/6. Nossos achados demonstram que o BCG Moreau apresenta capacidade de ativar o sistema imunológico, conduzindo à eliminação de *B. abortus* do organismo de maneira mais rápida e eficaz. Além disso, devido a redução da carga bacteriana da *B. abortus* ocorrer no baço de camundongos RAG<sup>-/-</sup>, nossos resultados sugerem que o efeito heterólogo resultante da imunização com o BCG Moreau é mediado pelo sistema imune inato.

No contexto da Imunidade Treinada, uma das abordagens de verificação da proteção contra infecções, tem sido a comparação do percentual de sobrevivência entre os animais previamente inoculados com indutor de Imunidade Treinada e os animais controle. A Imunidade Treinada impacta de forma positiva a sobrevivência, protegendo

camundongos contra infecções letais posteriores. A contribuição do fenômeno é variável a depender do patógeno utilizado como desafio, da via de inoculação do mesmo e da metodologia de indução utilizada. Em 2019, foi demonstrado que a indução de Imunidade Treinada por  $\beta$ -glucano, por meio de dois contatos prévios com este indutor, resultou em aumento da porcentagem de sobrevivência de camundongos C57BL/6 Treinados que, após 7 dias, foram desafiados com dose letal de *E. coli*. Estes apresentaram 92% de sobrevivência, ao passo que camundongos não treinados apresentaram 23% de sobrevivência (Ciarlo *et al.*, 2019). Em 2012, camundongos SCID (desprovidos de linfócitos T e B funcionais), após 14 dias de imunização com o BCG cepa SSI, foram desafiados com dose letal de *C. albicans*. Os camundongos previamente imunizados apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto que aqueles que não receberam a vacinação com o BCG apresentaram 25% de sobrevivência (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012). Neste presente trabalho, a sobrevivência de camundongos RAG<sup>-/-</sup> imunizados com o BCG Moreau foi avaliada. Após 14 dias de indução de Imunidade Treinada, estes camundongos foram desafiados com altas doses da *B. abortus*. Um papel inicial da vacinação prévia com o BCG foi observado, por meio da ampliação da sobrevivência de camundongos Treinados. Neste contexto, 30% dos camundongos não treinados pereceram 2 dias após o desafio com  $5 \times 10^8$  CFU da *B. abortus*, enquanto que nenhum camundongo Treinado pereceu após este período. A depleção de macrófagos antes da indução da Imunidade Treinada está associada com a perda da proteção (Ciarlo *et al.*, 2019), indicando que essas células são fundamentais para a execução do fenômeno.

Neste trabalho, para indução de Imunidade Treinada, abordagens *in vivo* de Treinamento foram utilizadas, com posterior diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea *in vitro*. Neste modelo, camundongos C57BL/6 foram imunizados i.v. com BCG Moreau. Nós verificamos que essa bactéria atingiu a medula óssea, podendo ter estimulado diretamente as HSCs. A derivação de células da medula óssea em macrófagos após Treinamento resultou em fagócitos mais responsivos, com aumento da expressão das moléculas CD40 e MHC-II, aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$ , maior ativação da via do mTORC1, maior nível de transcritos do receptor NLRP3 e maior controle intracelular da *B. abortus* quando comparado a macrófagos não treinados. Estes achados sugerem uma estimulação pelo BCG em HSCs, que posteriormente serão responsáveis pela origem de macrófagos com características funcionais potencializadas. O estabelecimento de protocolo de indução de Imunidade Treinada *in vivo* seguido por tratamento com antibióticos eficazes contra micobactérias

consiste em um método efetivo de estudo da Imunidade Treinada, com garantia de fenótipos resultantes exclusivamente do Treinamento a partir de células provenientes de organismos sem a interferência da replicação bacteriana e estabelecimento de infecção mesmo que branda pelo BCG. A caracterização efetuada a partir desse método amplia o leque de possibilidades para investigação da Imunidade Treinada como, por exemplo, em relação à elucidação de vias imunometabólicas em macrófagos e caracterização de infiltrado celular em sítios anatômicos do organismo. A eliminação do BCG residual nos garante que o aumento da responsividade de BMDMs Treinados após estímulo com a *B. abortus* seja devido puramente ao fenômeno de Imunidade Treinada. Além disso, com a eliminação do BCG do organismo, as diferenças dos parâmetros funcionais analisados, entre os macrófagos Treinados e os macrófagos não-treinados foram mais evidentes. Durante a presença do BCG no organismo, nós acreditamos que as células da medula óssea estão sendo estimuladas a proliferar e diferenciar, porém também estão sendo recrutadas aos poucos para outros sítios anatômicos em que o BCG ainda esteja presente. Com a eliminação do BCG residual, as células treinadas ficam integralmente disponíveis para o controle da infecção pela *B. abortus*.

