

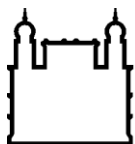
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DA VACINA BCG MOREAU NA  
EXPRESSÃO DE MARCADORES FENOTÍPICOS E NO PERFIL DE  
PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM ADULTOS E NEONATOS

LAWRENCE HENRIQUE PAZ ALBUQUERQUE

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Lawrence Henrique Paz Albuquerque*

Avaliação do efeito *in vitro* da vacina BCG Moreau na expressão de marcadores fenotípicos e no perfil de produção de citocinas em adultos e neonatos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2021

Albuquerque, Lawrence Henrique Paz.

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DA VACINA BCG MOREAU NA EXPRESSÃO DE MARCADORES FENOTÍPICOS E NO PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM ADULTOS E NEONATOS / Lawrence Henrique Paz Albuquerque. - Rio de Janeiro, 2021.

171 f.; il.

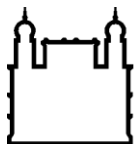
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientador: Paulo Renato Zuquim Antas.

Bibliografia: f. 85-153

1. BCG MOREAU. 2. MARCADORES FENOTÍPICOS. 3. CITOCINAS. 4. MONÓCITOS. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: LAWRENCE HENRIQUE PAZ ALBUQUERQUE***

**AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DA VACINA BCG MOREAU NA  
EXPRESSÃO DE MARCADORES FENOTÍPICOS E NO PERFIL DE  
PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM ADULTOS E NEONATOS**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas**

**Aprovada em: 22 / 12 / 2021**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino - Presidente** (IOC/FIOCRUZ)  
**Prof. Dra. Paula Mello De Luca** (IOC/FIOCRUZ)  
**Prof. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa** (IGM/FIOCRUZ)  
**Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro** (IOC/FIOCRUZ)  
**Prof. Dra. Alessandra D'Almeida Filardy** (UFRJ/RJ)

Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de Lawrence Henrique Paz Albuquerque, sob orientação do Dr. Paulo Renato Zuquim Antas. Ao vigésimo segundo dia do mês de dezembro de dois mil vinte e um, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: “Avaliação do efeito *in vitro* da vacina BCG Moreau na expressão de marcadores fenotípicos e no perfil de produção de citocinas em adultos e neonatos”, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia e Patogênese de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Paulo Renato Rivas Totino – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Paula Mello De Luca– IOC/FIOCRUZ, Dr. Theolis Costa Barbosa Bessa – IGM/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro- IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Alessandra D’Almeida Filardy - UFRJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 22 de dezembro de 2021.

Dr. Paulo Renato Rivas Totino (Presidente da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho ao meu amado filho, Gustavo.  
Que um dia eu possa te inspirar a buscar o seu  
caminho.

## **AGRADECIMENTOS**

Um dia, durante os anos de graduação, estava com meu filho Gustavo, e ele me perguntou: “papai, o que você faz?”. Eu estava na metade do curso, e havia apenas começado a minha Iniciação Científica no IOC/FIOCRUZ. Ainda sem um futuro definido, respondi assim mesmo: “eu sou cientista”. Com a inocência e o brilho nos olhos próprios de uma criança, ele me disse: “também quero ser cientista”. Então eu tive que me tornar um.

Agradeço primeiramente muito a Deus e à minha amada família, minha mãe Edna, minha irmã Diana, minha tia Maria Niete e ao meu pai Celso, pelo apoio e suporte ao longo desse trajeto, sempre ao meu lado em qualquer percalço.

Aos meus amigos épicos, José, Daniel, Santiago, Paola, Rebecca, Mara, Carlos, Diego e Lucas, por me sustentarem de fé e confiança, e enxergarem em mim coisas que nem eu pude ver, e a todos os outros que puderam rir e chorar comigo ao longo desse processo. Vocês são o fomento da minha alma.

Ao meu orientador, Paulo Antas, pela oportunidade e guia, e por deixar eu voar o mais alto que eu me arrisquei. Demos muitos passos juntos, e não serão os últimos, porquê o que se encerra é o prazo, não o trabalho.

A todo o grupo do nosso laboratório, a todos os doutores e colegas, em especial ao Carlos, Matheus, Andreon, Leandro, João, Mariana, Sandra, Thatiane, Bárbara, Ana e Maria, que foram de colegas a amigos, os quais espero levar para a vida.

Agradeço imensamente à coordenação do programa de pós-graduação em Biologia Parasitária, e a todos os seus coordenadores e professores, pela oportunidade única, pela paciência e disposição, e pela eterna luta por nós e pela ciência. Que eu possa retornar em dobro tudo que foi feito por mim.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, ao Instituto Oswaldo Cruz e a Fundação Oswaldo Cruz, por investirem na ciência e em mim, especialmente durante o período conturbado que vivemos.

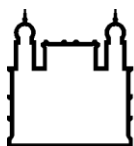
Agradeço a todos os profissionais que me auxiliaram no processo, à Evelyn Pereira pela enorme paciência e zelo, à plataforma de citometria de fluxo do IOC e a Cynthia Cascabulho pela revisão nas análises de citometria, ao Edson de Assis do Laboratório de Imunofarmacologia, à equipe do Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos por sempre disporem seus equipamentos para nossas análises, e a todos os que contribuíram e criticaram este trabalho.

Agradeço também ao revisor, pelo trabalho hercúleo, e aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais.



*“Olhai para as aves do céu, que nem semeiam, nem segam, nem ajuntam em celeiros; e vosso Pai celestial as alimenta. Não tendes vós muito mais valor do que elas?”*

**(Mateus 6:26)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DA VACINA BCG MOREAU NA EXPRESSÃO DE MARCADORES FENOTÍPICOS E NO PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM ADULTOS E NEONATOS

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Lawrence Henrique Paz Albuquerque

A tuberculose (TB), doença infecciosa milenar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e que comumente atinge os pulmões, é um grave problema de saúde pública mundial. O *M. bovis* BCG é a única vacina secular contra TB aprovada e disponível para uso em todo o mundo, sendo aplicada para prevenir as formas graves da doença em crianças. Mesmo assim, pouco ainda se sabe sobre os seus mecanismos protetores. Neste estudo, buscamos identificar a capacidade da vacina BCG Moreau de modular *in vitro* a expressão dos marcadores fenotípicos TLR4, B7-1, DEC-1, TIM-3 e EP2 em células mononucleares de adultos vacinados e neonatos sem vacinas prévias, avaliando, paralelamente, os níveis de mediadores imunológicos produzidos. As células mononucleares foram analisadas através do método de citometria de fluxo e os sobrenadantes de cultura foram dosados através de método singular (ELISA) e multiplex (Luminex e CBA). A vacina Moreau BCG induziu um maior percentual de células expressando TLR4, B7-1 ( $p < 0,05$ ), DEC-1 e EP2 ( $p < 0,005$ ) em monócitos de doadores adultos, mas não em neonatos. A vacina BCG Moreau foi capaz de induzir um aumento nos níveis de PGE2, IL-10, IL-22, TNF ( $p < 0,001$ ), IL-17F, IL-21, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33 e sCD-40L ( $p < 0,005$ ), mas uma diminuição nos níveis de MCP-1 ( $p < 0,005$ ) em doadores adultos vacinados com BCG. Já nos doadores neonatos não vacinados, houve uma diminuição nos níveis de IL-18 ( $p < 0,005$ ) e TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ), e um aumento nos níveis *in vitro* de IL-2 ( $p < 0,05$ ), G-CSF, GM-CSF e MIP-1 $\beta$  ( $p = < 0,001$ ). Em ambos os grupos estudados, encontramos um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-8 ( $p < 0,001$ , neonatos;  $p < 0,05$ , adultos). Em geral, a vacina BCG Moreau demonstrou ser capaz de induzir *in vitro* moléculas de superfície nos monócitos de adultos saudáveis já primados com a vacina BCG, assim como uma expressão diferencial de citocinas nos dois grupos avaliados, as quais possivelmente estão relacionadas à proteção da TB.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EVALUATION OF THE *IN VITRO* EFFECT OF BCG MOREAU VACCINE ON THE EXPRESSION OF PHENOTYPIC MARKERS AND CYTOKINE PRODUCTION PROFILE IN ADULT AND NEONATES

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Lawrence Henrique Paz Albuquerque

Tuberculosis (TB), an ancient infectious disease triggered by *Mycobacterium tuberculosis* that commonly affects the lungs, is a serious public health problem worldwide. The *M. bovis* BCG is the only secular vaccine against TB approved and available for use globally, being applied to prevent the severe forms of the disease in children. Even so, little is known about its protective mechanisms. In this study, we aim to identify the ability of the BCG Moreau vaccine to modulate the *in vitro* expressions of the phenotypic markers TLR4, B7-1, DEC-1, TIM-3 and EP2 in mononuclear cells from vaccinated healthy adult and neonates without previous vaccines, evaluating, in parallel, the levels of immunological mediators produced. Mononuclear cells were analyzed using the flow cytometry, and the culture supernatants were assayed using the single (ELISA) and multiplex (Luminex and CBA) approaches. The Moreau BCG vaccine induced an higher percentage of cells expressing TLR4, B7-1 ( $p < 0,05$ ), DEC-1 and EP2 ( $p < 0,005$ ) in monocytes from adult donors, but not in neonates. The BCG Moreau vaccine was able to induce increased levels of PGE2, IL-10, IL-22, TNF ( $p < 0,001$ ), IL-17F, IL-21, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33 and sCD-40L ( $p < 0,005$ ), but decreased MCP-1 levels ( $p < 0,005$ ) in BCG-vaccinated adult donors. In non-vaccinated newborn donors, there was a decrease in IL-18 ( $p < 0,005$ ) and TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) levels, and an increase in the IL-2 ( $p < 0,05$ ), G-CSF, GM-CSF and MIP-1 $\beta$  ( $p = < 0,001$ ) levels. In both groups studied, we found an increase in IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A and IL-8 levels ( $p < 0,001$ , neonates;  $p < 0,05$ , adults). In general, the BCG Moreau vaccine was able to induce *in vitro* surface molecules on monocytes from healthy adults already primed with the BCG vaccine, as well as a differential expression of cytokines in the two groups evaluated, which are possibly related to TB protection.

# ÍNDICE

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Epidemiologia.....	3
1.1.1 – Global .....	3
1.1.2 – Brasil.....	6
1.2 – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	7
1.3 – Infecção e patogenia .....	9
1.4 – Diagnósticos clínico e laboratorial .....	11
1.5 – Prevenção .....	14
1.6 – Resposta imune à tuberculose.....	15
1.6.1 – Resposta imune inata .....	15
1.6.2 – Reconhecimento de Mtb.....	17
1.6.3 – Fagocitose.....	20
1.6.4 – Apresentação antigênica .....	22
1.6.5 – Resposta imune adquirida.....	23
1.7 – Respostas imunes de citocinas durante a infecção por Mtb .....	27
1.7.1 – Fatores de Crescimento .....	28
1.7.2 – Interleucina-1 (IL-1).....	29
1.7.3 – Interleucinas-31 e 33 (IL-31 e IL-33).....	29
1.7.4 – Interleucina-6 (IL-6).....	30
1.7.5 – Prostaglandina E2 (PGE2) e Leucotrieno B4 (LTB4).....	30
1.7.6 – Interleucina-2 e 7 (IL-2 e IL-7) .....	31
1.7.7 – Interleucina-12 (IL-12) .....	32
1.7.8 – Interferon do tipo I (IFN-I).....	33
1.7.9 – Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina-18 (IL-18) .....	34
1.7.10 – Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	35
1.7.11 – Ligante de CD40 Solúvel (sCD40L) .....	35
1.7.12 – Interleucina-23 e 27 (IL-23 e IL-27) .....	36
1.7.13 – Interleucina-17 (IL-17) .....	37
1.7.14 – Interleucina-21 e 22 (IL-21 e IL-22) .....	38
1.7.15 – Fatores de remodelamento tecidual .....	39
1.7.16 – Interleucina-4 e 10 (IL-4 e IL-10) .....	39
1.7.17 – Interleucina-5 e 13 (IL-5 e IL-13) .....	40

1.7.18 – Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) .....	41
1.7.19 – Quimiocinas .....	41
1.8 – Justificativa .....	44
2 – OBJETIVOS .....	44
2.1 – Objetivo Geral .....	44
2.2 – Objetivos específicos .....	44
3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
3.1 – Biossegurança .....	45
3.2 – Permissão ética e sigilo .....	45
3.3 – População estudada .....	45
3.4 – Coleta de sangue .....	46
3.5 – Purificação das amostras .....	46
3.6 – Infecção <i>in vitro</i> com a vacina BCG Moreau .....	47
3.7 – Citometria de fluxo .....	47
3.7.1 – Marcação com anticorpos monoclonais .....	47
3.7.2 – Leitura no citofluorímetro e análises fenotípicas .....	48
3.8 – Ensaio de função imune pela detecção de mediadores imunológicos solúveis .....	49
3.8.1 – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) .....	50
3.8.2 – Ensaio por Cytometric Bead Array (CBA) .....	51
3.8.3 – Ensaio por Luminex .....	51
3.9 – Análises Estatísticas .....	52
4 – RESULTADOS .....	53
4.1 – Marcadores fenotípicos .....	53
4.1.1 – A infecção <i>in vitro</i> de monócitos humanos com a vacina BCG Moreau modula a expressão de receptores da resposta imune inata em diferentes momentos. ....	53
4.1.2 – A infecção <i>in vitro</i> com a vacina BCG Moreau induz um aumento da expressão de marcadores de superfície TLR4, B7-1, DEC-1 e EP2 em monócitos humanos de doadores adultos saudáveis. ....	54
4.1.3 – A infecção <i>in vitro</i> com a vacina BCG Moreau não modulou a expressão de marcadores de superfície em monócitos humanos de doadores neonatos saudáveis... ..	55
4.1.4 – A vacina BCG Moreau induz uma expressão diferencial dos marcadores fenotípicos TLR4, B7-1 e DEC-1 em neonatos e adultos. ....	56
4.2 – Secreção de mediadores imunológicos solúveis .....	57
4.2.1 – A vacina BCG Moreau induziu <i>in vitro</i> um aumento da secreção de IL-1 $\beta$ em adultos e neonatos por um ensaio singular. ....	57

4.2.2 – A vacina BCG Moreau induziu <i>in vitro</i> um aumento da secreção de IL-1 $\beta$ , além de IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-6, IL-8 e TNF, em adultos e neonatos por ensaios Multiplex. ....	58
5 – DISCUSSÃO .....	61
6 – CONCLUSÕES .....	84
7 – PERSPECTIVAS .....	84
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de incidência da tuberculose no mundo (por 100 mil habitantes) em 2019.....	4
Figura 2 - Número de mortes da tuberculose no mundo (por milhão) entre 2000 e 2020, entre pessoas HIV negativo e coinfeção HIV/TB.....	5
Figura 3 - Coeficiente de incidência da tuberculose no Brasil (por 100 mil habitantes) no ano de 2020.....	6
Figura 4 - Coeficiente de incidência da tuberculose no Brasil (por 100 mil habitantes) entre os anos de 2011 e 2020.....	6
Figura 5 - Coeficiente de mortalidade por tuberculose no Brasil (por 100 mil habitantes) no ano de 2019.....	7
Figura 6 - Vias de sinalização ativadas por PRRs em Células Apresentadoras de Antígenos (APCs).....	17
Figura 7 - Ativação de Linfócitos T. Esquema de apresentação de peptídeos por DCs via MHCs.....	23
Figura 8 - Citocinas relevantes durante a resposta a TB.....	43
Figura 9 - Gráficos representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo.....	48
Figura 10 - Gráficos representativos de detecção de citocinas.....	49
Figura 11 - Análise da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de adultos infectados <i>in vitro</i> com a vacina BCG Moreau nos tempos de 24h, 48h e 72h .....	53
Figura 12 - Análise da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de adultos infectados e não infectados <i>in vitro</i> com a vacina BCG Moreau por 48h ou 72h .....	55
Figura 13 - Análise da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de neonatos infectados e não infectados <i>in vitro</i> com a vacina BCG Moreau por 48h ou 72h .....	56
Figura 14 - Análise comparativa da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de neonatos e adultos infectados e não infectados <i>in vitro</i> com a vacina BCG Moreau por 48h ou 72h .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais anti-humano com suas respectivas especificidades e fluorocromos conjugados utilizados para marcações fenotípicas por citometria de fluxo.....	47
Tabela 2 - Limites de detecção de mediadores imunológicos solúveis analisados pelo método de ELISA. ....	50
Tabela 3 - Limites de detecção de mediadores imunológicos solúveis analisados pelo método de CBA. ....	51
Tabela 4 - Limites de detecção de mediadores imunológicos solúveis analisados pelo método de Luminex. ....	52
Tabela 5 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método de ELISA (pg/ml) em adultos e neonatos. ....	58
Tabela 6 - TNF e MMP9 (Mediana e IQR) dosados pelo método de ELISA (pg/ml) em adultos.....	58
Tabela 7 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método Luminex (pg/ml) em adultos e neonatos.....	59
Tabela 8 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método Luminex (pg/ml) em adultos. ....	59
Tabela 9 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método CBA (pg/ml) em adultos e neonatos.....	60
Tabela 10 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método CBA (pg/ml) em adultos. ....	60



