

# VACINAS RECOMBINANTE BCG PARA PREVENÇÃO DE TUBERCULOSE EM INDIVÍDUOS HIV+

## BCG RECOMBINANT VACCINES FOR TUBERCULOSIS PREVENTION IN HIV+ INDIVIDUALS

THATYANY GAMA DA ROCHA<sup>1</sup>, LUCAS NOJOSA OLIVEIRA<sup>2</sup>, MARIANA CRISTINA DE MORAIS<sup>3</sup>, ADIBE GEORGES KHOURI<sup>3</sup>, ÁLVARO PAULO SILVA SOUZA<sup>3</sup>, ALEXSANDER AUGUSTO DA SILVEIRA<sup>3</sup>, ADELIANE CASTRO DA COSTA<sup>2,3\*</sup>

1. Acadêmico do curso de graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Goiás; 2. Docente do curso de Biomedicina da Faculdade Estácio de Sá de Goiás. 3. Docente do curso de Farmácia da Faculdade Estácio de Sá de Goiás.

\* Avenida Goiás, 2151, Setor Central, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP: 74063-010. [adeliane.costa@estacio.br](mailto:adeliane.costa@estacio.br)

Recebido em 28/09/2019. Aceito para publicação em 06/10/2019

### RESUMO

A coinfeção da Tuberculose e HIV (TB/HIV) tem caráter mórbido em países em desenvolvimento como o Brasil, onde a chance de uma pessoa infectada com HIV desenvolver ao longo da vida a forma ativa da tuberculose é de proporção escandalosa em relação às pessoas imunocomprometidas. Esta revisão visa analisar o desenvolvimento de vacina rBCG (vacina recombinante de BCG) estudadas buscando a estabilidade, e a capacidade de desencadear resposta imune de longo prazo, principalmente nos locais onde ocorre a infecção. Com preço de custo favorável, boa estabilidade, desenvolvimento de longa memória imune, menor risco de causar toxicidade, a BCG se torna um bom modelo para combinação heteróloga, podendo desencadear além da imunidade contra a micobactéria, também a imunidade contra HIV. Dentre as vacinas apresentadas neste trabalho, aquela que mais apresentou resultados positivos, com indução de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicas, sendo capaz de proteger os animais contra infecção por HIV foi a vacina rBCG [pWB206], e a vacina rBCG/SIVgag mostra-se promissora devido sua capacidade de induzir memória de células TCD8<sup>+</sup> pela adição de glicolípídios que induzem células NK. Ainda não existe vacina em fase de teste em humanos. A coinfeção TB/HIV mundialmente desafiam as políticas públicas de saúde, uma vacina eficaz pode a vim a ser uma maneira de reduzir e prevenir a mortalidade e morbidade frente às duas infecções.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tuberculose; HIV; Vacina; BCG recombinante.

### ABSTRACT

Coinfection of Tuberculosis and HIV (TB-HIV) is morbid in developing countries such as Brazil, where the chance of an HIV-infected person developing the active form of tuberculosis throughout life is scandalous in relation to immunocompromised persons. This review aims to analyze the development of the rBCG vaccine (recombinant BCG vaccine) studied for stability, and the ability to trigger long-term immune response, especially at the sites where the infection occurs. With favorable cost price, good stability, development of long immune memory, lower risk of toxicity,

BCG becomes a good model for heterologous combination, which may trigger, in addition to immunity against the mycobacterium, also immunity against HIV. Among the vaccines presented in this study, the one that presented the most positive results, with induction of specific CD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> cells, being able to protect the animals against HIV infection was the rBCG vaccine [pWB206], and the rBCG/SIVgag vaccine was shown promising because of its ability to induce memory of CD8<sup>+</sup> T cells by the addition of glycoproteins that induce NK cells. There is no vaccine yet in the test phase in humans. TB/HIV coinfection globally challenges public health policies, an effective vaccine may have been a way of reducing and preventing mortality and morbidity in the two infections.

**KEYWORDS:** Tuberculosis; HIV; Vaccine; BCG.

### 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV) é a segunda causa de morte por doenças infecciosas, a qual é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). No mundo estima-se que cerca de 36 milhões de pessoas estejam infectadas com HIV (UNAIDS BRASIL, 2017), provocando uma mortalidade de cerca de 1,8 milhões de pessoas (WANG et al., 2016).

O vírus HIV pertence à família Retroviridae, grupo portador da enzima transcriptase reversa, a qual favorece a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA, sendo então incorporado ao cromossomo do hospedeiro (ARTS; WAINBERG, 1996). Este vírus pertence a subfamília Lentiviridae, favorecendo a multiplicação lenta do vírus (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). O vírus HIV pode ser classificado em HIV-1 e HIV-2 diferenciando-se pelas características genômicas e familiaridade filogenéticas (REQUEIJO, 2006). O HIV-1 é encontrado mundialmente e é o responsável pela maioria das infecções, sendo o HIV-2 mais restringidos aos países africanos (MARLINK et al., 1994). O HIV-1 é subdividido em quatro subgrupos: M, N, O, P; tem o grupo M o mais disperso, que por sua vez possui os subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K. Enquanto que o

vírus HIV-2 possui os subgrupos: A, B, C, D, E, F, G e H (BRASIL, 2016). Mundialmente o subtipo C é mais prevalente (GUIMARÃES et al., 2008).