Kaufmann e colaboradores em 2018 demonstraram que a via de vacinação com o BCG é importante para o desencadeamento de Treinamento em HSCs. O BCG administrado pela via subcutânea resulta em contato íntimo com a medula óssea, sendo raramente detectado nesse sítio anatômico, assim como não desencadeia a proliferação e diferenciação de HSCs em células da linhagem mieloide. O BCG é administrado em recém-nascidos pela via intradérmica e a eficácia da vacinação contra a tuberculose pulmonar varia de 0 a 80% em adultos (WHO, 2018). Essa variabilidade de proteção pode ser devido a diferentes alcances do BCG a medula óssea (Kaufmann *et al.*, 2018).

O receptor NLRP3 forma, juntamente com a proteína adaptadora ASC, um inflamassoma cuja ativação acontece por diversos estímulos diferentes (Franchi, Munoz-Planillo, & Nunez, 2012). Em 2013, estudos conduzidos em nosso laboratório demonstraram que após infecção com a *Brucella abortus*, macrófagos deficientes em NLRP3 ou ASC, apresentam menor secreção de IL-1 $\beta$  e menor ativação de caspase-1 em comparação com macrófagos selvagens da linhagem C57BL/6. Além disso, quando os macrófagos selvagens da linhagem C57BL/6 foram infectados com a *B. abortus* deficiente no sistema de secreção do tipo IV *virB*, houve redução na secreção de IL-1 $\beta$  em relação a macrófagos infectados com bactéria selvagem. Esses dados sugerem que *B. abortus* é capaz de levar à ativação do inflamassoma de NLRP3/ASC, o que resulta na

secreção de IL-1 $\beta$  e ativação de caspase-1 de maneira dependente do sistema de secreção do tipo IV *virB* (M. T. Gomes *et al.*, 2013). Além disso, em 2018 no nosso laboratório foi elucidado que a produção de IL-1 $\beta$  na infecção por *B. abortus* é dependente da ativação do inflamassoma de NLRP3 pela via não-canônica. O LPS não-canônico da *B. abortus* é reconhecido pela caspase-11, culminando na formação de poros na membrana plasmática de macrófagos através da oligomerização da GSDMD, com consequente efluxo de K<sup>+</sup> e então ativação de NLRP3 (Cerqueira *et al.*, 2018). Camundongos CASP11<sup>-/-</sup> e GSDMD<sup>-/-</sup> infectados com *B. abortus* apresentam menor infiltrado de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos no baço (Cerqueira *et al.*, 2018). Nosso grupo também demonstrou que camundongos com ausência do receptor IL-1R são mais susceptíveis a infecção com *B. abortus* (M. T. Gomes *et al.*, 2013). Portanto, a secreção de IL-1 $\beta$  contribui para a resposta imunológica e combate à infecção pela *B. abortus*.

Neste trabalho, BMDMs Treinados com a cepa BCG Moreau apresentaram maior nível de transcritos do receptor NLRP3 antes mesmo da infecção com a *Brucella abortus*. Além disso, BMDMs Treinados submetidos à infecção pela *B. abortus* produziram uma quantidade maior de IL-1 $\beta$  quando comparado com BMDMs provenientes de camundongos não treinados. Nós sugerimos, portanto, que o aumento da expressão de NLRP3 em macrófagos Treinados impactou na produção de maiores quantidades de IL-1 $\beta$  após desafio com a *B. abortus* e que esses fagócitos foram capazes de controlar melhor a replicação intracelular dessa bactéria. Estes resultados ampliam as evidências de que esta citocina desempenha papel importante na Imunidade contra a *Brucella*, além de, principalmente, contribuir para um campo investigativo que interliga inflamassomas e Imunidade Treinada. Recentes estudos têm sugerido que enzimas envolvidas na via glicolítica podem influenciar na modulação e até mesmo na ativação do inflamassoma NLRP3. Já foi relatado que a inibição da glicólise mediada por mTORC1 dependente da hexoquinase-1, enzima que catalisa a primeira etapa da via glicolítica, diminui a ativação de caspase-1 e a produção de IL-1 $\beta$ . Além disso, a inibição da piruvato quinase, enzima que catalisa o último passo da via glicolítica, suprime a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos (Moon *et al.*, 2015, Xie *et al.*, 2016). Em 2018, foi demonstrado que o inflamassoma NLRP3 está relacionado com o aumento da glicólise em macrófagos de uma maneira dependente de IL-1 $\beta$ , por meio do aumento da expressão de frutose-2,6-bifosfatase (PFKFB3), enzima envolvida na etapa limitante da glicólise (Finucane *et al.*, 2019). Sendo assim, a via glicolítica e o inflamassoma NLRP3 são interconectados. Apesar de significativos avanços no entendimento do fenômeno de Imunidade Treinada,

a base exata deste mecanismo bem como eventos intracelulares que controlam a indução das respostas imunes inatas. Treinadas permanecem sob investigação. Sendo assim, a elucidação da participação do inflamassoma de NLRP3 e da citocina IL-1 $\beta$  no contexto da Imunidade Treinada induzida por BCG pode contribuir para o entendimento e consequente aplicação dessa estratégia de ativação do sistema imunológico (Liu *et al.*, 2020, Moorlag *et al.*, 2018).