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AA</b> – Ácido Araquidônico	<b>FITC</b> – Isotiocianato de Fluoresceína
<b>ADK</b> – Adipocina	<b>GAL-9</b> – Galectina-9
<b>AMP</b> - Peptídeo antimicrobiano	<b>G-CSF</b> – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
<b>APC</b> – Célula Apresentadora de Antígeno	<b>GF</b> – Fator de Crescimento
<b>BAAR</b> – Bacilo Álcool-Ácido Resistente	<b>GM-CSF</b> – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
<b>BCG</b> – Bacilo de Calmette-Guérin	<b>HAVCR2</b> – Receptor Celular 2 do Vírus da Hepatite A
<b>BSA</b> – Albumina Sérica Bovina	<b>hCG</b> – Gonadotrofina Coriônica Humana
<b>CBA</b> – <i>Cytometric Bead Array</i>	<b>HIV</b> – Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>CBMCs</b> – Células Mononucleares do Sangue de Cordão Umbilical	<b>HSP</b> – Proteína de Choque Térmico
<b>CD</b> – <i>Cluster of Differentiation</i>	<b>HUCFF</b> – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
<b>CLec</b> – Lectina do tipo C	<b>HUGG</b> – Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
<b>CLR</b> – Receptor do tipo Lectina C	<b>IFN</b> – <i>Interferons</i>
<b>Complexo Mtb</b> – Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> – <i>Interferon</i> gama
<b>COVID-19</b> – Doença causada pelo Coronavírus 2019	<b>Ig</b> – Imunoglobulina
<b>CSF</b> – Fator Estimulador de Colônia	<b>IGRA</b> – Teste de Liberação de <i>Interferon</i> Gama
<b>DC</b> – Célula Dendrítica	<b>IL</b> – Interleucina
<b>DC-SIGN</b> – Ligante de Molécula de Adesão Intercelular Não Integrina Específica de Célula Dendríticas	<b>INH</b> – Isoniazida
<b>DEC-1</b> – Dectina-1	<b>iNOS</b> – Óxido Nítrico Induzível
<b>EM</b> – Esclerose Múltipla	<b>IOC</b> – Instituto Oswaldo Cruz
<b>EP</b> – Receptor de Prostaglandina	<b>IQR</b> – Intervalo Interquartil
<b>ELISA</b> – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	<b>IRAK</b> – Quinase Associada ao Receptor de Interleucina-1
<b>EPT</b> – Efusão Pleural Tuberculosa	<b>JAK-STAT</b> – Transdutores de Sinal de Quinase Janus e Ativadores de Transcrição
<b>ESAT-6</b> - Alvo Antigênico de 6kDa Secretado Precocemente	<b>LAM</b> – Lipoarabinomanana
<b>FIOCRUZ</b> – Fundação Oswaldo Cruz	

**LB** – Linfócitos B

**LIC** – Laboratório de Imunologia Clínica

**LM** – Lipomanano

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**LT** – Linfócitos T

**Ty $\delta$**  – Linfócitos T gama-delta

**LTB4** – Leucotrieno B4

**LTBI** – Infecção Latente por Tuberculose

**LXA4** – Lipoxina A4

**ManLAM** – LAM acoplado à Manose

**MAPK** – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

**MBNT** – Micobactéria Não-Tuberculosa

**MFI** – Mediana de Intensidade de Fluorescência

**MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade

**MINCLE** – Receptor de Lectina-C Induzível de Macrófagos

**MCP-1** – Proteína Quimiotática de Monócitos 1

**MIP-1 $\beta$**  – Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 Beta

**MMP** – Metaloproteinase de Matriz

**M $\emptyset$**  – Macrófago

**moDC** – Célula Dendrítica derivada de monócitos

**MOI** – Multiplicidade de Infecção

**MON** – Monócito

**MPB** – Proteína ligante de maltose/maltodextrina

**MR** – Receptor de Manose

**mRNA** – RNA Mensageiro

**Mtb** – *Mycobacterium tuberculosis*

**MyD88** – Fator de Diferenciação Mieloide 88

**NAAT** – Teste de Amplificação de Ácido Nucleicos

**NFAT** – Fator Nuclear Ativado por Linfócitos T

**NF- $\kappa$ B** – Fator Nuclear Kappa-Beta

**NK** – Células *Natural Killer*

**NKT** – Linfócitos T *Natural Killers*

**NO** – Óxido Nítrico

**NTF** – Neutrófilo

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PAMPs** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

**PBMCs** – Células Mononucleares do Sangue Periférico

**PBS** – Tampão Salina Fosfato

**PDIM** – Fitiocerol Dimicocerosado

**PE** – Ficoeritrina

**PGE2** – Prostaglandina E2

**PIM** – Fosfatidilinositol Manosídeo

**PNH** – Primatas Não Humanos

**PPD** – Derivado de Proteína Purificada

**PRR** – Receptor de Reconhecimento de Padrão

**RIF** – Rifampicina

**RNI** – Intermediários Reativos de Nitrogênio

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**STAT3** – Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3

**TA** – Temperatura Ambiente

**TB** – Tuberculose

**TBA** – Tuberculose Ativa

**TBEP** – Tuberculose extrapulmonar

**TBP** – Tuberculose Pulmonar

**TC** – Tomografia Computadorizada

**TCT** – Teste Cutâneo Tuberculínico

**TCD4+** – Linfócitos T Auxiliares CD4+

**TCD8+** – Linfócito T Citotóxico CD8+

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TCR** – Receptores de Células T

**TDM** – Dimicolato de Trealose

**Tfh** – Linfócitos T Foliculares

**TGF- $\beta$**  – Fator de Crescimento Transformante Beta

**Th** – Linfócito Auxiliares (*helper*) polarizados

**THP1** – Linhagem Celular Monocítica Humana Tamm-Horsfall Protein 1

**TIM-3** – Domínios de Imunoglobulina e Mucina de célula T-3

**TIMP** – Inibidor Regulatório Tecidual de Metaloproteinase

**TLR** – Receptor do Tipo Toll

**TMB** – Tetrametilbenzidina

**TNF** – Fator de Necrose Tumoral

**TRAF6** – Fator Ativador do Receptor de TNF 6

**Tregs** – Linfócitos T Regulatórios

**T $\gamma\delta$**  – Linfócito T Gama-Delta

## 1 – INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), outrora conhecida como consumpção, tísica ou peste branca (Dubos & Dubos, 1990), é a doença infecciosa mais comum da espécie humana, e uma das mais devastadoras. Considerada uma das dez maiores causas de morte no mundo, estima-se que 23% da população mundial, a maioria de países emergentes, esteja infectada com o agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), e poderão desenvolver a doença ao longo da vida. Em 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 10 milhões de pessoas contraíram a TB no mundo e manteve-se a taxa média de quase 1,5 milhão de mortes anuais (WHO, 2021). No Brasil, são notificados cerca de 70 mil casos novos e 5 mil mortes em decorrência da TB todos os anos, estando o Brasil na lista dos 30 países com maior carga de TB no mundo (Brasil, Ministério da Saúde, 2021).

Após o início da infecção por *Mtb*, a resposta pró-inflamatória do hospedeiro começa a concorrer com os mecanismos regulatórios da resposta imune. Para um melhor prognóstico, é consenso que um equilíbrio tem que ser mantido (Dlugovitzky *et al.*, 1997; Kidd, 2003; Wangoo *et al.*, 2001). Os diferentes estágios da infecção induzem respostas imunes distintas, e a excessiva produção de fatores do hospedeiro tem sido descrita como responsável pelo estabelecimento e manutenção da patologia da TB (Dorhoi & Kaufmann, 2015; Etna *et al.*, 2014). O tipo, quantidade e estado de ativação das células imunes é variável de acordo com a evolução da infecção e envolvem também a expressão de receptores de superfície na membrana plasmática que irão reconhecer agentes patogênicos e desencadear uma reação de sinalização intracelular. De acordo com o receptor e a célula, essa sinalização pode culminar em uma ativação/inibição, diferenciação, e/ou secreção de subprodutos com efeitos diversos (Chan, 2001; Flynn & Cooper, 2009; Kleinnijenhuis *et al.*, 2011).

O diagnóstico da TB se baseia primeiramente na identificação dos sintomas clínicos, comparando-os com os achados em exames laboratoriais. A forma pulmonar na TB ativa (TBA), além de ser a mais frequente (80%), é também a de maior relevância perante a ótica pública, por ser a responsável pela transmissão (Shiloh, 2016). Os sintomas da enfermidade são resultados da

multiplicação do bacilo e da resposta imune do hospedeiro, que podem promover processos inflamatórios e degenerativos relevantes para a progressão e transmissão da doença, como a destruição da parede alveolar e endotelial, infiltração perivascular e brônquica, pneumonia lipídica e necrótica, fibrose, encapsulação e cavitação (Dheda *et al.*, 2005; Hunter, 2011; Orme, 2014). A forma extrapulmonar na TB (TBEP), que pode afetar outros órgãos, além do pulmão, costuma acometer portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou pessoas com algum outro comprometimento imunológico, causando várias manifestações sistêmicas e localizadas, dependendo dos órgãos afetados (Golden & Vikram, 2005).

Apesar das grandes incidência e prevalência da doença, a TB é tratável e curável. Cerca de 85% das pessoas que desenvolvem TB podem ser tratadas com seis meses de regime farmacológico, o que impede o avanço da doença e ainda diminui o risco de propagação (Rabahi *et al.*, 2017). A cada dia, novos fármacos estão em desenvolvimento, especialmente para lidar com as crescentes formas resistentes da micobactéria. Contabiliza-se que 60 milhões de mortes foram evitadas nos últimos 20 anos por conta do tratamento, embora o acesso ainda não seja universalizado e estima-se, ainda, que haja milhares de casos subnotificados ao redor do globo (WHO, 2020).

A única vacina disponível no momento contra a TB é o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Calmette, 1931). Utilizada em países onde a TB é endêmica, a vacina além de proteger crianças contra as formas severas meníngea e miliar da doença (Antas & Castello-Branco, 2008; McShane, 2011), também é um excelente reforço imunológico comprovado, conferindo proteção heteróloga (Moorlag *et al.*, 2019; Ota *et al.*, 2002; Saadatian-Elahi *et al.*, 2016) e sendo recentemente estudada na prevenção dos sintomas da doença Coronavírus 2019 (COVID-19) causada pelo SARS-COV2 (O'Neill & Netea, 2020). Apesar de ser uma vacina centenária, salvando incontáveis vidas todos os anos, muitas questões ainda permanecem sobre esse imunizante, como por exemplo, a duração e a variação da imunidade conferida em diferentes populações ao longo da vida (Colditz *et al.*, 1994; Heemskerk *et al.*, 2015).

Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Imunologia Clínica (LIC) do Instituto Oswaldo Cruz /Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) versa sobre

a resposta imune celular *in vitro* frente a vacina BCG, utilizando amostras clínicas de doadores voluntários adultos saudáveis e vacinados e comparando esse grupo majoritário da população brasileira, com outros grupos, como os neonatos, que tem por natureza uma maior suscetibilidade às infecções, consequência da falta de maturidade do seu sistema imune, que depende de recursos e estímulos que serão providos ao longo do tempo (Basha *et al.*, 2014). Ainda assim, os mecanismos biológicos específicos em neonatos, como a expressão de diferentes moléculas de superfície em células imunes e a de fatores solúveis sistemicamente contêm muitas particularidades, que devem ser exploradas (Maródi *et al.*, 2000). Sendo a vacina BCG administrada em média 48 horas logo após o nascimento em diversos países, assim como no Brasil, os neonatos formam uma coorte ideal de indivíduos BCG negativos para estudos comparativos.

As detecções de citocinas e de marcadores fenotípicos, através de ensaios imunoenzimáticos e de marcação com anticorpos para citometria de fluxo, tornaram-se as metodologias padrões da imunologia experimental. No entanto, a maioria dos estudos perde a oportunidade de estudar a resposta imune com indivíduos saudáveis, ou são enviesados ao não observar nos objetos de estudo as diferenças típicas inerentes de cada idade. Assim, sabendo que células imunes de adultos e do cordão umbilical respondem *in vitro* de maneira diferente ao mesmo estímulo (Antas *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2018), torna-se muito relevante comparar o perfil da resposta imune induzida pela BCG nos leucócitos desses grupos, podendo essa abordagem ajudar a entender por quanto tempo a imunidade inata mantém a proteção após estímulos, bem como seus fatores determinantes.

Em virtude disso, para melhor entender os objetivos e a motivação desse estudo, torna-se interessante uma revisão um pouco mais aprofundada sobre alguns aspectos da literatura científica relacionada.

## **1.1 – Epidemiologia**

### **1.1.1 – Global**

No mundo hoje, 1,7 bilhão de pessoas são consideradas portadoras do *Mtb* e entre 5 a 10% desses indivíduos poderão desenvolver a TB durante a vida

(Narasimhan *et al.*, 2013; WHO, 2021). A doença afeta mais pessoas do sexo masculino, com idade  $\geq 15$  anos, as quais compõem 56% dos infectados, com mulheres e crianças ( $<15$  anos) constituindo 32 e 12 %, respectivamente. Dentro todos os infectados com Mtb, 8,2% são também portadores do HIV (WHO, 2020).

Estima-se que, mundialmente, aproximadamente 10 milhões de pessoas contraíram a TB em 2020 (Figura 1), o que excepcionalmente indica um declínio lento nos últimos anos (WHO, 2021). Assim, a taxa de incidência de TB vem caindo ao longo dos anos, mas não o suficiente ainda para que pudéssemos alcançar a meta de redução estipulada em 20% entre 2015 e 2020 (WHO, 2021).

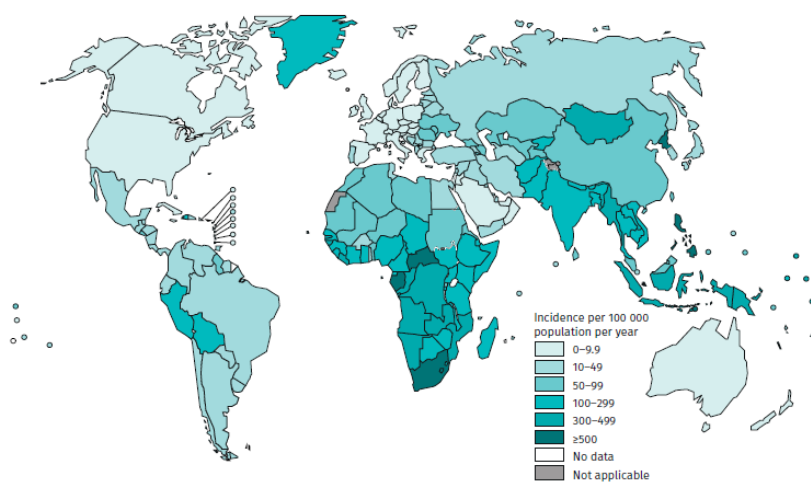


Figura 1 - Taxa de incidência da tuberculose no mundo (por 100 mil habitantes) em 2019 (WHO, 2021).

Em 2020, foram estimadas cerca de 1,3 milhão de mortes entre pacientes HIV-negativos, 100 mil casos a mais em relação a 2019 (Figura 2), e mais 214 mil óbitos entre estes pacientes coinfetados, cerca de 5 mil a mais que em 2019, totalizando 1,4 milhão de mortes no mundo (WHO, 2021).

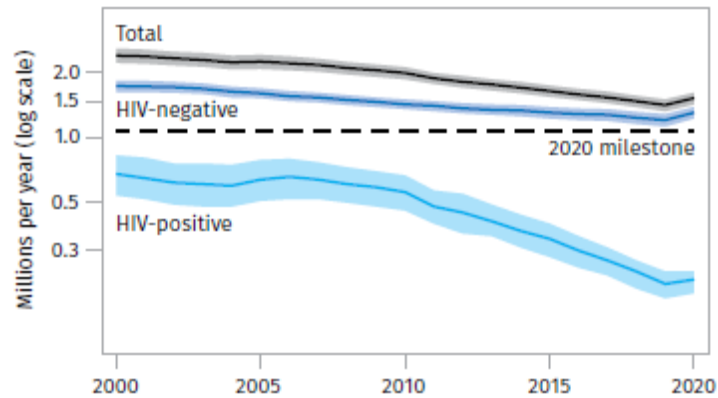


Figura 2 - Número de mortes por tuberculose no mundo (por milhão) entre pessoas HIV negativo e positivo, no período de 2000 a 2020 (WHO, 2021).

Em 2020, a divisão geográfica desta enfermidade aponta o Sudeste Asiático (43%) como sendo a região de maior concentração de pessoas que desenvolveram a TB, seguido pela África (25%), Pacífico Ocidental (18%) e em menores índices, o Mediterrâneo (8,3%), Américas (3%) e Europa (2,3%). Índia, Indonésia, China, Filipinas, Paquistão, Nigéria, Bangladesh e África do Sul juntos somam 2/3 dos casos globais de TB, sendo parte dos países listados como as 30 nações com maior carga de TB mundial. A OMS vem observando um lento aumento de incidência nas Américas desde 2016, especialmente no Brasil (WHO, 2021).

A pandemia de COVID-19 trouxe desafios para o combate a TB, podendo reverter todo o progresso já alcançado do programa de redução das taxas mundiais (del-Barrio *et al.*, 2021). Estima-se que o número de mortes por TB possa aumentar em até 500 mil, caso os serviços de saúde sejam interrompidos, pois a discrepância entre o número de casos notificados e a incidência estimada tende a aumentar, o que já foi constatado na Índia, Indonésia, Filipinas e África do Sul, que tiveram grandes quedas dos casos reportados entre janeiro e junho de 2020, comparados com o mesmo período de 2019 (WHO, 2020).



### 1.1.2 – Brasil

O Brasil é o 20º país com a maior número de casos de TB e coinfeção TB-HIV no mundo (WHO, 2021). Em 2020, foram registrados 66.819 casos novos de TB, gerando um coeficiente de incidência de 31,6 casos/100 mil habitantes (Figura 3), e em 2019, houve 4,5 mil mortes (2,2 óbitos/100 mil habitantes) em decorrência da doença (Figura 4).