A estrutura do vírus HIV é constituída por um envelope viral, formado por proteínas e uma bicamada lipídica adquirida durante o brotamento do vírus. O envelope engloba um capsídeo formado pelo agrupamento de capsômeros, contendo em seu interior uma dupla fita de RNA associado com a enzima transcriptase reversa (BARRÉ-SINOSSI et al., 1983; BRASIL, 2014). Na superfície do envelope estão as proteínas de superfície gp120 e proteína transmembrana gp41 codificadas pelo gene Env, as quais são clivadas a partir da proteína gp160. Os outros dois principais genes são: Pol; codificador das enzimas polimerase, transcriptase reversa e integrase. E o gene gag responsável pelas proteínas do cerne p55 e as proteínas do capsídeo: p6, p9, p17 e p24 (BARRÉ-SINOSSI et al., 1983).

Além dos principais genes que são comuns a família dos retrovírus, o vírus HIV-1 contém genes denominados acessórios que garantem a sua virulência. Um desses genes é o Tat, o qual é responsável por estimular a célula hospedeira para que ocorra a replicação do material genético. O gene Rev ordena a ação do RNA mensageiro (mRNA) e estimula a saída para o citoplasma. O gene Nef é de suma importância para a instalação e a continuidade até a condição de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), diminuindo os sinalizadores na superfície da célula infectada, alterando o CD4 e diminuindo a expressão do complexo de histocompatibilidade (LAKE et al., 2003). Semelhante à proteína Nef, a Vpu diminui a expressão de receptores CD4 além de auxiliar a expulsão do vírion para o meio extracelular. Com a ajuda do gene Vif o vírus é montado e realiza o bloqueio da proteína antiviral do hospedeiro. Enquanto que o vírus HIV-2 conta com o auxílio da proteína vpx, diferente do HIV-1 que possui a vpr a qual é utilizada para a entrada do cDNA (DNA complementar) no núcleo da célula alvo (BRASIL, 2014 LAKE et al., 2003).

A infecção pelo HIV pode ser provocada por meio da transmissão do vírus por relação sexual desprotegida, transfusões sanguíneas, uso de drogas injetáveis, acidentes com materiais perfuro-cortantes contaminados e transmissão vertical, podendo ser transmitida ao bebê durante a gestação, durante o parto ou por meio da amamentação (BRASIL, 2014). Após a infecção, o vírus promove a ligação da glicoproteína gp120 ao receptor CD4 da célula hospedeira. Com auxílio dos co-receptores CCR5 ocorre uma mudança conformacional na proteína gp41 que realiza a inserção da parte terminal finalizando com a fusão celular (BRASIL, 2014). Após a infecção, o vírus HIV é encaminhado aos órgãos linfoides pelas células dendríticas e por elas apresentadas principalmente aos linfócitos TCD4. Receptores de quimiocina como o CCR5 e o CXCR4 também auxiliam a ligação do vírus aos macrófagos e monócitos, os quais também são

portadores do receptor CD4 e são infectados, porém em quantidades bem inferiores aos linfócitos TCD4+ (FORSMAN, WEISS, 2008). Uma vez dentro da célula alvo o vírus inicia sua replicação com auxílio da enzima transcriptase reversa através do cDNA que é incorporado ao DNA hospedeiro pela enzima integrase. As novas partículas virais podem realizar brotamento na célula alvo ou podem permanecer de forma latente, ficando assim escondidas do sistema imune por até décadas (WHITCOMB; HUGHES, 1992). Entre sete a vinte e um dias após a exposição ao HIV, mais da metade dos infectados podem apresentar febre e sintomas bem parecidos com a gripe, denominada de Síndrome Retroviral Aguda (SRA). Neste estágio as chances de transmissão são altas devido a elevada taxa de virulência na corrente sanguínea, podendo ser negativo ao exame sorológico, sendo importante a realização de testes moleculares para o mais rápido diagnóstico (DAAR et al., 2001). Após a infecção aguda segue-se a fase crônica da infecção, em que a atividade replicativa do vírus permanece em níveis baixos, mas ainda mantendo a capacidade de transmissão, podendo ser encontrado em achados de linfadenopatia. Alterações no hemograma podem ser observadas, apesar de discretos, como anemias, plaquetopenia e leucopenias. Infecções bacterianas, principalmente no sistema respiratório são os mais constantes, sendo de suma importância o acompanhamento médico e o uso da medicação antiviral, para que essa fase possa perdurar por décadas e retarde a fase da AIDS (POLK et al., 1987). A última fase da infecção é o estabelecimento da AIDS, período em que as taxas de células CD4 ficam abaixo de 200 células/mm, com perda da capacidade de defesa, e aumento das chances de adquirir doenças oportunistas (CDC, 2017). As doenças oportunistas que acometem os imunossuprimidos em geral são inofensivas ou de rápida recuperação em pessoas competentes. Dentre essas tem-se as infecções por fungos, protozoários, outros vírus e bactérias. Dentre as infecções bacterianas, a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose, é de grande importância pública (CDC, 2017).

A Tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Esses bacilos são álcool ácido resistentes, não formadores de esporo; característica conferida pela presença de grande quantidade de lipídeos e ácido micólicos em sua parede (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Sua transmissão ocorre por meio de fluidos respiratórios de uma pessoa infectada a outra saudável. Após a inalação dos bacilos, estes alcançam os alvéolos pulmonares e são englobados por macrófagos alveolares. Como infecção pulmonar primária, *Mycobacterium tuberculosis* possui capacidade de driblar a função do lisossomo dos macrófagos conseguindo permanecer vivo dentro do hospedeiro em sua forma latente. No entanto, em pessoas imunossuprimidas, com a progressão do processo infeccioso, formam-se os

tubérculos que podem romper e disseminar novos bacilos pela corrente sanguínea e linfática (FOCACCIA; VERONESI, 2005). Indivíduos infectados apresentam como sintomas tosse produtiva por mais de duas semanas, a qual pode favorecer o desenvolvimento da Tuberculose ativa ou Tuberculose latente. Cerca de 1/3 da população mundial apresenta a Tuberculose latente, sendo que quase um décimo das pessoas que são infectadas pela micobactéria desenvolve a doença posteriormente, podendo se passar longo período até a doença se manifestar, devido a capacidade do bacilo manter-se adormecido dentro dos macrófagos. Os principais grupos de risco para desenvolver a fase ativa da Tuberculose são: indivíduos HIV positivos, dependentes químicos, presidiários e profissionais de saúde. O diagnóstico é realizado frente as suspeitas clínicas por exame de imagem pulmonar, bacterioscopia do escarro e teste cutâneo com tuberculina (Brasil, 2014).

A imunossupressão presente nos indivíduos infectados com HIV torna-os um grupo de risco para desenvolverem Tuberculose ativa. Porém, apesar da vacina BCG ser considerada segura para serem utilizados em recém nascidos, a mesma não é segura em indivíduos HIV<sup>+</sup>. Diante deste contexto, vários grupos de pesquisa no mundo vem tentando desenvolver uma vacina BCG que possa ser administrada nesse grupo. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre as vacinas BCGs recombinantes que estão sendo desenvolvidas para serem utilizadas em indivíduos infectados com HIV.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa dos artigos foram realizadas utilizando as bases de dados bibliográficas *U.S. National Library of Medicine* (PubMed). Como complementação, foram utilizados livros de imunologia, microbiologia. A busca de dados foi direcionada para os aspectos gerais do desenvolvimento de vacinas recombinantes de BCG, com expressão heteróloga de HIV. Foram selecionados artigos escritos no idioma inglês publicados entre os anos de 2007 a 2017, para elaboração do conhecimento de pesquisas no desenvolvimento de rBCG, com delineamento experimental, realizados em animais e em humanos. Também foram incluídas literaturas menos recentes, nos idiomas português e inglês, consideradas relevantes para a construção histórica e conceitual da apresentação da Tuberculose, HIV, AIDS e vacina BCG. Artigos de revisão foram excluídos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há muitas vantagens em se utilizar a vacina BCG em imunizações, devido a sua baixa toxicidade, potencial de ser um adjuvante, baixo custo e capacidade de induzir resposta imune de longa duração (JOSEPH et al., 2010). Em 1992, Stover e colaboradores desenvolveram um vetor, o pMV261,

que poderia replicar tanto em BCG como em *Escherichia coli*. Desde então, muitos pesquisadores têm construído BCGs recombinantes expressando genes "estranhos" a ela com imunogenicidade suficiente para indução de imunidade humoral e celular que possa proteger o hospedeiro contra infecções virais, bacterianas ou parasitárias.

Em 2007 YU e colaboradores testaram à administração da rBCG contendo proteínas do envelope (ENV) de HIV-1. Foi realizado a imunização de camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semana por via intraperitoneal com doses de  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC),  $10^7$  UFC e  $10^6$  UFC, utilizando a cepa BCG-Pasteur e BCG-Danish. O estudo observou a indução de respostas do linfócito TCD4<sup>+</sup> específicos contra HIV nas mucosas do pulmão e aparelho reprodutivo das cobaias. Observou-se que não ocorreu diferença entre a resposta de linfócitos TCD4<sup>+</sup> contra o bacilo, entre as duas cepas utilizadas, mas nota-se que a resposta por células T foi mais responsiva administrando doses menores. A busca por uma vacina contra o HIV-1 se torna difícil devido à resposta imune de memória não durar por muito tempo (YU et al., 2007).

No mesmo ano foi criada uma vacina BCG recombinante expressando proteínas derivadas do subtipo A (Gag p24-p17) do HIV-1 (HIV.A), a partir de uma vacina BCG auxotrófica de lisina (Cepa Pasteur lysA5: PasteurΔlysA5::res). Esta construção dá origem a vacina denominada BCG.HIVA. Os animais foram imunizados com a vacina BCG parental ou com a vacina BCG. HIVA. Após 102 dias de imunização, foi realizado um reforço com a Vaccinia Ankara Modificada (MVA) expressando o mesmo antígeno do vírus, denominando MVA.HIVA (IM et al., 2007). A MVA é uma vacina atenuada construída a partir do poxvírus (VERHEUST et al., 2012), que vem sendo utilizada como vetor para vacina contra o Poxvírus e outras doenças virais, como o HIV. No trabalho aqui avaliado foi realizada a imunização por meio das vias intramuscular ou intraperitoneal. Foram administrados uma dose de  $10^6$  UFC/ animal da vacina BCG.HIVA em camundongos BALB/c. Após 151 dias de imunização foi avaliado a imunogenicidade da vacina no baço dos animais, sendo observado que a vacina BCG.HIVA induz linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicas produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  semelhante à induzida por BCG parental. No entanto, esta resposta é mais pronunciada quando os animais recebem a vacina BCG.HIVA e booster com MVA.HIVA. Para avaliar a proteção contra a TB, cobaias foram desafiadas com *M. tuberculosis* por via aérea 84 dias após vacinação. Após os animais serem imunizados por via subcutânea, na dose de  $3 \times 10^5$  UFC de BCG-HIVA, BCG parental, os mesmos foram desafiados com Mtb por meio de aerossol. Foi demonstrado que houve indução de resposta semelhante e satisfatória com linfócitos produtores de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (Células polifuncionais). Além disso foi realizada a recuperação da carga bacilar no baço e no pulmão dos animais