Em 2018, a vacinação prévia com o BCG de voluntários que posteriormente receberam a vacina com o vírus da febre amarela (YFV) resultou em significativa redução da carga viral na corrente sanguínea quando comparado aos voluntários que receberam o placebo. Neste estudo foi demonstrado que o aumento da capacidade de produção da IL-1 $\beta$  por monócitos humanos correlacionou com a menor viremia do YFV. Entretanto, o aumento da produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  não apresentou correlação com a viremia do YFV, sugerindo que a IL-1 $\beta$  é crucial nas respostas imunes Treinadas. Além disso, foi também demonstrado que a Imunidade Treinada induzida em monócitos por BCG foi afetada por polimorfismos genéticos nos genes da família IL-1, incluindo o promotor da citocina IL-1 $\beta$  (R. J. W. Arts *et al.*, 2018). Essas evidências reforçam os nossos achados de que a IL-1 $\beta$  é uma das principais citocinas produzidas após indução do fenômeno de Imunidade Treinada.

Dentre nossos achados, BMDMs Treinados por BCG Moreau apresentaram uma maior MFI de CD40 e MHC-II quando comparado aos BMDMs provenientes de camundongos não treinados. A presença de maior quantidade de moléculas de ativação na superfície de cada macrófago em individual pode amplificar a comunicação entre sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. Devido ao aumento da expressão de MHC-II em BMDMs Treinados ter sido expressivo, nós sugerimos que o Treinamento aumenta a expressão desta molécula de tal forma que evite os efeitos de inibição da via do MHC-II induzidos pela *Brucella abortus*. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1 são cruciais para o controle da *Brucella abortus*, sendo o IFN- $\gamma$  a principal citocina produzida por essas células. Os macrófagos infectados por *B. abortus*, no sítio de infecção, apresentam o complexo MHC-II-peptídeo bacteriano para os TCRs dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  e consequente ativação de macrófagos, que apresentarão mecanismos de controle intracelular intensificados (Dorneles, Teixeira-Carvalho, Araujo, Sriranganathan, & Lage, 2015, Pappas *et al.*, 2005).

Nossos achados demonstram que a indução da Imunidade Treinada *in vivo* mediada pela cepa vacinal BCG Moreau em camundongos C57BL/6 e RAG<sup>-/-</sup> resulta no controle

potencializado contra à infecção pela bactéria patogênica *Brucella abortus*. Neste trabalho, o desenvolvimento do protocolo de indução de Imunidade Treinada *in vivo* a partir de células da medula óssea provenientes de camundongos C57BL/6 representa uma ponte para elucidação dos mecanismos envolvidos neste fenômeno. Os NSEs desencadeados por BCG decorrem, pelo menos parcialmente, da atividade potencializada do sistema imune inato, dentro do qual macrófagos originados de células da medula óssea provenientes de camundongos vacinados com BCG Moreau apresentam maior capacidade de produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$ , maior expressão de CD40 e MHC-II na superfície celular e sobretudo maior controle do crescimento intracelular da *Brucella abortus*.

## 7. CONCLUSÃO

A vacinação prévia com o BCG Moreau protege camundongos C57BL/6 e RAG<sup>-/-</sup> contra a infecção pela bactéria patogênica *Brucella abortus*. Além disso, BMDMs Treinados pela cepa BCG Moreau apresentam maior expressão de CD40 e MHC-II na superfície celular, maior produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e maior capacidade de controle da replicação intracelular da *Brucella abortus*.

## REFERÊNCIAS

AABY, P., A. ROTH, H. RAVN, B. M. NAPIRNA, A. RODRIGUES, I. M. LISSE, L. STENSBALLE, *ET AL.* Randomized Trial of Bcg Vaccination at Birth to Low-Birth-Weight Children: Beneficial Nonspecific Effects in the Neonatal Period? **J Infect Dis**, v.204, p. 245-252, Jul 15 2011.

ANDERSON, T. D., V. P. MEADOR, AND N. F. CHEVILLE. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella Abortus*. I. Gross and Histologic Lesions. **Vet Pathol**, v.23, p. 219-226, May 1986.