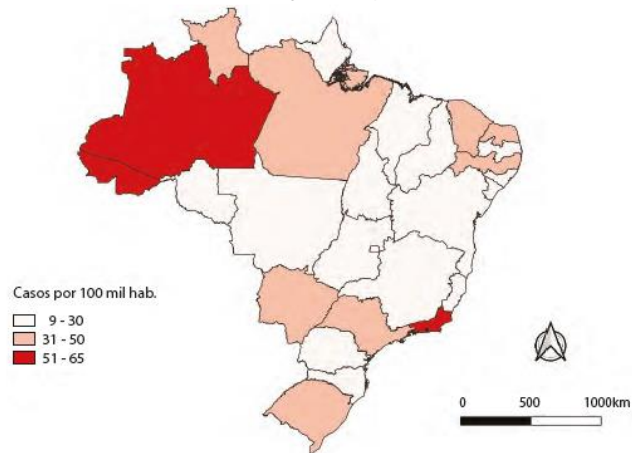


Figura 3 - Coeficiente de incidência da tuberculose no Brasil (por 100 mil habitantes) no ano de 2020. Adaptado de (BRASIL, 2021).

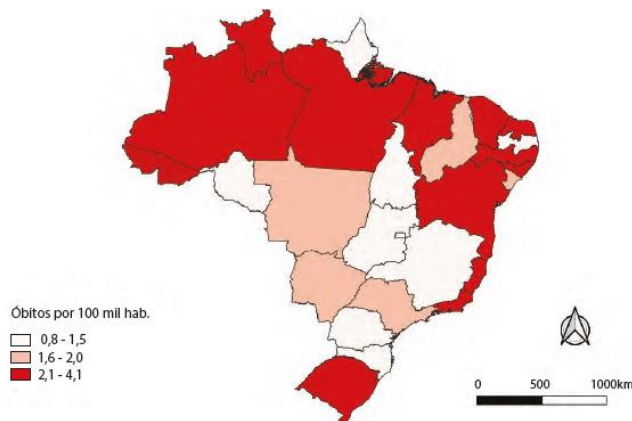


Figura 4 - Coeficiente de mortalidade por tuberculose no Brasil (por 100 mil habitantes) no ano de 2019. Adaptado de (BRASIL, 2021).

Embora uma tendência de queda do coeficiente de incidência da TB no país tenha sido observada entre 2010 e 2016, seguindo assim o padrão mundial, esse índice voltou a aumentar entre 2017 e 2019 (Figura 5). Em 2019, já haviam sido registrados 4.532 óbitos em decorrência da doença, mesmo antes da pandemia de COVID-19, que agravou alguns determinantes sociais da TB (Brasil, Ministério da saúde, 2021).

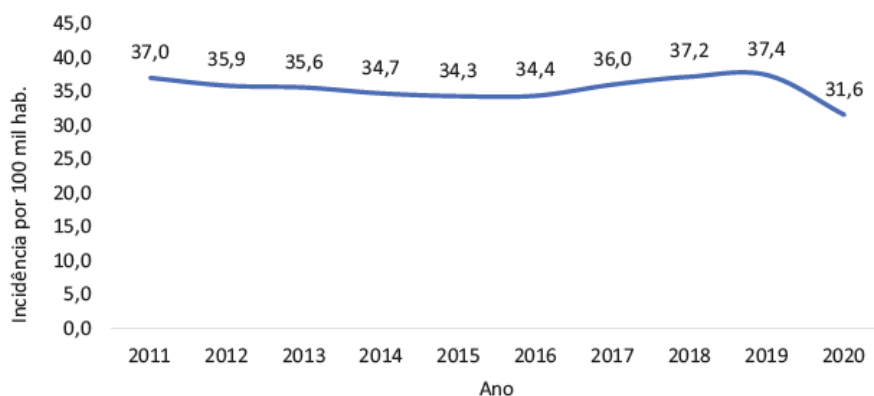


Figura 5 - Coeficiente de incidência da tuberculose no Brasil (por 100 mil habitantes) entre os anos de 2011 e 2020. Adaptado de (BRASIL, 2021).

O Amazonas e o Rio de Janeiro apresentam as maiores taxas nacionais de incidência de TB. No Rio de Janeiro, a incidência aumentou de 63,5 para 66,3 casos/100 mil habitantes entre 2018 e 2019. Esses índices indicam que a incidência de TB nesse estado é aproximadamente o dobro do país inteiro e esses números vêm aumentando desde 2015 (Brasil, Ministério da Saúde, 2021).

## 1.2 – *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mtb* continua sendo tão mortal, mesmo após quase 140 anos de sua identificação por Robert Koch (Koch, 1882, 1890), tendo enorme relevância para a saúde pública. Esse patógeno é considerado Gram-positivo e dispõe de uma grossa e complexa barreira/cápsula (Brennan & Nikaido, 1995), com vários componentes biomoleculares, incluindo fosfatidilinositol manosídeo (PIM), lipoarabinomanana (LAM), fitiocerol dimicocerosado (PDIM), dimicolato de trealose (TDM), arabinogalactanos, peptoglicanos e ácidos micólicos (Ishikawa *et al.*, 2017; Torrelles & Schlesinger, 2010), que conferem as propriedades de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) do *Mtb* (Reynolds *et al.*, 2009). Outros componentes da parede celular do *Mtb* incluem LAM acoplado à manose (ManLAM) e lipomanano (LM) (Torrelles & Schlesinger, 2010), sendo esses os glicolípídios focais no estudo da patogênese da TB (Briken *et al.*, 2004).

Um pequeno grupo de micobactérias estreitamente relacionadas, conhecido como complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Complexo *Mtb*) são capazes de causar a TB em humanos ou outros organismos. Dentro desse grupo, as espécies de maior interesse clínico são o *Mtb* e *M. bovis* (Smith *et al.*, 2006). Com cerca de 120 espécies descritas, o gênero *Mycobacterium* também

inclui membros capazes de causar outras patologias, como o *M. leprae*, causador da hanseníase ou “lepra”; *M. bovis*, que causa principalmente TB no gado; e *M. africanum*, com sintomas parecidos com a TB, mas com menor patogenicidade (de Carvalho *et al.*, 2017; de Jong *et al.*, 2010; Lastoria & de Abreu, 2014; O'Reilly & Daborn, 1995; Woods & Washington, 1987). Originadas de micobactérias ancestrais, o primeiro contato com hospedeiros humanos provavelmente se iniciou há cerca de 10 mil anos atrás, quando os humanos começaram a domesticar animais (Smith *et al.*, 2009), e há evidências da presença de Mtb em múmias datadas de 600 A.C. (Donoghue *et al.*, 2009). Estudos genéticos indicam que Mtb apresenta um alto grau de adaptação e coevolução (Comas *et al.*, 2013) e que a coexistência de humanos e Mtb levou ao delicado equilíbrio que temos hoje entre patogenia e latência (Brites & Gagneux, 2015).

As espécies desse gênero apresentam um crescimento lento, o que se traduz nos períodos longos de incubação após a infecção (Ghodbane *et al.*, 2014; Samra *et al.*, 2000). As condições ótimas de replicação são de 37°C e boa disponibilidade de oxigênio e nutrientes, nas quais um único Mtb se replica em torno de 18 a 24 horas, podendo formar colônias amarelo-claro em 3 a 4 semanas (Ogwang *et al.*, 2015). Aeróbias estritas e intracelulares facultativas, Mtb e *M. bovis* utilizam preferencialmente os fagócitos mononucleares como seu *habitat* (Schäfer *et al.*, 2008). Contudo, recentemente estudos demonstraram que células não fagocíticas também interagem, abrigam e respondem a Mtb, porém mais raramente (Ganbat *et al.*, 2016; Garcia-Perez *et al.*, 2012).

Apesar da virulência descrever a capacidade do patógeno de causar doença e ter relação direta com a severidade da infecção (Leitão, 2020), o Mtb se destaca não pelos sintomas clínicos graves de fase TBA, mas sim pela sua excepcional capacidade de persistir no hospedeiro por longos períodos (Mishra & Surolia, 2018). Diferente de outras micobactérias, o Mtb não forma esporos, mas consegue entrar em estado de latência, caracterizado por uma queda na atividade metabólica, interrompendo, assim, a sua replicação, bem como por uma mudança no perfil de resistência as drogas (Gengenbacher & Kaufmann, 2012; Peddireddy *et al.*, 2017).

### 1.3 – Infecção e patogenicia

A transmissão do Mtb se dá pela via aérea, por isso, a TB afeta principalmente os pulmões (Hnizdo, 2000; Pasipanodya *et al.*, 2007). Gotículas de < 5µm de diâmetro, vulgarmente chamadas de perdigotas, e contendo bacilos podem ser expelidas por um paciente com TB pulmonar (TBP), ou seja, indivíduo bacilífero apresentando BAAR ou baciloscopia positiva, ao tossir, espirrar, falar em voz alta ou realizar outra manobra respiratória (Nicas *et al.*, 2005; Siegel *et al.*, 2007). Essas partículas ficam suspensas em ambientes fechados, como os cômodos de uma casa, durante várias horas, e apenas poucos bacilos são necessários para causar uma infecção (Donald *et al.*, 2018). Gotículas maiores contendo bacilos aerossolizados tendem a se precipitar, ou ficam retidas nas vias aéreas superiores proximais, não culminando em um quadro infeccioso. Já as gotículas pequenas tendem a infectar os lobos medianos ou inferiores dos pulmões (Fennelly, 2020; Turner & Bothamley, 2015). Entre 30 a 40% dos indivíduos expostos se infectam (Churchyard *et al.*, 2017; Shiloh, 2016).

O curso da infecção por Mtb depende de diversos fatores, apresentando estágios distintos. A infecção TB primária é caracterizada por um alto índice de quadros assintomáticos (cerca de 95% dos casos), e de baixa transmissibilidade (Milburn, 2001; Ryndak & Laal, 2019). Essa pode ser erradicada pelo sistema imune inato do hospedeiro (cura espontânea), ser contingenciada (latência), ou progredir (TBA) em algum momento da vida; porém, é impossível prever o curso da doença em indivíduos imunocompetentes (Philips & Ernst, 2012; Sher & Flynn, 2021).

No início da TBP, macrófagos (MØs) alveolares capturam e transportam o Mtb da mucosa para outras áreas do parênquima pulmonar, onde é formado um foco inflamatório primário juntamente às células imunes recém recrutadas (Davies *et al.*, 2013). Em indivíduos acometidos pela TB primária, mais comum em crianças, e que ainda não tiveram contato com o Mtb, lesões pulmonares causadas pela TB formam focos de infecção (geralmente por necrose cásea), com área branco-acinzentada do parênquima afetado sendo conhecida como foco de Ghon (Concepcion *et al.*, 2017; Marais *et al.*, 2004; Skoura *et al.*, 2015,). Quando associados a um nódulo linfático contendo bacilos e/ou fagócitos infectados, formam-se estruturas chamadas complexos de Ghon, abrigando

bacilos vivos, que podem ser fonte de reativação. Há dispersão linfática e hematogênica, mas essa é contida pela imunidade em 95% dos casos, e os complexos de Ghon passam por fibrose e calcificação, formando o complexo de Rank (Delgado & Bajaj, 2021; Miller & Miller, 1993). A doença é assim controlada, estabelecendo-se a infecção TB latente (LTBI) (Frieden *et al.*, 2003; Lee, 2015).

Indivíduos imunocompetentes conseguem conter a disseminação do bacilo da TB, que entra em estado de dormência, não sendo transmissível (Sundararajan & Muniyan, 2021). Porém, esses indivíduos não têm a capacidade de o eliminar, sendo assim caracterizados como reservatórios desse patógeno e, durante um quadro de deficiência imunitária, pode ocorrer a reativação da infecção, acarretando transformação de LTBI em TBA (Colangeli *et al.*, 2020; Flynn & Chan, 2001a), na qual estima-se que metade dos indivíduos acometidos morreriam sem o tratamento adequado (WHO, 2020). Essa reativação pode ser acentuada por fatores como a idade; em indivíduos com mais contatos domiciliares infectados; imunossupressão causada pelo HIV (Barry *et al.*, 2009; de Oliveira Liberato *et al.*, 2004) ou outra condição de deficiência imune (Galkina *et al.*, 2007); comorbidades associadas (diabetes, desnutrição, cigarro) (Silva *et al.*, 2018; Workneh *et al.*, 2017); uso de alguns medicamentos e substâncias; e doenças não comunicáveis (Bates *et al.*, 2015). Importaneamente, há relatos recentes de que a infecção por COVID-19 possa reativar a TB (Garg & Lee, 2020, Khayat *et al.*, 2021).

A TB secundária, onde o indivíduo é reinfectado pelo Mtb via infecção exógena, ou desenvolve a TBA a partir de um quadro de reativação da LTBI via reinfeção endógena, apresenta toda clínica e sintomas clássicos da TBP, tornando-se um processo crônico, alternando entre episódios de cura e alterações fibróticas em torno das lesões teciduais (Colangeli *et al.*, 2020; Ravimohan *et al.*, 2018). Erradicar os bacilos da TB espontaneamente é raro, e grande parte da patologia da doença resulta da resposta imune do hospedeiro ao Mtb (Flynn & Chan, 2001a; Wu *et al.*, 2017). A falta de tratamento, as comorbidades e as respostas imunes mais exacerbadas geram quadros clínicos mais graves com o avanço da doença, como pneumonia, efusão pleural e alargamento do mediastino ou do linfonodo hilar (Sahin & Yildiz, 2011; Tiemersma *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2020). A ruptura de uma lesão tuberculosa de

TBP no espaço pleural pode produzir empiema tuberculoso com ou sem fístula broncopleural e pode vir a causar pneumotórax (Meghji *et al.*, 2016; Seiscento *et al.*, 2006; Shi & Sugawar, 2013). Caso não seja contido pelo sistema imune, seja por uma deficiência ou por uma imaturidade do mesmo, o crescimento micobacteriano pode levar à disseminação hematogênica, causando a TBEP (Clark *et al.*, 1991; Madkour, 2004). Fora o pulmão, diversos órgãos e tecidos podem ser infectados pelo Mtb; entretanto, os mais acometidos são pleura, gânglios linfáticos, ossos, articulações, trato geniturinário, sistema digestivo e especialmente as meninges, onde a mortalidade é entre 13% e 23% (Carrol *et al.*, 2001; Golden & Vikram, 2005).

#### **1.4 – Diagnósticos clínico e laboratorial**

A TBP pode se apresentar assintomática ou com sintomas que variam desde uma leve indisposição até falta de apetite, mas que tem como principal característica a tosse seca ou produtiva por mais de três semanas (Loddenkemper *et al.*, 2015). Outros sinais incluem: febre baixa vespertina, cansaço/fadiga, sudorese noturna e emagrecimento. A dispneia pode ocorrer quando há envolvimento do parênquima pulmonar, pneumotórax espontâneo ou efusão pleural, e a hemoptise só ocorre em casos de TBP cavitária, devido aos danos teciduais no parênquima pulmonar (Cruz & Starke, 2007; Lee *et al.*, 2000; Stead, 1968).

Somando-se aos achados clínicos, devem ser feitos testes investigativos laboratoriais. O diagnóstico preconizado para a TBP é composto pela evidência de duas baciloscopias diretas positivas no teste de escarro via exame do BAAR e uma cultura positiva para Mtb. Na impossibilidade de se comprovar a TB através desses exames laboratoriais, o diagnóstico clínico é considerado quando associado a outros testes complementares como teste cutâneo tuberculínico (TCT) ou teste de liberação de *interferon* gama (IFN- $\gamma$ ) (IGRA) (da Silva Jr. *et al.*, 2004).

O teste de escarro é a base do diagnóstico para TBP, podendo detectar quando há no mínimo 10 mil bacilos/mL na amostra (Parry, 1993; Warren *et al.*, 2000). Em caso de indivíduos incapazes de produzir escarro, a indução com aerossol salino hipertônico ou a lavagem bronco-alveolar pode ser considerada

(Brightling, 2006). É feito então o exame microscópico para verificar a existência de BAAR. O Mtb, apesar de nominalmente Gram-positivo, tem uma coloração de Gram inconsistente (Trifiro *et al.*, 1990), sendo mais acurado o método de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun para microscopia óptica convencional (Jost, 1989), no qual ele aparece na forma de bastonetes vermelhos. Embora produza forte evidência, o diagnóstico definitivo requer cultura para micobactérias e teste moleculares específicos positivos (Dzodanu *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2013,). Na cultura, um mínimo de 10 bacilos/mL pode ser detectado na amostra de esputo, usando meios sólidos ou líquidos; porém, o crescimento lento característico das micobactérias pode levar de duas semanas a três meses para apresentar uma confirmação (Campelo *et al.*, 2021; Cudahy & Sheno, 2016; Olaru *et al.*, 2014,). Nesse caso, um teste rápido de antígeno MPB64 pode confirmar a presença de Mtb na amostra (Tamada *et al.*, 2012).

A cultura também pode ser necessária para isolar as bactérias no teste de suscetibilidade aos fármacos e genotipagem (Kim, 2005). Os antibiogramas, que determinam a sensibilidade de Mtb aos fármacos, devem ser feitos nas amostras clínicas iniciais de todos os pacientes com suspeita de TB, e repetidos em casos em que esses continuem bacilíferos após três meses da antibioticoterapia, ou se as culturas se tornarem positivas após um período de culturas negativas (Amini *et al.*, 2019; van Klingeren *et al.*, 2007).