vacinados e posteriormente desafiados. Foi constatado que os animais que receberam a vacina BCG.HIVA apresentou uma redução da carga de Mtb nos pulmões e no baço semelhante ao induzido por BCG parental, sendo observado o mesmo padrão de resposta quando se utiliza a estratégia booster. Deste modo, viu-se a possibilidade de usar essa vacina recombinante na substituição a BCG selvagem em recém-nascidos (IM et al., 2007).

Ainda seguindo a plataforma de desenvolvimento da vacina BCG recombinante com o antígeno heterólogo HIVA (BCG-HIV.A), testou a combinação desta vacina com um reforço com Vaccínia Ankara Modificada expressando HIVA adicionando a expressão do antígeno 85A (Ag85A) de Mtb (MVA-HIV.A-85A). Os camundongos BALB/c foram imunizados com a vacina BCG.HIVA ou BCG por via intramuscular nas doses de  $10^6$  UFC/camundongo. Após 12 semanas de imunização, os animais receberam booster com MVA-HIV.A-85A. Após 16 semanas de imunização, foi avaliado a resposta específica utilizando imunoabsorção enzimática ELISPOT de IFN- $\gamma$  por meio de peptídeos que são específicos ao complexo de histocompatibilidade (MHC) MHC-I e ao MHC-II. As respostas produzidas pela BCG.HIVA induziu fracamente linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicas ao vetor, não sendo capaz de impulsionar sozinha uma resposta contra HIV. No entanto, quando se associa a vacina BCG-HIV.A em sistema de prime e adiciona o booster com MVA-HIV.A-85. A, foi observado uma melhor indução de respostas específicas TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> contra antígenos de HIV e Mtb. Além disso a vacina associada ao booster induziu respostas de linfócitos TCD8<sup>+</sup> polifuncionais (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>) (HOPKINS et al., 2011).

Saubí e colaboradores (2012) realizaram pesquisas, utilizando plasmídeo de *Escherichia coli* que possui Titulação Operador Repressor (do inglês: Operator-Repressor Titration (ORT)) (pJH222.HIVA), e a combinação dos imunógenos HIV-A nas cepas de BCG complementado com lisina. Desenvolveram a rBCG (BCG.HIVA) com principal objetivo de testar a eficácia e se havia problemas decorrente a administração da vacina. Testes realizados em camundongos BALB/c adultos (7 semanas de idade) e recém nascidos (7 dias de idade) na dose de  $2 \times 10^6$  UFC/mL ( $10^5$  por camundongo). Os animais receberam reforço com a vacina MVA.HIVA ou MVA.HIVA.85A ( $10^6$  PFU- Unidades Formadoras de Placas- por camundongo) 12 semanas após o prime com BCG.HIVA. Após 14 semanas de imunização os animais foram eutanasiados, sendo verificado que a vacina BCG.HIVA + MVA.HIVA induz linfócitos TCD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> específicos contra proteínas de HIV e contra o PPD, além de linfócitos TCD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. As células TCD8<sup>+</sup> que possuem o marcador CD107a são consideradas células com maior capacidade de desgranular, sendo linfócitos TCD8<sup>+</sup> efetoras mais eficientes (ALTER G. et al.; 2004). Este resultado foi observado em animais adultos, não sendo

verificado em animais recém nascidos, provavelmente devido a ineficiência do sistema imune em induzir a resposta. Apesar disso, esta vacina poderia ser testada em humanos tendo dupla função, para prevenção de HIV e TB.

A substituição de gene de resistência a antibióticos pela inserção de dois genes auxotróficos em plasmídeos recombinantes de *Escherichia coli* utilizados como forma de seleção foi avaliada no presente estudo. Inicialmente um plasmídeo foi transformado em auxotrófico de glicina utilizando a da cepa M15 $\Delta$  glyA. de *E. coli* e utilizando BCG auxotrófico para lisina criou-se a vacina BCG.HIVA<sup>2auxo</sup>. Por meio da plataforma prime booster, os animais foram vacinados com BCG.HIV<sup>2auxo</sup> e seguida de booster com MVA.HIV. Os camundongos BALB/c foram imunizados na primeira semana com  $10^6$  UFC de BCG.HIVA<sup>2auxo</sup> ou BCG e na 5ª semana com MVA.HIVA utilizando a mesma dose por via intramuscular. Após 2 semanas os animais foram eutanasiados, e por meio da análise da imunogenicidade foi observado que a vacina induz uma resposta similar a vacina BCG com uma melhor resposta de linfócitos TCD8<sup>+</sup> polifuncionais contra HIV (SAUBI et al., 2014).