ARCHAMBAUD, C., S. P. SALCEDO, H. LELOUARD, E. DEVILARD, B. DE BOVIS, N. VAN ROOIJEN, J. P. GORVEL, AND B. MALISSEN. Contrasting Roles of Macrophages and Dendritic Cells in Controlling Initial Pulmonary *Brucella* Infection. **Eur J Immunol**, v.40, p. 3458-3471, Dec 2010.

ARTS, R. J., L. A. JOOSTEN, AND M. G. NETEA. Immunometabolic Circuits in Trained Immunity. **Semin Immunol**, v.28, p. 425-430, Oct 2016.

ARTS, R. J. W., A. CARVALHO, C. LA ROCCA, C. PALMA, F. RODRIGUES, R. SILVESTRE, J. KLEINNIJENHUIS, *ET AL.* Immunometabolic Pathways in Bcg-Induced Trained Immunity. **Cell Rep**, v.17, p. 2562-2571, Dec 6 2016.

ARTS, R. J. W., SJCFM MOORLAG, B. NOVAKOVIC, Y. LI, S. Y. WANG, M. OOSTING, V. KUMAR, *ET AL.* Bcg Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. **Cell Host Microbe**, v.23, p. 89-100 e105, Jan 10 2018.

ATLURI, V. L., M. N. XAVIER, M. F. DE JONG, A. B. DEN HARTIGH, AND R. M. TSOLIS. Interactions of the Human Pathogenic *Brucella* Species with Their Hosts. **Annu Rev Microbiol**, v.65, p. 523-541, 2011.

BALDI, P. C., AND G. H. GIAMBARTOLOMEI. Pathogenesis and Pathobiology of Zoonotic Brucellosis in Humans. **Rev Sci Tech**, v.32, p. 117-125, Apr 2013.

BANG, BERNARD. *Bacillus Abortus* of Bang, the Cause of Contagious Abortion in Cattle. **Oxford Journals** v.7, p. 469-475, 1910.

BARRIONUEVO, P., J. CASSATARO, M. V. DELPINO, A. ZWERDLING, K. A. PASQUEVICH, C. GARCIA SAMARTINO, J. C. WALLACH, C. A. FOSSATI, AND G. H. GIAMBARTOLOMEI. *Brucella Abortus* Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression and

Antigen Processing through Interleukin-6 Secretion Via Toll-Like Receptor 2. **Infect Immun**, v.76, p. 250-262, Jan 2008.

BARRIONUEVO, P., AND G. H. GIAMBARTOLOMEI. Inhibition of Antigen Presentation by Brucella: Many More Than Many Ways. **Microbes Infect**, v.21, p. 136-142, Apr - May 2019.

BEKKERING, S., R. J. W. ARTS, B. NOVAKOVIC, I. KOURTZELIS, CDCC VAN DER HEIJDEN, Y. LI, C. D. POPA, *ET AL.* Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. **Cell**, v.172, p. 135-146 e139, Jan 11 2018.

BELLAIRE, B. H., R. M. ROOP, 2ND, AND J. A. CARDELLI. Opsonized Virulent Brucella Abortus Replicates within Nonacidic, Endoplasmic Reticulum-Negative, Lamp-1-Positive Phagosomes in Human Monocytes. **Infect Immun**, v.73, p. 3702-3713, Jun 2005.

BOSCHIROLI, M. L., S. OUAHRANI-BETTACHE, V. FOULONGNE, S. MICHAUX-CHARACHON, G. BOURG, A. ALLARDET-SERVENT, C. CAZEVIEILLE, *ET AL.* The Brucella Suis Virb Operon Is Induced Intracellularly in Macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p. 1544-1549, Feb 5 2002.

BRUCE, DAVID. Note on the Discovery of Microorganism in Malta Fever. **Therapeutics and Public Health**, v.39, p. 161-170, 1887.

CASALINUOVO, F., L. CIAMBRONE, A. CACIA, AND P. RIPPA. Contamination of Bovine, Sheep and Goat Meat with Brucella Spp. **Ital J Food Saf**, v.5, p. 5913, Jun 3 2016.

CELLI, J. The Changing Nature of the Brucella-Containing Vacuole. **Cell Microbiol**, v.17, p. 951-958, Jul 2015.

CELLI, J., C. DE CHASTELLIER, D. M. FRANCHINI, J. PIZARRO-CERDA, E. MORENO, AND J. P. GORVEL. Brucella Evades Macrophage Killing Via Virb-Dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum. **J Exp Med**, v.198, p. 545-556, Aug 18 2003.