Dos testes diagnósticos moleculares de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), podemos citar o Gene Xpert MTB/RIF e os com fitas Hain (Nurwidya *et al.*, 2018). Gene Xpert MTB/RIF é um teste rápido e automatizado, onde os ácidos nucleicos são amplificados, identificando o material genético de Mtb, assim como genes de resistência à Rifampicina (RIF), em até duas horas, sendo mais sensível que a baciloscopia (Casela *et al.*, 2018; Said *et al.*, 2021; Subramonian & Severn, 2021). Atualmente, emprega-se também o teste de última geração Gene Xpert Ultra (Horne *et al.*, 2019). Os testes com fitas Hain são feitos em baciloscopias positivas e identificam a presença de Mtb e a resistência à RIF e Isoniazida (INH), com uma sensibilidade menor que o Gene Xpert MTB/RIF (Drobniowski *et al.*, 2015; Reechaipichitkul *et al.*, 2016; Sangsayunh & Chuchothawon, 2014). Porém, um único teste usando Gene Xpert

MTB/RIF pode detectar 99% dos pacientes com suspeita de TB e >80% dos pacientes com TBP BAAT negativos (Campelo *et al.*, 2021).

Os exames de imagem podem ser feitos por radiografia e tomografia computadorizada (TC) do tórax (Bomanji *et al.*, 2015; Bombarda *et al.*, 2001). Em adultos, consolidações, cavitações, padrões intersticiais, linfonomegalias hilares ou mediastinais e efusão pleural são sinais sugestivos de reativação ou sequelas da TBP (Loddenkemper *et al.*, 2015). Por outro lado, a TBA pode apresentar infiltrado multinodular, cavidades de paredes espessas, espessamento de parede brônquica ou bronquiolar, bronquiectasias e linfonomegalias, observadas pela TC do tórax (Campos *et al.*, 2002; Cudahy & Shenoi, 2016).

O TCT, ou teste de Mantoux, é realizado empregando-se o derivado de proteína purificada (PPD) também é usado de forma complementar atualmente (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2006). A solução é injetada intradermicamente no antebraço, formando uma bolha ou pápula, e o diâmetro de endurecimento transversal é medido de 48 a 72 horas após a injeção, servindo de medida para diferenciar pacientes infectados com *Mtb*, não sendo capaz de diferir entre LTBI e TBA (Gualano *et al.*, 2019). Há a possibilidade de falsos negativos, especialmente em idosos e portadores de HIV, e de falsos positivos, em casos de infecção por micobactérias não-tuberculosas (MBNTs) ou vacinados com a BCG, quando essa foi feita há poucos anos (Moreno *et al.*, 2001; Nassif *et al.*, 2015). Possui especificidade de 97% em indivíduos não vacinados pela BCG, enquanto em populações nas quais a BCG é administrada, a especificidade é muito mais baixa (em torno de 60%) e variável (Menzies, 1999; Seddon *et al.*, 2016).

O teste IGRA dosa a produção dessa citocina pró-inflamatória pelos linfócitos T (LT) expostos *in vitro* aos antígenos específicos de *Mtb* (Diel *et al.*, 2010). A especificidade para LTBI chega a ser de 95% e essa não é afetada pela vacinação por BCG (Siqueira & Oréfice, 2019). Apesar de competir em especificidade e sensibilidade com o TCT (Ferreira *et al.*, 2015; Pai *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2012), algumas MBNTs podem gerar resultados falsos positivos (Dheda *et al.*, 2009). Ainda assim, requer apenas uma simples coleta de sangue, o teste pode ser repetido sem a necessidade do retorno do indivíduo e os



resultados são objetivos, não requerendo a interpretação do leitor, porém têm como desvantagem o alto custo (Carranza *et al.*, 2020).

Outros testes, como biópsias transbrônquicas em lesões infiltrativas (Stenson *et al.*, 1983) e lavagens gástricas (Maciel *et al.*, 2010), são menos utilizados, e somente quando o diagnóstico por outros exames são inconclusivos ou impossibilitados.

## 1.5 – Prevenção

Colocando de lado condições essenciais, fundamentais e universais, como acesso à água potável e saneamento básico, a imunização é um dos fatores que mais reduz os riscos de morte em crianças e jovens (Samantha *et al.*, 2013; WHO, 2021). Apesar de seguras e efetivas, as respostas imunes à vacinação com BCG diferem entre adultos e crianças (Antas *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2018). Apesar dos avanços no último século, a vacina contra a hepatite B, a vacina contra poliomielite, seja oral e inativada, e a vacina BCG são as únicas rotineiramente administradas no período neonatal na maioria dos países, somando evidências anualmente da eficácia de imunizantes em diferentes vias de administração (Angelidou & Levy, 2020).

A BCG, uma cepa viva e atenuada de *M. bovis* isolado de vacas com mastite e cultivado por 13 anos após 213 passagens (Calmette, 1931), é a única vacina atualmente utilizada contra a TB (Davenne & McShane, 2016; Dockrell & Smith, 2017). A BCG protege crianças das formas mais graves e mortais da doença (Trunz *et al.*, 2006), sendo utilizada pela primeira vez em humanos em 1921, e entrando no programa de imunização expandido da OMS em 1974 (WHO, 2018). Apesar de secular, ter baixos níveis de complicações, ser administrada logo após o nascimento, ou, no máximo até os cinco anos de idade, requerer uma única imunização e ser mais estável ao calor (Pereira *et al.*, 2007; Yuk & Jo, 2014), alguns aspectos da vacina BCG ainda necessitam de mais investigação, como a definição precisa dos mecanismos que conferem a proteção (Colditz *et al.*, 1994; Plotkin & Gilbert, 2012).

Em 1927, uma alíquota foi trazida para o Brasil pelo Professor Dr. Arlindo Raimundo de Assis, e assim foi batizada como BCG Moreau-Rio de Janeiro (BCG Moreau RDJ) (de-Andrade *et al.*, 2005; Grange *et al.*, 1983), sendo

considerada uma das mais imunogênicas de todas as estirpes (Antas, 2016). Muitas vezes vistas como uma só, diferentes subcepas de *M. bovis* BCG foram cultivadas em laboratórios pelo mundo, ao longo dos anos (Behr, 2002). Essas subcepas apresentam divergências genótípicas e fenotípicas, distintas imunogenicidades e virulências residuais. Assim, as cepas da vacina BCG são cultivadas através de diferentes métodos de manufatura e são aplicadas em diferentes calendários vacinais e em populações expostas à diferentes MBNTs e *Mtb*, e com distintas características genéticas e condições socioeconômicas (Behr, 2001; Oettinger *et al.*, 1999,). Portanto, não é surpresa que os níveis de eficácia da vacina BCG flutuem em populações adultas (Colditz *et al.*, 1994; Fine & Vinnycky, 1998; Springett & Sutherland, 1994), sendo demonstrada em estudos clínicos comparativos a capacidade superior na proteção conferida por algumas cepas (Favorov *et al.*, 2012, Shann, 2016).

Mais do que uma vacina capaz de minimizar o impacto de uma doença milenar como a TB, a BCG também está relacionada ao desenvolvimento de uma proteção agnóstica ou heteróloga (Aaby *et al.*, 2014; Saadatian-Elahi *et al.*, 2016) contra diversas doenças como sepse (Brook *et al.*, 2020), meningite meningocócica (Brynjolfsson *et al.*, 2011), doenças autoimunes (Curtis, 2016), gripe (Leentjens *et al.*, 2015), leucemia (Morra *et al.*, 2017), alergias (Thoestesen *et al.*, 2017) e diabetes infantil (Rousseau *et al.*, 2015), além de estimular a neurogênese em murinos (Yang *et al.*, 2016). Por conta de seu histórico, a vacina BCG surgiu como uma das primeiras possibilidades de reforço imunológico, inclusive durante a pandemia de COVID-19. Assim ensaios clínicos estão cada vez mais reforçando que seu título de “vacina contra a TB” talvez deva ser revogado para “grande reforço imunológico agnóstico” (Aspatwar *et al.*, 2021; Escobar *et al.*, 2020; Gonzalez-Perez *et al.*, 2021).

## **1.6 – Resposta imune à tuberculose**

### **1.6.1 – Resposta imune inata**

Uma vez nos parênquimas pulmonares, os bacilos de *Mtb* irão ter contato com diversas células, como as epiteliais das vias aéreas (pneumócitos dos tipos I e II), consideradas células imunes “não profissionais”, e, em particular, MØs alveolares (Kang *et al.*, 2011). Células imunes inatas, como células *Natural Killers* (NKs) e linfócitos T gama-delta ( $T\gamma\delta$ ), também desempenham papel

importante durante a infecção inicial, liberando citocinas pró-inflamatórias e restringindo a replicação primária do Mtb (Meraviglia *et al.*, 2011; Rothchild *et al.*, 2014). Em poucos dias, células fagocíticas circulantes no sangue, como neutrófilos (NTFs) (Kroon *et al.*, 2018) e monócitos (MONs) que irão se diferenciar em MØs (Rodero *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2016), migram para o parênquima pulmonar, tendo a mesma função dos fagócitos residentes: reconhecer, fagocitar e eliminar o Mtb, utilizando todo seu arsenal molecular (VanderVen *et al.*, 2016).

MØs são células da imunidade inata, que podem ser derivados tanto de MONs que migraram para os tecidos, quanto de origem embrionária e de progenitores mielóides, sendo estacionários nos tecidos e chamados MØs residentes (Davies *et al.*, 2013; Lavin *et al.*, 2015). Estas células inativas, fixas e com os pseudópodes retraídos e aspecto ovoide, que nos vertebrados fazem parte do sistema reticulo-endotelial, já foram referidas como histiócitos (Saba, 1970). Os MØs têm funções essenciais na homeostase, ao eliminar resíduos celulares e promover o reparo e remodelação tecidual, mas são mais conhecidos por suas atividades microbicidas, através da fagocitose (item 1.6.3) e apresentação antigênica (item 1.6.4) (Zhang *et al.*, 2021). Contudo, a medida que mais MØs são recrutados e a infecção avança, estas células são infectadas pelo Mtb em expansão e acabam se tornando um reservatório de Mtb no corpo, assim como fonte da persistência da doença (Upadhyay *et al.*, 2018).

Durante a ação das células imunes que tentam conter a infecção, a morte celular, o reconhecimento do patógeno e a consequente secreção de citocinas e quimiocinas recruta diversas outras células do sistema imunológico para o sítio de inflamação (de Martino *et al.*, 2019). A resposta imune gerada por esse influxo celular dá início à formação de uma estrutura singular e bem organizada, de composição dinâmica e com células em vários estágios de diferenciação, chamada granuloma (Ehlers & Schaible, 2013), que é formado, basicamente, por NTFs, células dendríticas (DCs), LT e linfócitos B (LB), NKs, células gigantes multinucleadas e células epitelioides (de Brito & Franco, 1994; Flynn *et al.*, 2011; Ramakrishnan, 2012). Essa estrutura pode conter centros sólidos, necróticos ou caseosos, de acordo com o estágio de evolução da doença, e se tornar uma fonte de dano tecidual (Ramakrishnan, 2012; Reece & Kaufmann, 2012), sendo

o achado histológico característico da TBP, indicando tanto a proteção, quanto a patologia (Saunders & Britton, 2007). O bacilo sobrevive no interior dessa estrutura e a transmissão da TBP requer a dissolução ou desestabilização desses granulomas (Dannenberg & Sugimoto, 1976).

### 1.6.2 – Reconhecimento de Mtb

Como já abordado anteriormente, as primeiras células imunes a entrarem em contato com o Mtb no parênquima pulmonar serão os MØs alveolares (Liu & Modlin, 2008). Assim como outras células da imunidade inata, os MØs alveolares reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através da expressão de uma grande variedade de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (Figura 6) (Akira *et al.*, 2001). O reconhecimento dessas estruturas altamente conservadas em microrganismos pode ser de forma direta pela célula, por PRRs acoplados à membrana ou presentes no citoplasma, ou indireta, por PRRs extracelulares solúveis, permitindo seu reconhecimento por outros receptores inatos (Kumar *et al.*, 2011; Mogensen *et al.*, 2009).

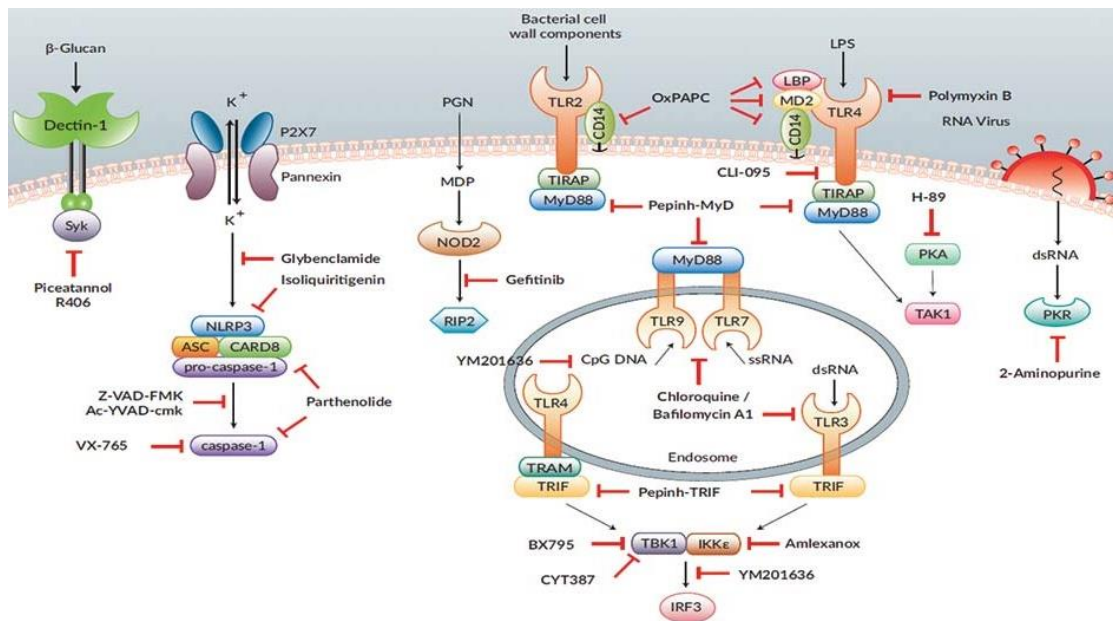


Figura 6 - Vias de sinalização ativadas por PRRs em Células Apresentadoras de Antígenos (APCs). InvivoGen (<https://www.invivogen.com/prr-signaling-inhibitors>).

Essa interação PRR-PAMP na resposta imune contra Mtb tem sido alvo de diversos estudos (Khan *et al.*, 2016, 2016a, 2016b; Mortaz *et al.*, 2014; Pahari *et al.*, 2017). Em virtude da parede celular e envelope de composições complexas (Vincent *et al.*, 2018), o Mtb consegue adentrar nos MØs usando alguns receptores como o de Fc, o Ligante de Molécula de Adesão Intercelular

Não Integrina Específica de Célula Dendríticas (DC-SIGN ou *Cluster of Differentiation* (CD) CD209), e o de Manose (MRs) (Ernst, 1998). Alguns desses receptores permitem uma entrada silenciosa e, outros, ativam os mecanismos inatos de defesa da célula (Kumar *et al.*, 2011; Mogensen *et al.*, 2009).

Um dos principais grupos de PRRs estudados são os Receptores do tipo *Toll* (TLRs) (Mahla *et al.*, 2013). Em humanos, 12 TLRs foram identificados e cada um reconhece diferentes PAMPs derivados de diferentes microrganismos como bactérias, fungos, vírus e protozoários (Akira *et al.*, 2006). Vários TLRs estão envolvidos no reconhecimento de antígenos presentes no Mtb e, subsequentemente, na ativação das células imunes, como é o caso do TLR4 ou CD284, que reconhece lipídios e lipopeptídeos e que pertence ao mesmo subgrupo que TLR1, 2 e 6 (Jo *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010). TLR4 é um habitual receptor de lipopolissacarídeos (LPS), componente da parede celular de bactérias Gram-negativas que desencadeia uma forte resposta imunológica (Lu *et al.*, 2008). Sendo também estimulado por fatores promotores de ressuscitação de Mtb (Kim *et al.*, 2013), TLR4 foi descrito ser induzido na superfície de fagócitos em infecções por cepas virulentas de Mtb, como H37Rv (Hilda *et al.*, 2012; Kleinnijenhuis *et al.*, 2011), e na forma solúvel, na efusão pleural de pacientes com TB (Lin *et al.*, 2017). Além disso, uma série de moléculas derivadas do hospedeiro também podem agir como ligantes de TLRs, como fibronectina, fibrinogênio, proteínas de choque térmico (HSP) e ácido hialurônico (Yu *et al.*, 2010).

Após a interação do Mtb com TLRs, são acionadas vias de sinalização intracelular, nas quais a molécula adaptadora Fator de Diferenciação Mieloide 88 (MyD88) desempenha papel importante (Underhill *et al.*, 1999). Subsequentemente, moléculas de Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), Quinase Associada ao Receptor de Interleucina-1 (IRAK) e Fator Ativador do Receptor de TNF 6 (TRAF6) são recrutadas na cascata de sinalização para levar à ativação do Fator Nuclear Kappa-Beta (NF- $\kappa$ B) (Takeda & Akira, 2004). Por sua vez, NF- $\kappa$ B leva à transcrição de genes para a produção, principalmente, de citocinas pró-inflamatórias, como Fator de Necrose Tumoral (TNF, também chamado de TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-12 e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Akira, 2003), bem como de moléculas

coestimulatórias em DCs e MØs. (Galli *et al.*, 2010; Takeda & Akira, 2004). Polimorfismos de TLR4 alteram produção de citocinas pró-inflamatórias (Korppi *et al.*, 2019), sendo assim, a variação da expressão desse marcador pode influenciar diretamente a resposta imune geral e específica contra Mtb.