No estudo de Kim e colaboradores (2011), uma rBCG foi construída (rBCG-mV3) expressando o domínio variável V3 de gp120 do vírus HIV (mV3). A avaliação da imunogenicidade, por meio do estudo da resposta imune humoral e celular foi realizada em cobaias guinea pigs e camundongos, os quais foram imunizados a vacina rBCG-mV3. Foi observado que a vacina rBCG-mV3 induziu quantidade de anticorpos anti-mV3 no soro dos camundongos imunizados, porém este soro não foi capaz de inibir a replicação de HIV *in vitro*, indicando que ele não contém anticorpos neutralizantes. Em guinea pigs, a resposta de hipersensibilidade tardia (DTH - delayed type hypersensitivity) antígeno-específica e os altos títulos de IgG2a V3-específicos nos camundongos imunizados com rBCG sugerem que essa vacina também induziu forte imunidade mediada por células e memória imunológica contra V3 (KIM et al., 2011).

Kim e colaboradores (2011) combinou a BCG com a região de laço da proteína gp120, denominada de loop V3, criando a rBCG-mV3. Após 98 dias de imunização dos camundongos BALB/c, foram obtidos altos títulos de anticorpos contra mV3. Porém o teste com soro obtido das cobaias não foi eficaz em impedir a replicação viral *in vitro*. A BCG-mV3 recombinante foi eficiente na indução de imunidade dependente de células Th1 humoral específica de V3 que persiste durante pelo menos 14 semanas. As cobaias também foram administradas com a mesma dose da recombinante e testado a hipersensibilidade tardia frente ao PPD, uma semana após reforço e um mês após a primeira aplicação. Por meio deste teste observou-se que a vacina induz células específicas contra três vezes mais em relação a vacina BCG.

Chapman et al., desenvolveram uma vacina BCG capaz de expressar a proteína gag do vírus HIV-1 subtipo C. As proteínas do tipo Gag são responsáveis pela montagem das partículas virais (FREED, 1998). O gene que codifica a proteína gag foi inserido no plasmídeo pHS400, o qual foi transformado em BCG Pasteur tipo selvagem (BCG-gag) e BCG Pasteur auxotrófica para o ácido pantotênico (BCGpan-gag). A vacinação de camundongos com BCG-gag resultou em aumento no número de granulomas formados quando comparados com animais que foram vacinados com BCGpan-gag. Ao contrário, BCGpan-gag, após booster com MVA-gag, foi capaz de induzir maiores níveis de linfócitos TCD8<sup>+</sup> específicos, em relação a BCG-gag. Enquanto a BCG-gag, após booster, foi mais indutora de linfócitos TCD4<sup>+</sup> específicos. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicos são capazes de induzir produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 pelos esplenócitos, sendo que a BCGpan-gag foi maior indutora de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mas também indutora de IL-6 porém em menor quantidade em relação a BCG-gag. Após o desafio desses animais com Mtb foi observado que a proteção está associada com respostas TCD8<sup>+</sup>, indicando que a resposta imune celular CD8<sup>+</sup> HIV-específica induzida por BCGpan-gag foi protetora (CHAPMAN et al., 2012).

Chapman e colaboradores (2013) testaram como vetor para os genes gag, rt (transcriptase reversa) e env do vírus HIV, nas cepas de *M. bovis* BCG Pasteur e na cepa auxotrófica para pantotenato (BCG-panCD). Os pesquisadores realizaram um sistema de vacinação prime booster. Os testes foram realizados em camundongos BALB/c na dose de 10<sup>7</sup> UFC e 10<sup>5</sup> UFC por camundongo de BCG ou rBCG. Após 28 dias de imunização, os animais receberam booster com a vacina recombinante MVA (rMVA) na concentração de 10<sup>4</sup> UFP por camundongo. Após 40 dias de imunização, os animais foram eutanasiados, sendo avaliado a resposta imune induzida no baço dos animais. Entre as duas cepas estudadas, a cepa auxotrófica foi capaz de induzir melhor resposta de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicas contra HIV, favorecendo a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, mais do que observado na vacina parental. Devido a utilização de uma vacina auxotrófica para pantotenato, baseado na utilização desta mesma cepa para expressão de proteínas de Mtb, o qual vem sendo utilizado em fase clínica, o autor propõe que a vacina BCG-panCD seja mais segura que a forma selvagem, pois utiliza um vetor para vacinação heteróloga em imunocomprometidos (CHAPMAN et al., 2013).

No ano seguinte, foi desenvolvido uma vacina BCG recombinante expressando HIV-A que é derivado da proteína Gag a partir de auxotrófico de lisina de BCG. A vacina foi administrada no sistema prime booster, sendo que os camundongos BALB/c receberam uma dose de 10<sup>6</sup> UFC desta rBCG (BCG[pWB206]) por via intraperitoneal. Após 56 dias de imunização, os animais receberam o esquema booster com a vacina rMVA-gag por via intramuscular. Após 68 dias de

imunização, os animais foram eutanasiados para avaliação da resposta imune induzida no baço. Foi observado que este esquema vacinal induz células TCD8<sup>+</sup> específicas para a proteína Gag. Para o ensaio de proteção, os animais foram imunizados com doses diferentes da vacina rBCG. Após 2 semanas de imunização, os animais foram desafiados com o vírus HIV-1 (VV-GagC), sendo observado que os animais que receberam 3 doses da vacina rBCG apresentou uma clara redução da carga viral, protegendo os animais desafiados. Deste modo, esta vacina vem sendo proposta para ser utilizada em substituição da vacina BCG selvagem em recém-nascidos, sendo necessários a realização de outros testes (CHAPMAN et al., 2014).