CELLI, J., S. P. SALCEDO, AND J. P. GORVEL. Brucella Coopts the Small Gtpase Sar1 for Intracellular Replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, p. 1673-1678, Feb 1 2005.

CERQUEIRA, D. M., M. T. R. GOMES, A. L. N. SILVA, M. RUNGUE, N. R. G. ASSIS, E. S. GUIMARAES, S. B. MORAIS, *ET AL.* Guanylate-Binding Protein 5 Licenses Caspase-11 for Gasdermin-D Mediated Host Resistance to Brucella Abortus Infection. **PLoS Pathog**, v.14, p. e1007519, Dec 2018.

CHENG, S. C., J. QUINTIN, R. A. CRAMER, K. M. SHEPARDSON, S. SAEED, V. KUMAR, E. J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, *ET AL.* Mtor- and Hif-1alpha-Mediated Aerobic Glycolysis as Metabolic Basis for Trained Immunity. **Science**, v.345, p. 1250684, Sep 26 2014.

CIARLO, E., T. HEINONEN, C. THEROUDE, F. ASGARI, D. LE ROY, M. G. NETEA, AND T. ROGER. Trained Immunity Confers Broad-Spectrum Protection against Bacterial Infections. **J Infect Dis**, p., Dec 31 2019.

COMERCI, D. J., M. J. MARTINEZ-LORENZO, R. SIEIRA, J. P. GORVEL, AND R. A. UGALDE. Essential Role of the Virb Machinery in the Maturation of the Brucella Abortus-Containing Vacuole. **Cell Microbiol**, v.3, p. 159-168, Mar 2001.

CORBEL, M. J. Brucellosis: An Overview. **Emerg Infect Dis**, v.3, p. 213-221, Apr-Jun 1997.

DAI, J., C. JIANG, H. CHEN, AND Y. CHAI. Rapamycin Attenuates High Glucose-Induced Inflammation through Modulation of Mtor/Nf-Kappab Pathways in Macrophages. **Front Pharmacol**, v.10, p. 1292, 2019.

DE BOLLE, X., S. CROSSON, J. Y. MATROULE, AND J. J. LETESSON. Brucella Abortus Cell Cycle and Infection Are Coordinated. **Trends Microbiol**, v.23, p. 812-821, Dec 2015.

DORNELES, E. M., A. TEIXEIRA-CARVALHO, M. S. ARAUJO, N. SRIRANGANATHAN, AND A. P. LAGE. Immune Response Triggered by Brucella Abortus Following Infection or Vaccination. **Vaccine**, v.33, p. 3659-3666, Jul 17 2015.

DOS SANTOS, J. C., A. M. BARROSO DE FIGUEIREDO, M. V. TEODORO SILVA, B. CIROVIC, L. C. J. DE BREE, MSMA DAMEN, SJCFM MOORLAG, *ET AL.* Beta-Glucan-Induced Trained Immunity Protects against Leishmania Braziliensis Infection: A Crucial Role for Il-32. **Cell Rep**, v.28, p. 2659-2672 e2656, Sep 3 2019.

DURRANT, W. E., AND X. DONG. Systemic Acquired Resistance. **Annu Rev Phytopathol**, v.42, p. 185-209, 2004.

FINUCANE, O. M., J. SUGRUE, A. RUBIO-ARAIZ, M. V. GUILLOT-SESTIER, AND M. A. LYNCH. The Nlrp3 Inflammasome Modulates Glycolysis by Increasing Pfkfb3 in an Il-1beta-Dependent Manner in Macrophages. **Sci Rep**, v.9, p. 4034, Mar 11 2019.

FORESTIER, C., F. DELEUIL, N. LAPAQUE, E. MORENO, AND J. P. GORVEL. Brucella Abortus Lipopolysaccharide in Murine Peritoneal Macrophages Acts as a Down-Regulator of T Cell Activation. **J Immunol**, v.165, p. 5202-5210, Nov 1 2000.

FRANC, K. A., R. C. KRECEK, B. N. HASLER, AND A. M. ARENAS-GAMBOA. Brucellosis Remains a Neglected Disease in the Developing World: A Call for Interdisciplinary Action. **BMC Public Health**, v.18, p. 125, Jan 11 2018.

FRANCHI, L., R. MUNOZ-PLANILLO, AND G. NUNEZ. Sensing and Reacting to Microbes through the Inflammasomes. **Nat Immunol**, v.13, p. 325-332, Mar 19 2012.

GIAMBARTOLOMEI, G. H., A. ZWERDLING, J. CASSATARO, L. BRUNO, C. A. FOSSATI, AND M. T. PHILIPP. Lipoproteins, Not Lipopolysaccharide, Are the Key Mediators of the Proinflammatory Response Elicited by Heat-Killed *Brucella Abortus*. **J Immunol**, v.173, p. 4635-4642, Oct 1 2004.