Ainda que fundamentais, não são apenas os TLRs que têm papel no reconhecimento de PAMPs. Os Receptores do tipo Lectina C (CLRs) pertencem à família de PRRs das Lectinas do tipo C (CLec), que reconhecem estruturas polissacarídeas de patógenos, e têm sido estudados no reconhecimento de diversos antígenos bacterianos e fúngicos (Cambi *et al.*, 2005, Drummond & Brown, 2013). Entre estas, estão os  $\beta$ -glucanos, que são uma das formas mais abundantes de polissacarídeos, sendo encontrados na parede celular de bactérias e fungos, com tamanhos diferentes, porém, específicos para cada espécie e de significância variável para a imunidade (Chan *et al.*, 2009). Recentemente, os CLRs tem sido estudados na resposta imune ao Mtb (Naqvi & Endsley, 2020; Marakalala & Ndlovu, 2017). Além dos receptores MR e DC-SIGN, outros como o Receptor de Lectina-C Induzível de MØs (MINCLE) tem sido descritos como possíveis reconhecedores de padrões presentes na superfície do Mtb (Hoover *et al.*, 2019; Ishikawa *et al.*, 2009; Miyake *et al.*, 2013).

Dentre aqueles receptores expressos por MONs, MØs, NTFs e DCs, está a CLec7A/Dectina-1 (DEC-1), um CLR proteico transmembrana que reconhece  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanos (Taylor *et al.*, 2002). Apesar de sua via de sinalização intracelular ainda não ter sido completamente mapeada, observa-se que sua ativação leva ao recrutamento do complexo CARD9/Bcl-10/MALT1 (Gross *et al.*, 2006), via sinalização dependente de Src/Syk para ativar NF- $\kappa$ B (Rogers *et al.*, 2005), resultando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-6 e TNF (Brown *et al.*, 2003; Kankkunen *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2009). Essa ativação, que também se dá através do Fator Nuclear de linfócitos T Ativado (NFAT), resulta adicionalmente na produção de IL-2, IL-10 e IL-12p70, além de ROS e, em ambas as vias, na ativação da fagocitose, levando à eliminação dos agentes infecciosos (Goodridge *et al.*, 2007). Ainda, é sugerido que a DEC-1 também funcione como sensor extracelular de ativação não canônica do inflamasoma, via Caspase-8, para clivar IL-1 $\beta$  (Ganesan *et al.*, 2014; Gringhuis *et al.*, 2012).

Os primeiros resultados que fundamentaram um papel significativo de DEC-1 na ativação da resposta imune de MØs em infecção micobacteriana mostraram que a produção de TNF mediada por TLR2 requereu a molécula DEC-1 (Marakalala *et al.*, 2010; Rothfuchs *et al.*, 2007; Yadav & Schorey, 2006). Apesar de seu ligante específico ser atualmente desconhecido, já que até o momento não foram identificados  $\beta$ -glucanos nas micobactérias estudadas, há indícios de que o reconhecimento de ManLAM envolvem CLR<sub>s</sub> (Schlesinger *et al.*, 1996; Yonekawa *et al.*, 2014).

Interações de Mtb com CLR<sub>s</sub> como DC-SIGN, DEC-1 e 2 e MINCLE de MØs e DCs contribuem para a síntese de IL-10, havendo uma redundância nas vias de ativação (Shaw *et al.*, 2000). Estes também estão envolvidos na sinalização de eventos que culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias, dependendo do momento, tecido e estado de ativação das células predominantes no contexto (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011; Reiling *et al.*, 2008; Schäfer *et al.*, 2008). Além de CLR<sub>s</sub>, a vacina BCG já foi observada como capaz de ativar PRR<sub>s</sub> como TLR<sub>s</sub>, induzindo ao dano oxidativo de MØs e a inibição intracelular do crescimento de *M. bovis* BCG (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011; Kleinnijenhuis *et al.*, 2015; Ritz *et al.*, 2016; Schreibelt *et al.*, 2012). Porém, se faz necessário diferenciar o papel dessas moléculas frente a infecção com a vacina BCG Moreau e em populações neonatais.

### **1.6.3 – Fagocitose**

Após o reconhecimento inicial do patógeno, as células da imunidade inata iniciam o processo de fagocitose (Ambrose, 2006; Gordon, 2016). As vesículas endocíticas, ou endossomos, formados pela invaginação da membrana plasmática na internalização de microrganismos, podem ser chamadas também de fagossomos (Flannagan *et al.*, 2012). A princípio, esses fagossomos ainda não possuem as condições ideais para a degradação enzimática, sendo necessário então, que passem por um processo de maturação, com a fusão e fissão de outros compartimentos endossomais (Gruenberg & Stenmark, 2004). Em condições normais, o fagossomo modifica gradualmente a sua composição e estrutura e adquire proteínas de membrana altamente seletivas (Aderem & Underhill, 1999). Dentro do fagossomo, patógenos terão que lidar com a modificação do pH, que leva a uma acidificação crescente, degradando lipídios

e proteínas (Huynh & Grinstein, 2007), e com ROS e intermediários reativos de nitrogênio (RNI) gerados por enzimas fagocíticas que modificam o DNA de patógenos capturados (Fang, 2004), além de peptídeos antimicrobianos (AMPs) catiônicos, como lipocalina e  $\beta$ -defensinas (Silva *et al.*, 2019a), que vão permeabilizar sua membrana celular. Todas essas vias de destruição são influenciadas pelo estado imunológico do hospedeiro e pela capacidade de escape do patógeno (Uribe-Querol & Rosales, 2017; Yoon & Yoon, 2018).

Patógenos como o Mtb, evadem os diversos mecanismos empregados por MØs, convertendo esses compartimentos subcelulares em zonas seguras, pois resistem à acidificação, alterando a maturação endossomal e inibindo a fusão com os lisossomos (Ufimtseva *et al.*, 2019; Via *et al.*, 1997). Ademais, Mtb pode diminuir sua afinidade para AMPs pela redução de sua carga superficial (Peschel & Sahl, 2006), inibir a autofagia, neutralizar ROS e, caso seja impossível habitar o ambiente intravesicular, evadir para o citosol (Lerner *et al.*, 2015; van der Wel *et al.*, 2007).

Caso as respostas imunes inatas e intrínsecas do hospedeiro sejam inadequadas ao ponto do bacilo se replicar o suficiente, o Mtb pode romper a célula infectada (Chen *et al.*, 2006). O sistema de secreção ESX1 do tipo VII, que na cepa atenuada de *M. bovis* BCG não está presente, promove a morte da célula hospedeira por necrose (Ly & Liu, 2020; Wong, 2017). Esse processo recruta novos MØs e a liberação das micobactérias permite o contágio de células vizinhas e dissemina a infecção, contribuindo para persistência da infecção (Almeida *et al.*, 2017; de Brito & Franco, 1994).

O Mtb também subverte os efeitos mediados por prostaglandina E2 (PGE2), uma molécula eicosanoide bioativa derivada do ácido araquidônico e produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs) que executa funções na fagocitose, bem como na polarização de células imunes, multiplicação celular e produção de citocinas e anticorpos (Chen *et al.*, 2008; Harizi *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2002). Estudos demonstram que os níveis de PGE2 aumentam durante a infecção por Mtb (Moreno *et al.*, 2002) e que o bacilo é capaz de modular o metabolismo eicosanoide do hospedeiro (Divangahi *et al.*, 2010), alterando a resposta imune adaptativa, de acordo com os níveis de PGE2 e com o estágio da doença.



PGE2 pode interagir com quatro receptores de prostaglandina diferentes (EP 1 a 4), levando a respostas imunológicas distintas (Narumiya *et al.*, 1999; Ricciotti & FitzGerald, 2011). Porém, em APCs profissionais, como DCs derivadas de MONs, apenas EP2 e EP4 são ativados para a produção de citocinas (Poloso *et al.*, 2013), sendo EP2 o receptor mais abundante (Coleman *et al.*, 1994; Kawahara *et al.*, 2015; Narumiya *et al.*, 1999). Os níveis relativos de PGE2 e Lipoxina A4 (LXA4), outra molécula eicosanoide, indicam, respectivamente, se os MØs entrarão em apoptose, um fenômeno tido como benéfico para o hospedeiro, ou necrose, uma situação que favorece o Mtb (Behar *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2015). Estudos prévios do nosso grupo já mostraram que a vacina BCG Moreau induziu elevada produção do prostanoide PGE2 em MØs de indivíduos saudáveis, tanto recém-natos ainda não vacinados com BCG, quanto adultos já vacinados (Lima *et al.*, 2015). Desta forma, o processo natural que se segue envolve a investigação do padrão de expressão do receptor EP2.

#### **1.6.4 – Apresentação antigênica**

A medida que a infecção por Mtb avança, a população micobacteriana se espalha e aumenta a variedade de células que ela infecta, podendo incluir DCs, que podem subseqüentemente iniciar respostas imunes adaptativas (Ernst, 2012). A disseminação de bacilos ou componentes micobacterianos do pulmão para órgãos linfáticos secundários sempre precede o início da resposta imune adaptativa contra Mtb (Chackerian *et al.*, 2002). Componentes de Mtb, notadamente proteínas, são processadas por APCs profissionais, e os peptídeos resultantes são, então, apresentados pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) do tipo I e II (Schaible *et al.*, 2003; Trombetta & Mellman, 2005; Turley *et al.*, 2000). DCs (Mihret *et al.*, 2012) e MØs (Kirby *et al.*, 2009) são APCs que tem a capacidade de migrar para linfonodos secundários próximos; no caso da TBP, o linfonodo mediastinal (Wolf *et al.*, 2007). Da mesma forma, MONs inflamatórios CCR2+ adquirem algumas características de DCs, e contribuem para a apresentação de antígenos, levando-os até os linfonodos, mesmo que eles mesmos não os apresentem (Samstein *et al.*, 2013). Uma vez que a maioria dos tipos das células inatas efetoras podem ser infectadas, é possível que mais de uma contribua, mesmo que indiretamente, para a chegada de bacilos nos linfonodos (Hampton & Chtanova, 2019). Assim, através da

apresentação de antígenos de Mtb, as APCs ativam LT específicos e, esses, irão aumentar as funções microbidas de células da resposta imune inata (Itano & Jenkins, 2003).

Como outro mecanismo de escape, além da maturação endossomal alterada, o Mtb também interfere no processo de apresentação de antígenos e na expressão de moléculas coestimulatórias em MØs infectados (Baena & Porcelli, 2009; Khoury & Sayegh, 2004; Yuan Zha *et al.*, 2004). A família das moléculas imunes B7 constituem as mais bem caracterizadas e responsáveis pela coestimulação e homeostase das respostas imunes, levando à ativação ou à tolerância (Carreno & Collings, 2002; Collins *et al.*, 2005; Khoury & Sayegh, 2004; Yuan Zha *et al.*, 2004). A interação do ligante CD80/B7-1 com seu receptor CD28 inicia uma resposta imune de ativação dos LT, enquanto estudos mostraram que sua ligação com o receptor CTLA4 (CD152) inicia uma resposta imune oposta, ou seja, inibitória (Butte *et al.*, 2008; Chen, 2004; Sharpe & Freeman, 2002). A ativação de LT produtores de IFN- $\gamma$  (Figura 7) é crucial para o controle da TB (Boom, 1996; Flynn *et al.*, 1993) e o bloqueio de B7-1 durante a infecção por *M. bovis* levou a redução na secreção de IFN- $\gamma$  em LT (Cheadle *et al.*, 2003), inferindo a ação substancial dessa molécula.

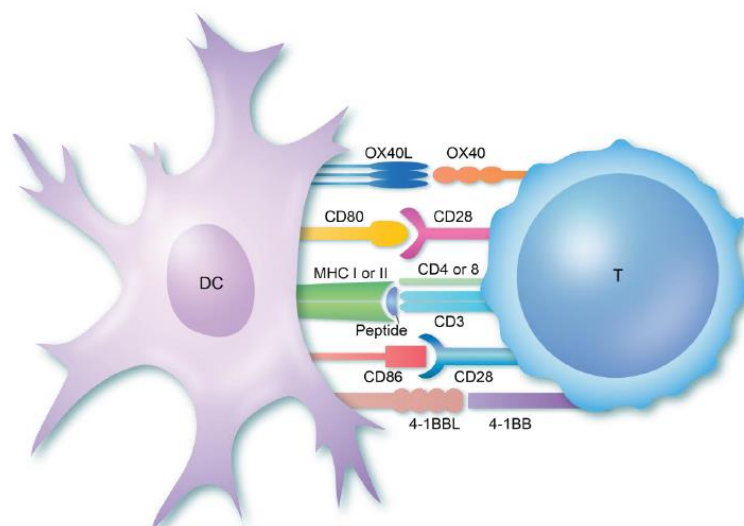


Figura 7 - Ativação de Linfócitos T. Esquema de apresentação de peptídeos por DCs via MHCs. Subsequentemente, a coestimulação ocorre através de diversas moléculas como CD86, OX40L e CD80 (B7-1), induzindo a ativação total e função efetora de linfócito.

### 1.6.5 – Resposta imune adquirida

Bacilos da TB que escapam da resposta imune inata irão proliferar até que uma resposta imune mediada por células eficaz se desenvolva, o que pode

levar de 8 a 10 dias para começar e entre 18 a 20 dias para alcançar um nível de efetividade que impacte o crescimento micobacteriano (Cooper, 2009). Os LT têm um papel crítico na proteção do hospedeiro e no desenvolvimento dessa resposta, sendo células-chave da imunidade adquirida (Mogues *et al.*, 2001; Scanga *et al.*, 2000).

LT auxiliares ou CD4<sup>+</sup> (TCD4<sup>+</sup>) reconhecem peptídeos antigênicos derivados dos compartimentos fagossômicos e apresentados via MHC II (Turley *et al.*, 2000) e coordenam diversas funções da resposta imunológica, estimulando a produção de anticorpos em LB, ativando e aumentando a capacidade microbicida de MØs e recrutando células imunes para os locais de infecção e inflamação (Júnior *et al.*, 2010; Zhu & Paul, 2008). O conceito de polarização do perfil de LT já é bem difundido, sendo a produção de citocinas; principal função de TCD4<sup>+</sup>, profundamente influenciada por essa modulação de perfil (Martinez-Sanchez *et al.*, 2018; Swain *et al.*, 1995). De acordo com o estímulo recebido para sua ativação, os TCD4<sup>+</sup> *naive* (Th0) se diferenciam em subtipos efetores, que expressam moléculas distintas e apresentam diferentes funcionalidades (Geginat *et al.*, 2014). Assim, os linfócitos T auxiliares (do inglês *T Helper*) Th0, quando ativados, podem ser classificados principalmente em células Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T regulatórios (Treg) e T foliculares (Tfh), sendo diferenciadas por expressarem os fatores de transcrição Tbet, GATA-3, PU.1, ROR $\gamma$ t, AhR, FOXP3 e Bcl-6 respectivamente. Cada subtipo irá atuar expressando citocinas distintas (Geginat *et al.*, 2014; Naito *et al.*, 2011; Romagnani, 2014).

O subtipo de LT dominante durante uma infecção é muito importante, podendo determinar a LTBI ou TBA (Actor, 2012; Tong *et al.*, 2013). Grande parte da resposta imune adquirida contra TB é dada pelos TCD4<sup>+</sup>, visto a alta suscetibilidade à Mtb em indivíduos infectados por HIV e que sofrem a depleção de TCD4<sup>+</sup> (Pawlowski *et al.*, 2012), e também a maior suscetibilidade e severidade da doença durante a depleção dessas células em primatas não humanos (PNH) (Lin *et al.*, 2012).

A resposta imune Th1 específica é considerada fundamental e de papel protetor na TBP (Boom *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2019). Esse subtipo de células são produtoras de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IFN- $\gamma$  ou TNF, que vão

contribuir para o recrutamento e ativação de células imunes (Romagnani, 2014). Apesar da produção de IFN- $\gamma$  por TCD8+, T $\gamma$  $\delta$ , NKs, e em menor quantidade, por LT *Natural Killers* (NKTs), bem como LB e APCs (Castro *et al.*, 2018), nenhuma dessas células consegue compensar uma falta naquela produção advinda de Th1 (Prezzemolo *et al.*, 2014). Porém, como o desfecho da doença é baseado em um equilíbrio, ao mesmo tempo que fornece proteção, essa resposta imune pode promover o desenvolvimento de lesões e necrose caseosa, propiciando a transmissão da doença (Lo *et al.*, 2021; Orme, 2014). A imunidade adaptativa mediada por LT contém a infecção em 95% dos indivíduos infectados com LTBI e só 5% dos pacientes desenvolvem TBA primária devido à imunidade inadequada de LT (Cooper, 2009; Mayer-Barber & Barber, 2015; Vankayalapati & Barnes, 2009).