As células T Natural Killer (NK.T) são importantes na cascata de ativação de células TCD8<sup>+</sup>. As células NK.T auxiliam a ativação e diferenciação dos linfócitos TCD8 por meio da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ . As células NK.T pertencem a imunidade inata, sendo ativadas na presença de glicolípidios do grupo  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GC). Deste modo, foi realizado a construção de uma vacina BCG recombinante capaz de expressar glicolípidios. Para isso, foi realizado a adição de glicolípidios na cepa BCG-Danish expressando também a proteína Gag do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), o qual é equivalente ao HIV humano, dando origem a vacina rBCG/SIVgag. Após 8 semanas de imunização, foi realizado um esquema de booster com a vacina de subunidade proteica rAd5-SIV gag. Foi demonstrado que este esquema vacinal induz aumento de células NK.T bem como de linfócitos TCD8<sup>+</sup> específicas. Além disso, foi observado que este esquema vacinal também induz linfócitos TCD8<sup>+</sup> de memória central (TCD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), representando um aspecto muito positivo no contexto vacinal (VENKATASWAMY et al., 2014).

Em pesquisas realizadas por Sixsmith e colaboradores, foi testado a eficácia de diferentes vacinas rBCG contendo a proteína gag do Vírus da Imunodeficiência Símia, quanto a capacidade de induzir linfócitos TCD8<sup>+</sup>, utilizando como cobaia primatas não humanos. As cobaias foram separadas em sete grupos: grupo imunizado com BCG, um grupo com a vacina de vetor parental BCG-pSL10-SIV gag ou BCG-pSL7-SIV gag; outros grupos com rBCG mutantes com deleção do *operon* e um grupo controle que recebeu DNA plasmidial (rDNA) (Todos expressando SIV gag). As primeiras imunizações foram realizadas na dose 3 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU por via intravenosa. Cerca de 40 dias após a imunização, os grupos receberam booster rNYVAC-SIV gag-pol a 10<sup>7</sup> PFU. As cobaias foram desafiadas toda semana com vírus SIVmac251 vírus (9,0-log cópias/ml). Após 43 semanas de administração do booster, observou-se que linfócitos TCD8<sup>+</sup> foram fortemente induzidos contra a proteína SIV Gag. Porém, frente ao desafio com várias exposições com SIVmac251, a resposta imune gerada após a imunização não foi suficiente para controlar a infecção, demonstrando que o sistema vacinal não foi eficaz (SIXSMITH et al., 2014).

Korioth-Schmitz e colaboradores realizaram testes em primatas não humanos da espécie *Rhesus*. Os animais foram imunizados com uma dose de  $3 \times 10^8$  UFC/ camundongo da vacina BCG e rBCG (rBCG SIVgag) por via intravenosa. Após 10 meses os animais foram novamente imunizados com a vacina atenuada NYVAC gag-pol. A resposta frente à micobactérias foram medidas utilizando PPD e interferon- $\gamma$  ELISPOT e posteriormente comparadas com dois grupos de pessoas negativas para HIV e para o PPD. Os testes não foram bem-sucedidos, pois após a segunda administração da vacina a imunogenicidade estava diminuída. Pode-se concluir também que os primatas não humanos da espécie *Rhesus* são um bom modelo de substituição aos humanos (KORIOTH-SCHMITZ et al., 2015).

Tullius e colaboradores (2008) criaram duas vacinas rBCGs a partir da recombinante que expressa o antígeno 85B de Mtb. A primeira é a mutante (rBCG mbt30) com deleção na micobactina, proteína necessária à sobrevivência bacteriana em limitação de ferro. Enquanto que a segunda vacina a rBCG panCD30 (auxotrófica para o ácido pantotênico), cresce lentamente na ausência deste gene. As vacinas foram administradas na dose de  $10^8$  UFC em camundongos com Imunodeficiência Combinada Severa (SCID). Foi observado que a vacina rBCG mbt30 foi mais eficiente que a forma selvagem, sendo uma boa alternativa para substituir a vacina BCG em pessoas imunocomprometidas. O mesmo foi observado para a vacina rBCG panCD 30.

A utilização de cepas de Mtb vem sendo abordada no contexto vacinal. Em um dos trabalhos foram testadas três vacinas recombinante de *M. tuberculosis* contendo o gene gag de HIV. Os testes foram realizados em Macaca mulata recém-nascidos saudáveis e por portadores de SIV. Dentre as vacinas testadas, uma mostrou-se mais eficiente no estímulo a linfócitos T e linfócitos B, quando administradas por via intradérmica de cobaias imunocomprometidas. Além de desenvolverem uma boa resposta imune contra o vírus, os animais não desenvolveram tuberculose (JENSEN et al., 2012).

#### 4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de uma vacina contra Tuberculose e HIV é difícil pois a resposta imune gerada deve ser eficaz e duradoura para ambas infecções. Além disso, uma vacina contra HIV deve contemplar uma resposta imune que possa driblar as recentes mutações virais, e abranger as formas variantes do vírus. A coinfeção de TB/HIV é um desafio mundial, sendo um sério problema de saúde pública. O desenvolvimento de uma vacina eficaz pode ser uma maneira de reduzir e prevenir a mortalidade e morbidade frente as duas infecções. Porém a construção de uma vacina contra a Tuberculose que possa ser utilizada em crianças HIV<sup>+</sup> ainda é incerta.