GOMES, M. T., P. C. CAMPOS, F. S. OLIVEIRA, P. P. CORSETTI, K. R. BORTOLUCI, L. D. CUNHA, D. S. ZAMBONI, AND S. C. OLIVEIRA. Critical Role of Asc Inflammasomes and Bacterial Type Iv Secretion System in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to *Brucella Abortus* Infection. **J Immunol**, v.190, p. 3629-3638, Apr 1 2013.

GOMES, M. T. R., D. M. CERQUEIRA, E. S. GUIMARAES, P. C. CAMPOS, AND S. C. OLIVEIRA. Guanylate-Binding Proteins at the Crossroad of Noncanonical Inflammasome Activation During Bacterial Infections. **J Leukoc Biol**, v.106, p. 553-562, Sep 2019.

GOMEZ, L., F. ALVAREZ, D. BETANCUR, AND A. ONATE. Brucellosis Vaccines Based on the Open Reading Frames from Genomic Island 3 of *Brucella Abortus*. **Vaccine**, v.36, p. 2928-2936, May 17 2018.

GOURBAL, B., S. PINAUD, G. J. M. BECKERS, J. W. M. VAN DER MEER, U. CONRATH, AND M. G. NETEA. Innate Immune Memory: An Evolutionary Perspective. **Immunol Rev**, v.283, p. 21-40, May 2018.

HIGGINS, J. P., K. SOARES-WEISER, J. A. LOPEZ-LOPEZ, A. KAKOUROU, K. CHAPLIN, H. CHRISTENSEN, N. K. MARTIN, J. A. STERNE, AND A. L. REINGOLD. Association of Bcg, Dtp, and Measles Containing Vaccines with Childhood Mortality: Systematic Review. **BMJ**, v.355, p. i5170, Oct 13 2016.

HOSS, F., J. F. RODRIGUEZ-ALCAZAR, AND E. LATZ. Assembly and Regulation of Asc Specks. **Cell Mol Life Sci**, v.74, p. 1211-1229, Apr 2017.

HULL, N. C., AND B. A. SCHUMAKER. Comparisons of Brucellosis between Human and Veterinary Medicine. **Infect Ecol Epidemiol**, v.8, p. 1500846, 2018.

JASKIEWICZ, M., U. CONRATH, AND C. PETERHANSEL. Chromatin Modification Acts as a Memory for Systemic Acquired Resistance in the Plant Stress Response. **EMBO Rep**, v.12, p. 50-55, Jan 2011.

JO, E. K., J. K. KIM, D. M. SHIN, AND C. SASAKAWA. Molecular Mechanisms Regulating Nlrp3 Inflammasome Activation. **Cell Mol Immunol**, v.13, p. 148-159, Mar 2016.

JORGENSEN, I., J. P. LOPEZ, S. A. LAUFER, AND E. A. MIAO. Il-1beta, Il-18, and Eicosanoids Promote Neutrophil Recruitment to Pore-Induced Intracellular Traps Following Pyroptosis. **Eur J Immunol**, v.46, p. 2761-2766, Dec 2016.

KAUFMANN, E., J. SANZ, J. L. DUNN, N. KHAN, L. E. MENDONCA, A. PACIS, F. TZELEPIS, *ET AL.* Bcg Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. **Cell**, v.172, p. 176-190 e119, Jan 11 2018.

KHADER, S. A., M. DIVANGAHI, W. HANEKOM, P. C. HILL, M. MAEURER, K. W. MAKAR, K. D. MAYER-BARBER, *ET AL.* Targeting Innate Immunity for Tuberculosis Vaccination. **J Clin Invest**, v.129, p. 3482-3491, Sep 3 2019.

KLEINNIJENHUIS, J., J. QUINTIN, F. PREIJERS, L. A. JOOSTEN, D. C. IFRIM, S. SAEED, C. JACOBS, *ET AL.* Bacille Calmette-Guerin Induces Nod2-Dependent Nonspecific Protection from Reinfection Via Epigenetic Reprogramming of Monocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.109, p. 17537-17542, Oct 23 2012.

LATZ, E., T. S. XIAO, AND A. STUTZ. Activation and Regulation of the Inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v.13, p. 397-411, Jun 2013.

LINDAHL-RAJALA, E., T. HOFFMAN, D. FRETIN, J. GODFROID, N. SATTOROV, S. BOQVIST, A. LUNDKVIST, AND U. MAGNUSSON. Detection and Characterization of Brucella Spp. In Bovine Milk in Small-Scale Urban and Peri-Urban Farming in Tajikistan. **PLoS Negl Trop Dis**, v.11, p. e0005367, Mar 2017.