Embora Th1 sejam essenciais, outras células do sistema imune adaptativo também participam da resposta à infecção por Mtb. Tregs, que apresentam o fenótipo CD25+ e FOXP3+, contrabalanceiam a resposta pró-inflamatória e necessária de Th1 e Th17, que inicialmente é benéfica, mas que durante o curso da infecção crônica pode se tornar prejudicial (Lyadova & Panteleev, 2015). Sendo assim, Tregs são necessárias para o bom prognóstico da doença, quando agem no momento certo (Cardona & Cardona, 2019). Os LT citotóxicos CD8+ (TCD8+) contribuem para a contenção ao Mtb, possivelmente sendo ativados por conta do deslocamento de Mtb ou seus componentes para o citosol, possibilitando a apresentação de antígenos via MHC I (Harriff *et al.*, 2012; van der Wel *et al.*, 2007). Sendo também produtores de IFN- $\gamma$  e competentes efetores citotóxicos, TCD8+ expressam granzimas, Fas-L (CD95L), granulinas e perforinas, que além de terem a capacidade de matar Mtb intracelularmente (Ernst *et al.*, 2000), conferindo-lhes a capacidade de *lisar* MØs infectados com Mtb, ajudando a controlar a infecção (Boom, 1996; Boom *et al.*, 2003). Essa *lise* celular induzida por TCD8+ leva a célula hospedeira a apoptose, que por sua vez proporciona um direcionamento mais eficiente de micobactérias contidas nos corpos apoptóticos, podendo essas serem fagocitadas por MØs ativadas (Behar, 2013; Schaible *et al.*, 2003).

De forma semelhante, mas reconhecendo peptídeos micobacterianos diferentes dos reconhecidos por TCD4+ e TCD8+ (Tsukaguchi *et al.*, 1995), os

T $\gamma$ δ produzem IFN- $\gamma$  e podem *lisar* MØs infectados (Barnes *et al.*, 1992; Boom, 1999), fazendo uma ponte entre as imunidades inata e adaptativa ao utilizar seus receptores de células T (TCR) como um PRR (Holtmeier & Kabelitz, 2005). A atividade protetora de T $\gamma$ δ já foi também vista em PNH vacinados com BCG, que tiveram maior capacidade de ativar T $\gamma$ δ em resposta ao desafio por Mtb (Shen *et al.*, 2002).

Sendo a TB uma infecção crônica, e portando de longa duração, a exposição persistente de antígenos de Mtb pode induzir os LT a expressarem um fenótipo conhecido como exaustão, caracterizado com a perda progressiva da sua função efetora com menor produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias e expressão elevada de moléculas inibitórias, dentre muitas, o receptor celular 2 do vírus da hepatite A (HAVCR2) ou o domínio de imunoglobulina e mucina de célula T-3 (TIM-3) (Hastings *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2017).

TIM-3 é uma molécula de superfície expressa tanto por TCD4+ e TCD8+ que secretam IFN- $\gamma$  (Th1 e Tc1 respectivamente) (Monney *et al.*, 2002), assim como Th17 e Tregs (Gao *et al.*, 2012; Hastings *et al.*, 2009). Seu papel vem sendo estudado em contextos antagônicos, servindo de modelo como uma molécula que contém um potencial não só inibitório, mas que também possa promover a ativação de células imunes e produção de citocinas importantes em alguns contextos (Jayaraman *et al.*, 2016; Nakayama *et al.*, 2009). TIM-3 quando expresso em LT interage com MØs através do seu ligante, o mediador solúvel que se liga a membranas, Galectina-9 (GAL-9) (Niki *et al.*, 2018), propiciando a ativação dessas APCs (Jayaraman *et al.*, 2010). Em moDCs humanas tratadas com GAL-9, há maior secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, mas não IL-10, com aumento na expressão das moléculas coestimulatórias CD40, B7-1 e HLA-DR, eliciando LT à produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Dai *et al.*, 2005).

Em MONs e MØs humanos, TIM-3 regula negativamente a produção de IL-12 durante a infecção por vírus da hepatite C, além de aumentar a expressão de outros imunoreguladores de exaustão, como PD-1 e SOCS-1 (Zhang *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, TIM-3 já foi demonstrado como crucial na fagocitose de células apoptóticas e na apresentação cruzada por MØs e DCs (Nakayama *et al.*, 2009), assim como na capacidade de promover atividade antimicrobiana,

pela indução de IL-1 $\beta$  dependente da caspase-1 (Jayaraman *et al.*, 2016). Durante a infecção por Mtb, o engajamento de TIM-3/GAL-9 em MØs estimula a secreção de IL-1 $\beta$ , que aumenta diretamente a sinalização por TNF ao regular positivamente a expressão de TNFR1 na superfície de MØs, levando a uma restrição do crescimento intracelular de Mtb (Jayaraman *et al.*, 2013). Já o bloqueio dessa via, leva a inibição de ambas, IL-1 $\beta$  e TNF, que são cruciais no combate primário à TB (Kang *et al.*, 2020). Em pacientes com TBA, TCD4+ expressando TIM-3 mostraram maior ação efetora e produção de citocinas do perfil Th1 (Qiu *et al.*, 2012). Sabendo que o controle de Mtb intracelular requer uma resposta imune Th1 efetiva (Flynn & Chan, 2001), entender a modulação de TIM-3 no contexto da vacina BCG em células da imunidade inata que também a expressam, como NKs, MONs e DCs, se faz necessário (Gleason *et al.*, 2012).

### **1.7 – Respostas imunes de citocinas durante a infecção por Mtb**

A defesa do organismo contra diferentes patógenos requer uma fina sintonia celular (Chaplin, 2010; Nicholson *et al.*, 2016). Uma estimulação antigênica, com reconhecimento de PAMPs por PRRs pelas diversas células do sistema imune, desencadeia cascatas de sinalização intracelulares por diferentes vias, nas quais diversos fatores de transcrição são ativados, favorecendo a síntese de RNAs mensageiros (mRNA) de uma variedade de fatores como as citocinas (Akira *et al.*, 2001).

Sendo um grande grupo de proteínas, peptídeos ou glicoproteínas em forma de fatores solúveis e que regulam a atividade de outras células, as citocinas são parte essencial da rede de sinalização intercelular, indispensáveis para a geração e regulação da resposta imune (Holtmann & Resh, 1995). Essas moléculas atuam em concentrações baixíssimas de forma autócrina, parácrina, ou, em certos casos, endócrina (Lin *et al.*, 2000; Zhang & An, 2007), afetando quase todos os processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário, até o processo degenerativo de envelhecimento, tomando parte no crescimento, proliferação, ativação, diferenciação e migração celular, na polarização de respostas imunes, quimiotaxia e na morte celular (Dinarello, 2007; Hopkins, 2003).

Uma única citocina pode apresentar diversas funções biológicas, dependendo da sua concentração, da coestimulação e das células presentes, possuindo assim, características pleiotrópicas, sendo algumas redundantes, efetuando as mesmas funções (Dinarello, 2007; Hopkins, 2003). No entanto, as citocinas com efeito sinérgico também podem ser expressas para que haja uma função otimizada, determinando assim se a resposta imune será citotóxica, humoral, celular ou alérgica (Bartee & McFadden, 2013). Por conta de suas múltiplas funções, o termo *cytokine* (citocina), proposto em 1974 (Cohen *et al.*, 1974) em substituição ao termo *lymphokine* (linfocina) (Dumonde *et al.*, 1969), foi subdividido em 1979, durante o Segundo *Workshop* Internacional de Linfocinas, sendo proposto o termo *interleucina* com o intuito de simplificar a crescente lista de novas moléculas descobertas, mas sem muito sucesso (di Giovine & Duff, 1990). Como resultado, a nomenclatura atual que as classifica é amplamente aceita, apesar de imperfeita. Citocinas incorporam os *Interferons* (IFNs), as ILs, as quimiocinas (famílias CCs, CXCs, CX3Cs ou XCs, dependendo da posição de seus resíduos de cisteína), fatores de crescimento mesenquimais (GFs), TNFs, adipocinas (ADKs) e fatores estimuladores de colônias (CSFs) (Dinarello, 2007).

### **1.7.1 – Fatores de Crescimento**

A disponibilidade de APCs em concentrações razoáveis é necessária para uma resposta imune efetiva (Twomey *et al.*, 1973; Zini, 2011). O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é produzido principalmente por células mononucleares e fibroblastos, estimulando células progenitoras de granulócitos (Demetri & Griffin, 1991; Nagata *et al.*, 1986; Yoshikawa *et al.*, 1995). Apesar do seu nome, em concentrações altas esse fator é também capaz de estimular um pequeno número de MØs (Basu *et al.*, 2002), assim como outro membro da mesma família de CSFs: o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). O GM-CSF é expresso por muitas células imunes, incluindo MØs e LT, e durante a inflamação, estimula granulócitos, MØs e realiza uma ponte entre as células mieloides e linfoides (Becher *et al.*, 2016; Kaushansky *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1985; Sehgal *et al.*, 1987). Observou-se que o bloqueio de GM-CSF torna os MØs mais permissíveis ao crescimento de Mtb, enquanto a adição desse fator, aumenta a capacidade de controle bacteriano

(Bryson *et al.*, 2019). Os MONs diferenciados com GM-CSF produzem IL-23, enquanto os diferenciados na presença de M-CSF produzem IL-10 após exposição micobacteriana (Verreck *et al.*, 2004), o que aponta que CSFs podem impactar distintamente no perfil de citocinas e no desfecho da TB.

### **1.7.2 – Interleucina-1 (IL-1)**

A família da IL-1 é uma das mais notáveis pelas respostas associadas a imunidade inata, sendo sintetizadas por MØs, MONs, NTFs e uma diversidade de outras células (Dinarello, 2017; Kaneko *et al.*, 2019). A IL-1 $\beta$ , já chamada de pirógeno leucocitário humano ou endógeno, é um importante e potente mediador inflamatório, participando também na proliferação e diferenciação celular e na apoptose (Dinarello, 2017; Kaneko *et al.*, 2019). Juntamente à IL-1 $\alpha$ , tem sinergia acentuada com TNFs, promovendo febre e inflamação, sendo sua expressão rigorosamente controlada, pois sua produção excessiva está implicada em diversas patologias humanas (Arend *et al.*, 2008). Em modelo de camundongo, animais se mostram suscetíveis à infecção aguda (Di Paolo *et al.*, 2015) e crônica (Guler *et al.*, 2011) por Mtb na ausência de IL-1 $\alpha$  e ambas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , já foram descritas como tendo efeitos protetores e ação pró-inflamatória contra Mtb (Bourigault *et al.*, 2013; Cooper *et al.*, 2011; Jayaraman *et al.*, 2013; Mayer-Barber *et al.*, 2011; Verway *et al.*, 2013), porém, em abundância pode também resultar em inflamação exacerbada e um mau desfecho na TB (Chao *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2012).

### **1.7.3 – Interleucinas-31 e 33 (IL-31 e IL-33)**

A IL-33 (ou IL-1F11) também faz parte da família da IL-1, porém, tendo um receptor próprio, o ST2 (Griesenauer & Paczesny, 2017). A IL-33 tem um papel crucial na modulação de células imunes e em condições como asma e doenças pulmonares, sendo uma molécula de dupla atividade, funcionando intracelularmente como um fator nuclear, e extracelularmente, como citocina, promovendo, assim, uma resposta pró-inflamatória (Murdaca *et al.*, 2019). Estudos demonstram que, juntamente à IL-31, uma citocina que estimula a secreção de outros fatores inflamatórios e regula proliferação e remodelação celular, o eixo IL-31/IL-33 está envolto em respostas inflamatórias e alérgicas tendo as duas uma relação sinérgica (Murdaca *et al.*, 2019). Em outras situações, IL-33 também proporciona uma polarização celular, estimulando



respostas imunes do tipo Th2 e a produção de citocinas associadas a esse perfil, como IL-4, IL-5 e IL-13 (Arend *et al.*, 2008,). Sendo assim, seu papel na TB pode depender do estágio da infecção (Wieland *et al.*, 2009).

#### **1.7.4 – Interleucina-6 (IL-6)**

A IL-6 tem papel substancial ao promover a inflamação, evento necessário na resposta imune contra patógenos micobacterianos (Martinez *et al.*, 2013; Sasindran & Torrelles, 2011). A IL-6 é produzida não apenas por células imunes, como MØs, Th1 e LB, mas também por células endoteliais, mesenquimais e fibroblastos (Akira *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 2014). A IL-6 é uma das primeiras citocinas produzidas após algum evento emergente ou agudo, como uma infecção ou lesão, atuando tanto na resposta imune inata, quanto na adaptativa, sendo um mediador de febre (Sehgal *et al.*, 1987). Respostas de LT necessitam de IL-6 para o desenvolvimento ideal em infecções micobacteriana e durante a vacinação (Appelberg *et al.*, 1994; Leal *et al.*, 1999) e sua ausência durante um desafio com alta dose de Mtb em camundongos é letal, sugerindo que no momento em que a resposta imune adaptativa é acionada, essa citocina se torna crítica (Ladel *et al.*, 1997). Como fator antimicobacteriano, IL-6 se mostra menos importante que outros fatores como TNF (Sodenkamp *et al.*, 2012) e, apesar de em humanos seus efeitos inflamatórios estarem correlacionados com a progressão da doença (Ilonidis *et al.*, 2006; Tsao *et al.*, 1999), essa citocina se mostra essencial para a geração da resposta imune do tipo Th1 após a vacinação com subunidade de Mtb (Leal *et al.*, 1999).

#### **1.7.5 – Prostaglandina E2 (PGE2) e Leucotrieno B4 (LTB4)**

Estímulos como traumas, peptídeos microbianos e citocinas, como a IL-6, iniciam a síntese de ácido araquidônico (AA) no citosol (Tallima & Ridi, 2018), sendo esse metabolizado através de diferentes vias e podendo gerar produtos como a PGE2 (Park *et al.*, 2006) e o Leucotrieno B4 (LTB4) (Peters-Golden & Henderson, 2007). Sendo o mais importante e abundante, PGE2 tem diversas funções biológicas, dentre elas a diminuição do tônus do músculo liso brônquico, levando à bronco-dilatação (Sastre & del Pozo, 2012). Durante a TB, PGE2 afeta o resultado da infecção, direcionando os MØs para a apoptose, ao invés de necrose (Divangahi *et al.*, 2010), levando a um melhor controle do crescimento micobacteriano dentro de MØs infectados. Como já dito, a vacina BCG Moreau

induziu elevada produção de PGE2 em grupos de indivíduos saudáveis (Lima *et al.*, 2015).

Agindo também como quimiotático leucocitário, LTB4 é um mediador lipídico pró-inflamatório sintetizado por granulócitos, osteoclastos, MØs, Th1, Th2, Th17, TCD8+ e DCs (He *et al.*, 2020; Kim & Luster, 2007; Samuelsson *et al.*, 1987). A produção em excesso desse mediador contribui para um mau prognóstico durante a infecção por Mtb (Dietzold *et al.*, 2015, Tobin & Ramakrishnan, 2013), como visto em modelo de *zebrafish*, onde altos níveis de LTB4 promoveram a produção aberrante de TNF e uma hipersensibilidade à infecção micobacteriana (Tobin *et al.*, 2010).

#### **1.7.6 – Interleucina-2 e 7 (IL-2 e IL-7)**

Ainda no contexto inflamatório, IL-2 e IL-7 pertencem a mesma superfamília, sendo secretadas por tímócitos, LB imaturos, LT maduros, DCs e alguns outros tipos celulares não-imunes (Liao *et al.*, 2011). A IL-7 age no desenvolvimento, proliferação e diferenciação de LT e LB, sendo necessária para a geração e sobrevivência de LT de memória (Barata *et al.*, 2019; Goodwin *et al.*, 1989; Hofmeister *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2017a; Lupton *et al.*, 1990). Camundongos infectados com Mtb demonstraram maior sobrevivência quando IL-7 ou IL-15 são usadas como tratamento após infecção (Maeurer *et al.*, 2000). A desregulação de IL-7 também está envolvida na falha da resposta imune adquirida durante a infecção por HIV (Rethi *et al.*, 2005; Sasson *et al.*, 2006) e, recentemente, foi descrito que, durante a TB, LT tem sensibilidade reduzida a IL-7 (Lundtoft *et al.*, 2017).

Já a IL-2, fator de crescimento autócrino expresso principalmente por DCs, TCD4+ e TCD8+ ativados, afeta muitos tipos celulares, como MØs, NKs, NTFs, sendo essencial para a expansão de LT e para a geração de LT efetores e de memória (Abbas *et al.*, 2018; He & Malek, 1998; Smith, 1988). Camundongos vacinados com BCG apresentaram uma população TCD4+ específica, produtora de IL-17, TNF e IL-2, capaz de controlar a infecção pós desafio com Mtb, mesmo após longa data (Cruz *et al.*, 2015). Além de ser um promissor marcador para diferenciação entre LTBI e TBA (Sun *et al.*, 2016), estudos mostram que IL-2 pode ser importante durante a infecção crônica por

Mtb, restaurando a função de LT após sua exaustão (Liu *et al.*, 2019, Sakhno *et al.*, 2006).

### 1.7.7 – Interleucina-12 (IL-12)

Um perfil celular do tipo Th1, essencial na resposta imune frente à TB, pode ser alcançado com a ativação de LT por APCs secretando IL-12 (Cooper *et al.*, 1997; Gutcher & Becher, 2007; Trinchieri, 1993; Wu *et al.*, 1993). A família da IL-12 é composta por citocinas heterodiméricas de cadeias  $\alpha$  IL-12(p19, p28 ou p35) e  $\beta$  IL-12(p40 ou Ebi3), que dependendo do emparelhamento, forma diferentes citocinas, como a IL-23, formada por p40 e p19, e a IL-27, por Ebi e p28 (Vignali & Kuchroo, 2012). O emparelhamento de IL-12p40 e IL-12p35 forma a IL-12p70 bioativa, potente indutor da imunidade mediada por células (Thompson & Orr, 2018). Essa citocina sinaliza através de receptores membros da família de transdutores de sinal de quinase Janus e ativadores de transcrição (JAK-STAT) em LT e NKs (Gotthardt *et al.*, 2019; Seif *et al.*, 2017). Esse processo leva a um *feedback* positivo quando LT produzem IFN- $\gamma$ , que por sua vez, prima APCs para produzirem mais IL-12, sendo essa produzida por DCs, M $\phi$ s e LB em resposta a patógenos microbianos (Vignali & Kuchroo, 2012). Nos pulmões, a produção de IL-12p70 não é alta e é possível que a produção local nos linfonodos seja necessária para que se inicie uma resposta imune otimizada e com participação de IFN- $\gamma$  (Cooper *et al.*, 2002; Khader & Cooper, 2008).