Dentre as vacinas apresentadas neste trabalho, aquelas que mais apresentaram resultados positivos foram as vacinas rBCG[pWB206] e rBCG/SIVgag. A vacina rBCG[pWB206] favoreceu a indução de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicas, sendo capaz de proteger os animais contra infecção por HIV. E a vacina rBCG/SIVgag parece promissora devido a capacidade de induzir células TCD8<sup>+</sup> de memória.

Apesar dessas vacinas induzirem boas respostas, para possam ser testadas em humanos vários problemas devem ser solucionados, dentre eles a instabilidade e o difícil estímulo de resposta imune de memória. Portanto, as pesquisas realizadas até o momento não são satisfatórias, não havendo uma vacina BCG recombinante sendo testadas em humanos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Doutora Ana Paula Junqueira Kipnis por permitir que eu realizasse o estágio Pós Doutoral no Laboratório de Imunopatologia das Doenças infecciosas do IPTSP/UFG. Agradeço ao CNPq pela bolsa de Pós doutorado que recebi durante o período em que orientei o TCC da aluna.

#### 6. REFERÊNCIAS

- [1] ALTER, Galit; MALENFANT, Jessica M.; ALTFELD, Marcus. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 294, n. 1-2, p.15-22, nov. 2004. Elsevier BV <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>.
- [2] ARTS, Eric J.; WAINBERG, Mark A.. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Early Events in Reverse Transcription. **Advances in Virus Research**, [s.l.], p.97-163, 1996. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60071-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60071-8).
- [3] BARRÉ-SINOUSSE, F. J. C. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**. vol 20, n 220, p. 868-71. May, 1983
- [4] BARRETO, Mauricio L.; PEREIRA, Susan M.; FERREIRA, Arlan A.. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.45-55, jul. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0021-75572006000400006>.
- [5] BEZUIDENHOUT, Juanita et al. Pleural Tuberculosis in Patients with Early HIV Infection Is Associated with Increased TNF-Alpha Expression and Necrosis in Granulomas. **Plos One**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.: e4228, 19 jan. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004228>.
- [6] BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV**. Brasília, 2014

- [7] BRASIL. Tuberculose. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, FUNASA, Editor. Ministério da Saúde: Brasília, DF. 2002.
- [8] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Usa) (Org.). **Division of HIV/AIDS Prevention**. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hiv/basics/livingwithhiv/opportunisticinfections.html>>. Acesso em: 12 out. 2017.
- [9] CHAPMAN R, BOURN WR, SHEPHARD E, STUTZ H, DOUGLASS N, et al. (2014) The Use of Directed Evolution to Create a Stable and Immunogenic Recombinant BCG Expressing a Modified HIV-1 Gag Antigen. **PLoS ONE** 9(7): e103314. doi:10.1371/journal.pone.0103314
- [10] CHAPMAN R, SHEPHARD E, STUTZ H, DOUGLAS N, SAMBANDAMURTHY V, GARCIAI, RYFFEL B, JACOBS W, WILLIAMSON AL. (2012). Priming with a Recombinant Pantothenate Auxotroph of *Mycobacterium bovis* BCG and Boosting with MVA Elicits HIV-1 Gag Specific CD8<sup>+</sup> TCells. **Plos one**, 7, 1-11.
- [11] CHAPMAN, Rosamund et al. Priming with Recombinant Auxotrophic BCG Expressing HIV-1 Gag, RT and Gp120 and Boosting with Recombinant MVA Induces a Robust T Cell Response in Mice. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.71601-71601, 20 ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071601>
- [12] COHEN, Karen; MEINTJES, Graeme. Management of individuals requiring antiretroviral therapy and TB treatment. **Current Opinion In HIV And Aids**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.61-69, jan. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/coh.0b013e3283339309>.
- [13] COSTA, Mcn; MOTA, Ela; PINTO, Lls. Feito protetor do BCG intradérmico na meningite tuberculosa. **Bol Of Sanit Panam**, A, n. 110, p.26-32, 1991
- [14] DAAR, Eric S. et al. Diagnosis of Primary HIV-1 Infection. **Annals Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 134, n. 1, p.25-9, 2 jan. 2001. American College of Physicians. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-134-1-200101020-00010>
- [15] DIEDRICH, C. R.; FLYNN, J. L. HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* Coinfection Immunology: How Does HIV-1 Exacerbate Tuberculosis. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 79, n. 4, p.1407-1417, 18 jan. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01126-10>.
- [16] FORSMAN A, WEISS RA. Why is HIV a pathogen? **Trends Microbiol**. 2008;16(12):555-560
- [17] GLYNN, Judith R et al. Effects of duration of HIV infection and secondary tuberculosis transmission on tuberculosis incidence in the South African gold mines. **Aids**, [s.l.], v. 22, n. 14, p.1859-1867, set. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qad.0b013e3283097cfa>.
- [18] GUIMARÃES, Monick L et al. Identification of two new CRF<sub>BF</sub> in Rio de Janeiro State, Brazil. **Aids**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.433-435, jan. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qad.0b013e3282f47ad0>.
- [19] HOPKINS, Richard et al. Dual Neonate Vaccine Platform against HIV-1 and M. tuberculosis. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.20067-20067, 13 maio 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020067>
- [20] IM, E.-j. et al. Vaccine Platform for Prevention of Tuberculosis and Mother-to-Child Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 through Breastfeeding. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 81, n. 17, p.9408-9418, 27 jun. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00707-07>.
- [21] JENSEN, K. et al. A Recombinant Attenuated *Mycobacterium tuberculosis* Vaccine Strain Is Safe in Immunosuppressed Simian Immunodeficiency Virus-Infected Infant Macaques. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.]california, v. 19, n. 8, p.1170-1181, 13 jun. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00184-12>
- [22] JOSEPH, Joan et al. Molecular Characterization of Heterologous HIV-1gp120 Gene Expression Disruption in *Mycobacterium bovis* BCG Host Strain: A Critical Issue for Engineering Mycobacterial Based-Vaccine Vectors. **Journal of Biomedicine And Biotechnology**, [s.l.], v. 2010, p.1-10, 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/357370>.
- [23] KIM, Young Jae et al. Efficiency of Recombinant Bacille Calmette-Guérin in Inducing Humoral and Cell Mediated Immunities against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Third Variable Domain in Immunized Mice. **Yonsei Medical Journal**, Korea., v. 52, n. 1, p.173-180, 2011. <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2011.52.1.173>
- [24] KORIOETH-SCHMITZ, Birgit et al. Rhesus immune responses to SIV Gag expressed by recombinant BCG vectors are independent from pre-existing mycobacterial immunity. **Vaccine**, [s.l.], v. 33, n. 42, p.5715-5722, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.010>.
- [25] LAKE, Julie-anne et al. The role of Vif during HIV-1 infection: interaction with novel host cellular factors. **Journal of Clinical Virology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.143-152, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00113-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00113-0)
- [26] MARLINK, R et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**, [s.l.], v. 265, n. 5178, p.1587-1590, 9 set. 1994. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.7915856>.
- [27] MARTINS, M. A. et al. Vaccination with gag, vif, and nef Gene Fragments Affords Partial Control of Viral Replication after Mucosal Challenge with SIVmac239. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 88, n. 13, p.7493-7516, 16 abr. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00601-14>.