LIU, Y., S. LIANG, R. DING, Y. HOU, F. DENG, X. MA, T. SONG, AND D. YAN. Bcg-Induced Trained Immunity in Macrophage: Reprogramming of Glucose Metabolism. **Int Rev Immunol**, p. 1-14, Jan 14 2020.

LOCATI, M., G. CURTALE, AND A. MANTOVANI. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. **Annu Rev Pathol**, v.15, p. 123-147, Jan 24 2020.

LUCA, S., AND T. MIHAESCU. History of Bcg Vaccine. **Maedica (Buchar)**, v.8, p. 53-58, Mar 2013.

MENSE, M. G., R. H. BORSCHER, C. L. WILHELMSSEN, M. L. PITT, AND D. L. HOOVER. Pathologic Changes Associated with Brucellosis Experimentally Induced by Aerosol Exposure in Rhesus Macaques (*Macaca Mulatta*). **Am J Vet Res**, v.65, p. 644-652, May 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional De Controle E Erradicação Da Brucelose E Da Tuberculose Animal (Pncebt). **Brasil**, p. 1-181, 2006.

MOLAWI, K., AND M. H. SIEWEKE. Transcriptional Control of Macrophage Identity, Self-Renewal, and Function. **Adv Immunol**, v.120, p. 269-300, 2013.

MOON, J. S., S. HISATA, M. A. PARK, G. M. DENICOLA, S. W. RYTER, K. NAKAHIRA, AND A. M. K. CHOI. Mtorc1-Induced Hk1-Dependent Glycolysis Regulates Nlrp3 Inflammasome Activation. **Cell Rep**, v.12, p. 102-115, Jul 7 2015.

MOORLAG, SJCFM, R. J. RORING, L. A. B. JOOSTEN, AND M. G. NETEA. The Role of the Interleukin-1 Family in Trained Immunity. **Immunol Rev**, v.281, p. 28-39, Jan 2018.

NETEA, M. G., L. A. JOOSTEN, E. LATZ, K. H. MILLS, G. NATOLI, H. G. STUNNENBERG, L. A. O'NEILL, AND R. J. XAVIER. Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease. **Science**, v.352, p. aaf1098, Apr 22 2016.

NETEA, M. G., J. QUINTIN, AND J. W. VAN DER MEER. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. **Cell Host Microbe**, v.9, p. 355-361, May 19 2011.

OLSEN, S. C., AND M. V. PALMER. Advancement of Knowledge of *Brucella* over the Past 50 Years. **Vet Pathol**, v.51, p. 1076-1089, Nov 2014.

PAPPAS, G., N. AKRITIDIS, M. BOSILKOVSKI, AND E. TSIANOS. Brucellosis. **N Engl J Med**, v.352, p. 2325-2336, Jun 2 2005.

PASQUEVICH, K. A., C. GARCIA SAMARTINO, L. M. CORIA, S. M. ESTEIN, A. ZWERDLING, A. E. IBANEZ, P. BARRIONUEVO, *ET AL.* The Protein Moiety of *Brucella abortus* Outer Membrane Protein 16 Is a New Bacterial Pathogen-Associated Molecular Pattern That Activates Dendritic Cells in Vivo, Induces a Th1 Immune Response, and Is a Promising Self-Adjuvanting Vaccine against Systemic and Oral Acquired Brucellosis. **J Immunol**, v.184, p. 5200-5212, May 1 2010.

PERCIN, D. Microbiology of *Brucella*. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v.8, p. 13-17, Apr 2013.

POESTER, F. P., V. S. GONCALVES, AND A. P. LAGE. Brucellosis in Brazil. **Vet Microbiol**, v.90, p. 55-62, Dec 20 2002.

POESTER, F. P., L. E. SAMARTINO, AND R. L. SANTOS. Pathogenesis and Pathobiology of Brucellosis in Livestock. **Rev Sci Tech**, v.32, p. 105-115, Apr 2013.

POURBAGHER, A., M. A. POURBAGHER, L. SAVAS, T. TURUNC, Y. Z. DEMIROGLU, I. EROL, AND D. YALCINTAS. Epidemiologic, Clinical, and Imaging Findings in Brucellosis Patients with Osteoarticular Involvement. **AJR Am J Roentgenol**, v.187, p. 873-880, Oct 2006.

PRADEU, T., AND L. DU PASQUIER. Immunological Memory: What's in a Name? **Immunol Rev**, v.283, p. 7-20, May 2018.

ROSENTHAL, S. R., E. LOEWINSOHN, M. L. GRAHAM, D. LIVERIGHT, M. G. THORNE, AND V. JOHNSON. Bcg Vaccination in Tuberculous Households. **Am Rev Respir Dis**, v.84, p. 690-704, Nov 1961.