Interessantemente, Mtb é um potente indutor da subunidade IL-12p40 e sua deficiência leva a uma maior suscetibilidade micobacteriana (Filipe-Santos *et al.*, 2006). A ausência da subunidade IL-12p35 também leva à consequente perda de IL-12p70 bioativa e uma redução significativa de LT produtoras de IFN- $\gamma$ , tornando essas células dependentes de IL-23 (Cooper *et al.*, 2002; Khader *et al.*, 2005). No entanto, só esse estímulo não é suficiente para manter um controle micobacteriano de longo prazo (Cooper *et al.*, 1995, 2011).

O sistema imune imaturo de neonatos é propenso a uma resposta imune dos tipos Th2 e Th17 (Barrios *et al.*, 1996; Debock & Flamand, 2014; Kollmann *et al.*, 2009; Morris & Surendran, 2016). Com uma produção reduzida de IL12p70 e baixa resposta Th1 (Barrios *et al.*, 1996; Basha *et al.*, 2014; Kollmann *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 1996), uma maior indução dessa citocina e do perfil pró-inflamatório poderia ser benéfico para o combate à patógenos intracelulares. A

ausência do receptor de IL-12 (IL-12 $\beta$ 1) em crianças está associada à infecção disseminada por BCG após a vacinação (Mansouri *et al.*, 2005; Pourakbari *et al.*, 2019). Apesar de ter um papel dominante na indução de IFN- $\gamma$  na terapia contra câncer de bexiga (O'Donnell *et al.*, 1999), a vacina BCG não é vista como um potente indutor de IL-12 em DCs de neonatos (Kativhu & Libraty, 2016), especialmente quando essas maturam na presença de BCG (Gagliardi, 2005; Larsen *et al.*, 2007). Porém, IL-12 e BCG juntas já demonstraram a capacidade de ativar MØs alveolares de murinos, induzindo uma maior produção de TNF e óxido nítrico (NO) (Xing *et al.*, 2000). Sendo assim, a indução de IL-12 é um dos alvos na estratégia de potencializar o efeito protetor das vacinas contra TB (Palendira *et al.*, 2002).

### **1.7.8 – Interferon do tipo I (IFN-I)**

Os IFNs são uma família de citocinas essenciais no combate às infecções por patógenos intracelulares, como o Mtb, que necessitam de uma ação conjunta das respostas imunes inata e adaptativa (Mayer-Barber & Barber, 2015). Essas respostas também requerem a ação de TCD8+ e o aumento da expressão de MHC do tipo I e II (Boehm *et al.*, 1997). IFNs do tipo I, como IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , são secretados por quase todo tipo de células e constituem uma das principais defesas contra agentes virais (Haji Abdolvahab *et al.*, 2016; Maeyer Maeyer-Guignard, 1998). Os IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  tem efeitos imunomodulatórios singulares, elevando a ação de DCs, MØs, NKs, TCD4+, TCD8+ e LB (McNab *et al.*, 2015), estimulando a produção de IFN- $\gamma$  (Cousens *et al.*, 1999) e inibindo a expressão de IL-4 em MONs (Dickensheets & Donnelly, 1999). Não há consenso sobre a atividade micobacteriana de IFNs I, havendo indícios de que essas citocinas estejam associadas a uma falha na indução da resposta imune protetora do tipo Th1 (Manca *et al.*, 2001) e ao aumento da expressão de reguladores negativos da via JAK-STAT (Manca *et al.*, 2005). Durante a TB, IFN $\alpha/\beta$  são necessários apenas o suficiente para iniciar o recrutamento de fagócitos e seu excesso pode limitar o estado de ativação de MØs infectados (Domingo-Gonzalez *et al.*, 2016), promovendo a doença ao induzir IL-10, a qual suprime a resposta imune do tipo Th1 (Ottenhoff *et al.*, 2012; Travar *et al.*, 2015) e restringe a síntese de IL-1 (Novikov *et al.*, 2011). Mesmo que as concentrações dos dois tipos de IFN (I e

II) estejam em concentrações semelhantes, IFN-I limita a expressão de MHC II induzida por IFN- $\gamma$  em APCs no momento da infecção (Lousberg *et al.*, 2010).

### **1.7.9 – Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina-18 (IL-18)**

O IFN do tipo II, ou IFN- $\gamma$ , é produzido principalmente por NKs e LT durante a resposta pró-inflamatória (Tau & Rothman, 1999), antagonizando a resposta imune do tipo Th2 (Teixeira *et al.*, 2005). O IFN- $\gamma$  tem seu desempenho influenciado pela presença de vitamina D (Gou *et al.*, 2018) e é tido como predominante na resposta imune do tipo Th1 contra a TB, exercendo diversas funções como o recrutamento de LT, a indução da expressão de MHC II e a mudança de isotipo de imunoglobulina (Ig) para IgG2a em LB (Schroder *et al.*, 2004; Zuniga *et al.*, 2012), além de aumentar a atividade micobactericida em MØs infectados, induzindo a explosão respiratória (*Respiratory burst*) e a produção de ROS e RNI (Ehrt & Schnappinger, 2009). Estudos com camundongos vem há tempo demonstrando que a deficiência de IFN- $\gamma$  induz à uma falha na ativação de MØs e consequente deficiência no controle do crescimento bacteriano (Cooper *et al.*, 1993; Flynn *et al.*, 1993). Apesar de paradoxal ao seu papel pró-inflamatório clássico, IFN- $\gamma$  também limita a produção de IL-1 ao induzir RNI e interferir com o inflamassoma NLRP3 (Mishra *et al.*, 2012), além de induzir a apoptose de NTFs (Nandi & Behar, 2011).

A produção de IFN- $\gamma$  também é controlada pela secreção de IL-18 produzida por APCs (Schroder *et al.*, 2004). Assim como outras da mesma família (IL-1 e IL-33), a IL-18, originalmente chamada de fator indutor de IFN- $\gamma$  (IGIF) (Okamura *et al.*, 1995), é produzida em sua forma pro-IL-18 inativa e necessita de Caspase-1 para clivar seu precursor em sua forma ativa (Dinarello *et al.*, 1998). A IL-18 é uma citocina pleiotrópica secretada constitutivamente por vários tipos celulares, como micróglia, queratinócitos, osteoblastos, MØs, DCs, células de Kupffer e células epiteliais do intestino (Swain *et al.*, 2001). A sinalização por IL-18 modula diversas reações imunes, intensificando, principalmente, a expressão de IFN- $\gamma$  em NKs e TCD4+ e promovendo um perfil Th1, com consequente aumento da ação microbicida de MØs (Wawrocki *et al.*, 2016). Apesar de estudos mostrarem uma menor contribuição de IL-18 na infecção por Mtb (Kinjo *et al.*, 2002; Sugawara *et al.*, 1999), mais recentemente foi desvendada uma suscetibilidade aguda ao Mtb em murinos na ausência de

IL-18, com menor produção de IFN- $\gamma$  por TCD4+ e TCD8+, suscitando em uma resposta imune do tipo Th1 diminuída (Korbel *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2010).

#### **1.7.10 – Fator de Necrose Tumoral (TNF)**

A superfamília TNF é um grupo de citocinas composto de TNF  $\alpha$  e  $\beta$  (ou linfotoxinas  $\alpha$  e  $\beta$ ), CD40L, CD27L, CD30L, Fas-L/CD95L, 4-1BBL, OX40L, TRAIL, dentre outras (Aggarwal *et al.*, 2012; Ware, 2002). Com funções biológicas e vias de ativação variadas, o TNF (ou caquectina) (Beutler *et al.*, 1985) é uma citocina pró-inflamatória icônica descrita como uma proteína transmembrana do tipo II disposta em homotrímeros estáveis, primeiramente identificada como destruidora de células tumorais (Old, 1985; Pennica *et al.*, 1984). Apesar de alguns ligantes da família dos TNFs apresentarem redundância (Aggarwal *et al.*, 2012; Cheung & Ware, 2013), TNF se liga a apenas dois receptores, TNFR1 e TNFR2 (MacEwan, 2002). Produzida principalmente por MONs e MØs ativados, mas também por NKs e LT após algum sinal de agressão, como a presença de produtos bacterianos, como LPS (Gruss & Dower, 1995) e LAM (Moreno *et al.*, 1989), pode induzir tanto a ativação, proliferação e diferenciação celular, sendo um importante mediador de fase aguda e crônica da inflamação, quanto a morte celular por apoptose ou necrose, agindo também no metabolismo lipídico e promovendo a inflamação sistêmica (Idriss & Naismith, 2000). Agindo em sinergia com IFN- $\gamma$ , TNF ativa mecanismos de destruição do Mtb em MØs infectados (Dorhoi & Kaufmann, 2014) e recruta novos MØs para o sítio de infecção; o que já é estabelecido promover a replicação de Mtb, a despeito de ser necessário para atividade tuberculostática (Clay *et al.*, 2008). Sua necessidade no controle da infecção pelo Mtb já foi observada em modelo animal deficiente de TNFR1 ou após a neutralização de TNF (Flynn *et al.*, 1995) e em estudos nos quais seu bloqueio promoveu a disseminação do bacilo para o SNC (Lynch *et al.*, 2010; Seong *et al.*, 2007).

#### **1.7.11 – Ligante de CD40 Solúvel (sCD40L)**

A molécula coestimulatória CD40 da superfamília dos receptores de TNF é expressa constitutivamente por células endoteliais, musculares lisas e epiteliais, fibroblastos e, particularmente, APCs (Schönbeck & Libby, 2001). A união com seu ligante CD40L (CD154), expresso, principalmente, por TCD4+ e

LB ativados e por plaquetas, embora também seja induzido em células monocíticas, ativa as APCs e induz uma série de respostas imunes (Elgueta *et al.*, 2009). Sua forma solúvel (sCD40L) mantém sua atividade biológica e funciona como uma citocina (Graf *et al.*, 1995; Grewal & Flavell, 1998). A coestimulação por CD40 leva à produção de diversos mediadores inflamatórios, como IL-8, TNF e MIP-1 $\alpha$  (Kawabe *et al.*, 2011), induzindo apoptose e produção de IL-12 (Cella *et al.*, 1996), sendo também necessária para a geração de IL-17 nas respostas imunes contra Mtb, como demonstrado por estudo no qual Mtb prejudicou essa ligação em DCs, tornando essas células incapazes de produzir IL-17 e, assim, restringindo as respostas imunes dos tipos Th1 e Th17 (Sia *et al.*, 2017).

#### **1.7.12 – Interleucina-23 e 27 (IL-23 e IL-27)**

Algumas citocinas fazem uma conexão entre as respostas imunes inata e adaptativa, como é o caso da IL-27, que influencia M $\phi$ s, DCs, NKs, LB e LT, podendo potencializar funções de Th1 e suprimir aquelas de Th2 e Treg (Wang & Liu, 2016), ou mesmo antagonizar os perfis Th1 e Th17, ao promover secreção de IL-10 durante o processo inflamatório crônico (Stumhofer *et al.*, 2006, 2007). Devido à natureza pleiotrópica da IL-27, é muito difícil dissecar sua função específica na TB. Porém, no pulmão, a ausência de IL-27R induz a um melhor controle no crescimento bacteriano (Höelscher *et al.*, 2005; Pearl *et al.*, 2004), ainda que o mecanismo para tal seja desconhecido.

A produção de IL-23 em DCs e M $\phi$ S ativados na resposta à antígenos microbianos é aumentada quando há ligação de CD40/CD40L (Vignali & Kuchroo, 2012). Em LB, essa interação induz também a liberação de IL-2 por TCD4+, influenciando diretamente aquelas células, que entram em divisão e diferenciação em plasmócitos, bem como mudança de isotipo de Ig (Kawabe *et al.*, 2011). Assim como IL-27, a IL-23 é composta de dois heterodímeros de IL-12 (Oppmann *et al.*, 2000). A IL-23 é pró-inflamatória e produzida por DCs e M $\phi$ s ativados (Hou *et al.*, 2018) e, assim como IL-12, a sua expressão também cria um *feedback* positivo (Parham *et al.*, 2002). A expressão de IL23R promove a ativação e expansão de LT de memória e o aumento da produção de outros mediadores inflamatórios, como IFN- $\gamma$ , IL-22, GM-CSF, TNF e, especialmente, IL-17, formando o eixo IL-23/IL-17 (Lankford, 2003; Lubberts, 2015; Wozniak *et*

*al.*, 2006a). Camundongos deficientes em IL-23, quando vacinados com BCG, geram LT deficientes na produção de IFN- $\gamma$  (Wozniak *et al.*, 2006) e aqueles que são deficientes na subunidade p19, resultando na ausência de IL-23, apresentam maior dificuldade de controlar a infecção crônica por Mtb, por conta da capacidade reduzida de LT migrarem dos vasos sanguíneos para o sítio de infecção (Khader *et al.*, 2011). O pré-tratamento de camundongos com adenovírus vetor capaz de codificar IL-23 também aumentou o número de TCD4+ ativadas e com marcadores de memória nos pulmões e linfonodos drenantes após infecção por Mtb (Happel *et al.*, 2005).

### **1.7.13 – Interleucina-17 (IL-17)**

A resposta imune do tipo Th17 é caracterizada por LT expressando o fator de transcrição ROR $\gamma$ t, sendo diferenciados pela indução via IL-6, Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) e IL-1 $\beta$ , e ativados por IL-23, via sinalização pelo transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) (Pastor-Fernández *et al.*, 2020). A IL-23 pode promover a indução de T $\gamma$  $\delta$  produtoras de IL-17 sinergicamente com IL-18 (Lalor *et al.*, 2011a; Sutton *et al.*, 2012). Da família das IL-17, que inclui 6 membros (de A até F), a IL-17A é a citocina pró-inflamatória mais estudada, exercendo efeito principalmente em células mielóides e mesenquimais, como células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, osteoblastos, M $\phi$ s e DCs (Xu & Cao, 2010). A IL-17A também induz expressão de quimiocinas como IL-8 e CCL2; fatores de crescimento como G-CSF e GM-CSF; citocinas, como IL-6 e TNF e; fatores de remodelamento tecidual, como a colagenase do tipo IV (Kolls & Lindén, 2004; Li *et al.*, 2018). A IL-17A tem papel importante no controle da microbiota intestinal, mas também no recrutamento de NTFs, angiogênese, *priming* de LT e produção de anticorpos, agindo na defesa do organismo contra patógenos microbianos e na inflamação (Iwakura *et al.*, 2011). Tanto IL-17A, quanto IL-17F, são coproduzidas, majoritariamente, como homodímeros (ou um heterodímero IL-17AF) por células Th17, TCD8+ e T $\gamma$  $\delta$  (Chen & Kolls, 2017; Iwakura *et al.*, 2011), e apresentam muitas similaridades, sendo a IL-17F identificada como indutora de outras citocinas, como IL-6 e IL-8, com papel importante na indução de neutrofilia (Starnes *et al.*, 2001). Apesar de usarem o mesmo receptor (IL-17R), homodímeros de IL-17A induzem uma resposta imune mais potente (McGeachy *et al.*, 2019).



A atividade de IL17A durante a TB pode ser um fator discriminatório entre LTBI e TBA (Pollara *et al.*, 2021). Sua supressão também proporciona um aumento na suscetibilidade à TB (Segueni *et al.*, 2016) e aquela já se mostrou essencial na proteção contra cepas de Mtb, como HN878 e H37Rv (Khader *et al.*, 2007; Monin *et al.*, 2015), havendo evidências de que as respostas imunes induzidas por Th17 sejam desreguladas ou interrompidas em pacientes com TB (Luo *et al.*, 2017; Torrado & Cooper, 2010; Shen & Chen, 2017). Na TB crônica, a produção de IL-17A é diminuída em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), além de apresentar níveis menores após estímulo *ex vivo* (Khan *et al.*, 2017; Rai *et al.*, 2016; Shen & Chen, 2017), sendo essa menor produção relacionada à exaustão de LT após superexposição à antígenos de Mtb (Khan *et al.*, 2017). Já IL-25 (IL-17E) promove o recrutamento de eosinófilos e a supressão das respostas imunes dos tipos Th1 e Th17 (Saenz *et al.*, 2010), induzindo a expressão de IL-4, IL-5 e IL-13, todas associadas com o perfil Th2, e importantes em doenças pulmonares alérgicas (Xu & Dong, 2017).