- [28] MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A.. **Microbiologia Médica**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009
- [29] PEREIRA, Susan M et al. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.59-66, set. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102007000800009>.
- [30] POLK, B. Frank et al. Predictors of the Acquired Immunodeficiency Syndrome Developing in a Cohort of Seropositive Homosexual Men. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 316, n. 2, p.61-66, 8 jan. 1987. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198701083160201>.
- [31] REQUEJO, Henry I Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Saúde Pública**, São Paulo, p.331-345, 2006.
- [32] SAUBI N, GeaMallorqui E, Ferrer P, Hurtado C, SánchezÚbeda S,Eto Y,Gatell JM, Hanke T,Joseph J. 2014. Engineering new mycobacterial vaccine design for HIV-TB pediatric vaccine vectored by lysine auxotroph of BCG. **Mol Ther Methods Clin Dev** 1:14017. 10.1038/mtm.2014.17.
- [33] SAUBI, Narcís et al. Pre-Clinical Development of BCG.HIVACAT, an Antibiotic-Free Selection Strain, for HIV-TB Pediatric Vaccine Vectored by Lysine Auxotroph of BCG. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 8, p.42559-42559, 21 ago. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042559>.
- [34] SIXSMITH, J. D. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Vectors Prime for Strong Cellular Responses to Simian Immunodeficiency Virus Gag in Rhesus Macaques. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.1385-1395, 30 jul. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00324-14>.
- [35] SONNENBERG, Pamela et al. HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mine workers. **The Lancet**, [s.l.], v. 358, n. 9294, p.1687-1693, nov. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)06712-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(01)06712-5).
- [36] STERNE, JA; RODRIGUES, LC; GUEDES, IN. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? **International Union Against Tuberculosis And Lung Disease**, v. 3, n. 2, p.200-2007, 1998.
- [37] TULLIUS, M. V. et al. A Replication-Limited Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine against Tuberculosis Designed for Human Immunodeficiency Virus-Positive Persons Is Safer and More Efficacious than BCG. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 76, n. 11, p.5200-5214, 25 ago. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00434-08>.
- [38] VENKATASWAMY, Manjunatha M. et al. Improving *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin as a Vaccine Delivery Vector for Viral Antigens by Incorporation of Glycolipid Activators of NKT Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.108383-108383, 25 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108383>
- [39] VERHEUST C. et al. Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA) -based vectors used for gene therapy or vaccination. **Vaccine**, Epub, v. 16, n. 30, p.2623-2632, 2012.
- [40] WANG, Zihao et al. Comprehensive Characterization of Reference Standard Lots of HIV-1 Subtype C Gp120 Proteins for Clinical Trials in Southern African Regions. **Vaccines (basel)**, Published Online, v. 2, n. 4, p.17-17, jun. 2016
- [41] WHITCOMB, J M; HUGHES, S H. Retroviral Reverse Transcription and Integration: Progress and Problems. **Annual Review Of Cell Biology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.275-306, nov. 1992. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.001423>.
- [42] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2017 Geneva: WHO; 2017. 259 p
- [43] YU, J.-s. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Elicits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope-Specific T Lymphocytes at Mucosal Sites. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 14, n. 7, p.886-893, 16 maio 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00407-06>.