ROSET, M. S., A. E. IBANEZ, J. A. DE SOUZA FILHO, J. M. SPERA, L. MINATEL, S. C. OLIVEIRA, G. H. GIAMBARTOLOMEI, J. CASSATARO, AND G. BRIONES. Brucella Cyclic Beta-1,2-Glucan Plays a Critical Role in the Induction of Splenomegaly in Mice. **PLoS One**, v.9, p. e101279, 2014.

SANGARI, F. J., AND J. AGUERO. Molecular Basis of Brucella Pathogenicity: An Update. **Microbiologia**, v.12, p. 207-218, Jun 1996.

SARKAR-TYSON, M., AND H. S. ATKINS. Antimicrobials for Bacterial Bioterrorism Agents. **Future Microbiol**, v.6, p. 667-676, Jun 2011.

SELEEM, M. N., S. M. BOYLE, AND N. SRIRANGANATHAN. Brucellosis: A Re-Emerging Zoonosis. **Vet Microbiol**, v.140, p. 392-398, Jan 27 2010.

SINGH, K. Laboratory-Acquired Infections. **Clin Infect Dis**, v.49, p. 142-147, Jul 1 2009.

SMALE, S. T., A. TARAKHOVSKY, AND G. NATOLI. Chromatin Contributions to the Regulation of Innate Immunity. **Annu Rev Immunol**, v.32, p. 489-511, 2014.

STARR, T., R. CHILD, T. D. WEHRLY, B. HANSEN, S. HWANG, C. LOPEZ-OTIN, H. W. VIRGIN, AND J. CELLI. Selective Subversion of Autophagy Complexes Facilitates Completion of the Brucella Intracellular Cycle. **Cell Host Microbe**, v.11, p. 33-45, Jan 19 2012.

STARR, T., T. W. NG, T. D. WEHRLY, L. A. KNODLER, AND J. CELLI. Brucella Intracellular Replication Requires Trafficking through the Late Endosomal/Lysosomal Compartment. **Traffic**, v.9, p. 678-694, May 2008.

TSOLIS, R. M., G. M. YOUNG, J. V. SOLNICK, AND A. J. BAUMLER. From Bench to Bedside: Stealth of Enteroinvasive Pathogens. **Nat Rev Microbiol**, v.6, p. 883-892, Dec 2008.

UTHAYAKUMAR, D., S. PARIS, L. CHAPAT, L. FREYBURGER, H. POULET, AND K. DE LUCA. Non-Specific Effects of Vaccines Illustrated through the Bcg Example: From Observations to Demonstrations. **Front Immunol**, v.9, p. 2869, 2018.

VELASQUEZ, L. N., M. A. MILILLO, M. V. DELPINO, A. TROTTA, P. FERNANDEZ, R. G. POZNER, R. LANG, *ET AL*. Brucella Abortus Down-Regulates Mhc Class Ii by the Il-6-Dependent Inhibition of Ciita through the Downmodulation of Ifn Regulatory Factor-1 (Irf-1). **J Leukoc Biol**, v.101, p. 759-773, Mar 2017.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v.123, p. 309-314, Feb 24 1956.

WEICHHART, T., M. HENGSTSCHLAGER, AND M. LINKE. Regulation of Innate Immune Cell Function by Mtor. **Nat Rev Immunol**, v.15, p. 599-614, Oct 2015.

WELLEN, K. E., G. HATZIVASSILIOU, U. M. SACHDEVA, T. V. BUI, J. R. CROSS, AND C. B. THOMPSON. Atp-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. **Science**, v.324, p. 1076-1080, May 22 2009.

WHO. Bcg Vaccines: Who Position Paper – February 2018. **Weekly epidemiological report**, v.93, p. 73-96, 2018 2018.

WHO. Brucellosis in Humans and Animals. **World Health Organization**, p. 1-102, 2006.

XIE, M., Y. YU, R. KANG, S. ZHU, L. YANG, L. ZENG, X. SUN, *ET AL*. Pkm2-Dependent Glycolysis Promotes Nlrp3 and Aim2 Inflammasome Activation. **Nat Commun**, v.7, p. 13280, Oct 25 2016.

**APENDICE – ARTIGO PUBLICADO NO PERIODO DO MESTRADO**

Guanylate binding proteins contained in the murine chromosome 3 are important to control mycobacterial infection. Marinho FV, Fahel JS, **De Araujo ACVSC**, Diniz LTS, Gomes MTR, Resende DP, Junqueira-Kipnis AP, Oliveira SC. *J Leukoc Biol.* 2020 Jul 3. doi: 10.1002/JLB.4MA0620-526RR.