#### **1.7.14 – Interleucina-21 e 22 (IL-21 e IL-22)**

As células Th17; assim como NKs e TCD8+, também produzem IL-21, que ajuda a sustentar a resposta imune do tipo Th17, tem ampla ação pleiotrópica (Davis *et al.*, 2015) e está envolvida na patogênese de diversos processos inflamatórios (Spolski & Leonard, 2014). A IL-22 possui papel importante nas barreiras de defesas do hospedeiro, como os pulmões e mucosa oral, sendo produzida por Th1, Th17, T $\gamma$  $\delta$ , Th22, NKTs, NTFs e M $\phi$ s (McAleer & Kolls, 2014) e agindo em células não hematopoiéticas, nas quais estimula a sobrevivência, proliferação e síntese de AMPs (Aujla *et al.*, 2008; Kolls *et al.*, 2008; McAleer & Kolls, 2014). O papel de IL-21 é importante tanto para o reparo celular, quanto na resposta imune à patógenos (Dudakov *et al.*, 2015), e tem sido relatado como protetivo contra TB e associado a uma indução de IFN- $\gamma$  (Booty *et al.*, 2016). A quantidade de células produtoras de IL-22 estão em níveis mais elevados do que IL-17 no sítio de infecção e detectou-se sua presença em granulomas durante a infecção por Mtb em PNH (Yao *et al.*, 2010) e em exsudatos pleurais e pericárdicos em humanos (Matthews *et al.*, 2011).

### **1.7.15 – Fatores de remodelamento tecidual**

As citocinas também auxiliam a coordenar a ação de outros fatores, como integrinas e enzimas do tipo proteases, que modificam a integridade tecidual da matriz extracelular, interferindo na principal unidade estrutural do parênquima pulmonar (Dunsmore & Rannels, 1996). Metaloproteinases de Matriz (MMPs) (Crosby & Waters, 2010), especialmente a colagenase do tipo IV ou MMP9, são secretadas por uma gama de células, incluindo fibroblastos, MØs, NTFs e células endoteliais (Yabluchanskiy *et al.*, 2013). Estas enzimas promovem a restauração da homeostase, não apenas durante o reparo tecidual após lesão, mas contribuindo para a depuração bacteriana e produção de quimiotáticos, além do desenvolvimento dos alvéolos pulmonares em neonatos (Hendrix & Kheradmand, 2017).

MMPs estão intimamente envolvidas na patologia da TBP, visto que podem aumentar a caseificação granulomatosa, gerando cavitação pulmonar (Ong *et al.*, 2014; UgarteGil *et al.*, 2013), e a super regulação de MMP9 correlaciona-se com a pleurisia e a presença de granulomas (Sheen *et al.*, 2009). Dessa forma, a regulação de MMPs pelos inibidores regulatórios teciduais de metaloproteinase (TIMPs) (Brew & Nagase, 2010), principalmente TIMP-1 (Roderfeld *et al.*, 2007), mantém o equilíbrio necessário para a homeostase (Grünwald *et al.*, 2019).

Apesar de Quiding-Järbrink *et al.* (2001) mostraram que a BCG Dinamarquesa e Mtb já induziram um aumento substancial de MMP9, em diversos tecidos, 4 semanas após a infecção, outros estudos prévios do nosso grupo já tentaram desvendar os níveis de MMP9 induzidos por MONs infectados pela vacina BCG Moreau, mas nenhuma produção aumentada foi encontrada nos grupos de neonatos e adultos (Simas *et al.*, 2011).

### **1.7.16 – Interleucina-4 e 10 (IL-4 e IL-10)**

A supressão e a reparação tecidual também são essenciais nas respostas imunes, pois a inflamação, se desregulada, pode causar danos irreparáveis (Opal & DePalo, 2000). A modulação por IL-10 está associada a diversas células imunes, principalmente MONs e Th2, embora de TCD8+, Treg, NKs, DCs, MØs e queratinócitos possam também produzi-la (Moore *et al.*, 1993). A IL-10 age inibindo a síntese de fatores promotores de inflamação, como GM-CSF, TNF, IL-

3, IL-2 e IFN- $\gamma$ , prevenindo danos causados a longo prazo (Higgins *et al.*, 2009) e o aparecimento de doenças autoimunes, fazendo parte, mas não exclusivamente, das respostas anti-inflamatórias (Th2) e regulatórias (Treg) de LT (Saraiva & O'Garra, 2010). Durante a TB, a IL-10 elevada está associada ao aumento da incidência da doença (Awomoyi *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 1993), pois ela limita as respostas imunes dos tipos Th1 e Th17 (Redford *et al.*, 2011) e bloqueia a maturação de fagossomos em MØs alveolares humanos, permitindo a persistência de Mtb intracelular (O'Leary *et al.*, 2011).

A IL-4, produzida por Th2, mastócitos, basófilos e NKs, afeta diversas células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, diferenciando TCD4<sup>+</sup> imaturos em Th2, promovendo a troca de isotipo para IgE em LB e mediando respostas de hipersensibilidade do tipo I (alérgicas) e anti-helmínticas (He & Malek, 1998; Paul, 1991). Os níveis de IL-4 são bastante variáveis durante a TB (Schauf *et al.*, 1993; Surcel *et al.*, 1994) e a sua importância na infecção muitas vezes é relacionada ao avanço da mesma, como observado em camundongos IL-4<sup>-/-</sup>, que somente mostraram diferenças na carga bacteriana durante a infecção crônica (Jung *et al.*, 2002; North *et al.*, 1998). Além de regular negativamente a síntese de óxido nítrico indizível (iNOS) (Bogdan *et al.*, 1994) e TLR2 (Krutzik *et al.*, 2003) e induzir ativação alternativa de MØs (Gordon, 2003), IL-4 também tem influência nos granulomas da Mtb, induzindo um acúmulo de eosinófilos dentro da estrutura e mudando a característica mononuclear padrão para uma granulocítica (Lukacs *et al.*, 1997; Saunders & Britton, 2007; Ramakrishnan, 2012). Assim sendo, a função de IL-4 reforça que o momento da infecção muitas vezes é a peça-chave para a expressão do perfil certo de citocinas.

#### **1.7.17 – Interleucina-5 e 13 (IL-5 e IL-13)**

A IL-13 está associada a alergias, helmintíases e função secretória das células caliciformes epiteliais brônquicas (Brombacher, 2000; Rael & Lockey, 2011). Junto à IL-4, a IL-13 induz o chamado perfil alternativo de ativação em MØs, além de induzir a produção de MMPs nas vias aéreas (Finkelman *et al.*, 1999; Junttila, 2018). Sendo produzida principalmente pelas Th2, assim como mastócitos, basófilos, eosinófilos e NKs (McKenzie *et al.*, 1993; Minty *et al.*, 1993), IL-13 se liga ao receptor IL-4RII, que também reconhece IL-4, ambas com alta

afinidade, explicando o compartilhamento de efeitos biológicos entre essas duas citocinas (Junttila, 2018).

A IL-5 também é produzida por Th2 e mastócitos e estimula a produção de anticorpos em LB e o crescimento e a diferenciação de eosinófilos (Campbell *et al.*, 1987; Takatsu, 2011). Seu papel é pouco estudado durante a TB, e camundongos IL-5<sup>-/-</sup> se mostraram capazes de controlar a carga micobacteriana, após vacinação com BCG (Erb *et al.*, 1998).

#### **1.7.18 – Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- $\beta$ )**

O TGF- $\beta$  é outro mediador pleiotrópico e fulcral da resposta imune, que regula diversos genes (Feng & Derynck, 2005; Massagué *et al.*, 2012). O TGF- $\beta$  é expresso por diversas células, incluindo linfócitos, MØs, MONs e DCs (Letterio & Roberts, 1998; Massagué *et al.*, 1990). O TGF- $\beta$  age como potente citocina imunossupressora, controlando o desenvolvimento, diferenciação e migração celular (Taylor, 2009) estando envolvido também na tolerância imune, reparo tecidual, carcinogênese, doenças cardíacas e diabetes (Letterio & Roberts, 1998; McCartney-Francis & Wahl, 1994; Wahl *et al.*, 1989). Em combinação com IL-2, TGF- $\beta$  induz a diferenciação de LT para Treg (Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008), sendo também essencial para se gerar um perfil do tipo Th17 (Marshall *et al.*, 2015). O TGF- $\beta$  já foi visto aumentado em MONs circulantes de pacientes com TB, podendo ser secretado após estímulo por LAM de Mtb (Dahl *et al.*, 1996) e sendo mais produzido por células gigantes multinucleadas tipo Langhans nos granulomas de pacientes com TBA (Toossi *et al.*, 1995). Assim, de acordo com o tipo de célula, do estágio de diferenciação e de outras citocinas associadas (Flavell *et al.*, 2010; Li & Flavell, 2008; Morikawa *et al.*, 2016; Sporn & Roberts, 1992), o TGF- $\beta$  pode desempenhar um papel regulador e benéfico, ou imunossupressor e potencialmente negativo, no contexto de infecção por Mtb (Hirsch *et al.*, 1994).

#### **1.7.19 – Quimiocinas**

Durante a infecção micobacteriana, a sinalização por PRRs também leva à secreção de outros fatores solúveis, como as quimiocinas (ou citocinas quimiotáticas) e os seus diversos receptores (Griffith *et al.*, 2014). As quimiocinas são uma grande família de proteínas de tamanho mediano (8–14 kDa), cuja principal função é promover o recrutamento/quimiotaxia dos leucócitos,

regulando o tráfego dos mesmos para determinado sítio tecidual (Wu *et al.*, 1977; Yoshie *et al.*, 2001). As quimiocinas das famílias CC, que atraem MONs, MØs, NKs, DCs, basófilos e eosinófilos, e CXC, que atraem principalmente LT ativados, NTFs ou NKs (Hughes & Nibbs, 2018; Zlotnik & Yoshie, 2000), são alguns exemplos relacionados ao controle de Mtb via recrutamento de células imunes. Dentre estas, estão a proteína inflamatória de macrófagos 1 beta (MIP-1 $\beta$  ou CCL4), a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1 ou CCL4) e a IL-8/CXCL8 (Yoshie *et al.*, 2001).

A MIP-1 $\beta$  induz a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF, além de ter função de recrutamento de leucócitos, quimiotaxia e migração transendotelial de MONs, LT, DCs, NKs e, também, de granulócitos humanos para os sítios de inflamação (Menten *et al.*, 2002). A MCP-1, produzida por uma variedade de tipos celulares, principalmente MØs e MONs, também regula a migração e infiltração tecidual dessas APCs, assim como LT de memória e NKs (Deshmane *et al.*, 2009), sendo considerada uma potente ferramenta contra a colonização micobacteriana (Mohammed *et al.*, 1998). O aumento de seu receptor CCR2 em LT durante a TB pode também indicar uma possível mediação precoce de polarização da resposta imune (Pokkali *et al.*, 2008).

Da mesma forma, a IL-8 é secretada por pneumócitos do tipo II (Lin *et al.*, 1998a; Sato *et al.*, 2002), MONs, MØs e fibroblastos após infecção por Mtb *in vitro* (Friedland *et al.*, 1992; O'Kane *et al.*, 2007), quando estimuladas por outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF, endotoxinas, ou após a fagocitose (Wickremasinghe *et al.*, 1999, 2004). Até mesmo amostras de escarro de pacientes com TB possuem níveis detectáveis de IL-8 (Kurashima *et al.*, 1997), que, como estímulo migratório neutrofílico específico, aumenta o metabolismo oxidativo, gerando maior poder bactericida (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992; Bickel, 1993). Sendo assim, a IL-8 pode direcionar a resposta imune inata nascente frente a antígenos micobacterianos, por guiar a infiltração de células Th1, via o seu receptor CXCR2 (Pokkali *et al.*, 2008).

Apesar da replicação exponencial de micobactérias e da morte de MØs infectados durante o curso normal da TBP, a inflamação local geralmente é controlada (Divangahi *et al.*, 2009; Dorhoi *et al.*, 2014; Repasy *et al.*, 2013). Um

microambiente anti-inflamatório inicial parece facilitar o estabelecimento da infecção no primeiro momento, com a presença de Th2, Tregs, expressão de IL-10, TGF- $\beta$ , e inibição de inflamassomas e IL-1 (Shafiani *et al.*, 2013). Já uma inflamação exacerbada em momento inoportuno, propicia o recrutamento de MØs e NTFs de forma excessiva e o desenvolvimento de lesões caseosas, propiciando a transmissão da doença (Flynn *et al.*, 2011; Orme, 2014; Wangoo *et al.*, 2001). Sendo assim, observamos que a resposta imune durante a TB é um evento dinâmico, podendo ser benéfico tanto para hospedeiro, quanto para o Mtb, e que diversas citocinas funcionais, como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-27, IL-31, IL-33, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , LTB4, MCP-1, MIP-1, MMP9, PGE2, SCD-40L, TGF- $\beta$ , TIMP-1 e TNF são expressas por diferentes células imunes (Figura 8).

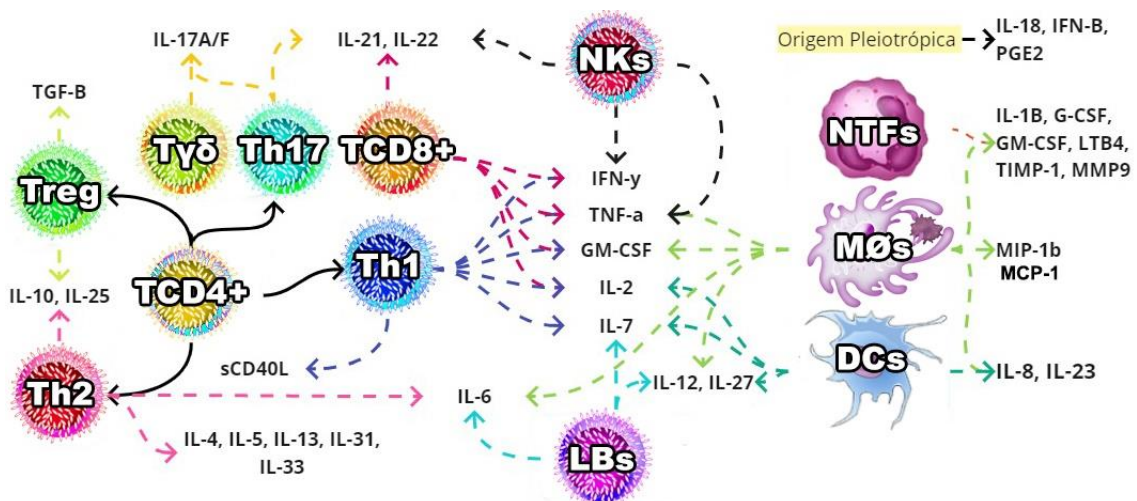


Figura 8 - Citocinas relevantes durante a resposta a TB. Diferentes células da imunidade inata e adaptativa secretam citocinas em diferentes momentos da infecção.

Sendo de grande interesse durante a infecção por TB e durante a resposta à vacina BCG, nosso grupo vem juntando evidências dos efeitos de tais citocinas, enquanto aborda diferentes aspectos da imunidade, assim, tem-se observado, através de diversas técnicas, a capacidade da BCG Moreau de modular LTB4, IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$  (Lima *et al.*, 2015), IL-1 $\beta$  (Antas *et al.*, 2019) e TNF (Simas *et al.*, 2011), além de IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e IL-18 (Ponte *et al.*, 2015, 2018).

## **1.8 – Justificativa**

Revisões sistemáticas da avaliação da eficácia da imunização primária com a vacina BCG vêm determinando que a mesma pode durar em média 15 anos em algumas populações (Abubakar *et al.*, 2013), ainda assim o aumento da incidência da TB no mundo, a emergência de cepas *Mtb* resistentes e o elevado custo da quimioterapia anti-TB constituem fatores que justificam a procura de um melhor entendimento da proteção contra a TB. Sabe-se que a destruição tecidual e a patogênese durante a infecção por *Mtb* são determinadas pelas resultantes do equilíbrio da relação entre hospedeiro-patógeno. Porém, as determinantes específicas dessa interação, em diferentes grupos, ainda são desconhecidas. Portanto, é estratégico para um melhor entendimento dos correlatos de proteção induzido pela vacina BCG, realizar análises *in vitro* das vias relacionadas às respostas imunes inatas em humanos frente à essa vacina secular, que potencialmente envolvem as moléculas TLR4, DEC-1, B7-1, EP2 e TIM-3, bem como a secreção induzida de citocinas pró- e anti-inflamatórias, em coorte de adultos e neonatos, no intuito de tentar identificar os processos pelos quais tal proteção é alcançada utilizando a cepa BCG Moreau, além de permitir uma melhor compreensão geral da imunidade inata.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo Geral**

Estudar comparativamente o perfil da resposta imune *in vitro* à vacina BCG Moreau em adultos vacinados e neonatos sem vacinação prévia, através da capacidade de indução de moléculas de superfície e da produção de citocinas.

### **2.2 – Objetivos específicos**

1) Identificar o padrão de expressão dos marcadores fenotípicos TLR4, B7-1, DEC-1, EP2 e TIM-3 induzidos pela vacina BCG Moreau em monócitos de indivíduos saudáveis adultos (BCG positivo) e de recém-natos (BCG negativo), e;

2) Quantificar as citocinas pró- e anti-inflamatórias secretadas pelas células mononucleares dos indivíduos estudados (adultos e neonatos), após estímulo *in vitro* com a vacina BCG Moreau.

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Biossegurança**

Os reagentes e as amostras clínicas de doadores voluntários sadios foram transportados e manuseados respeitando todas as normas e precauções para manipulação de material biológico e de risco químico e todos os descartes foram feitos de maneira apropriada para serem posteriormente descontaminados e autoclavados. O manuseio de amostras biológicas foi realizado em cabine de segurança biológica 2-A1 utilizando equipamentos de proteção individual.

#### **3.2 – Permissão ética e sigilo**

Após clara e breve explicação do projeto de pesquisa, foi solicitada aos indivíduos a assinatura espontânea do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participação no estudo. Quaisquer publicações não identificarão os indivíduos envolvidos. Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do IOC/Fiocruz, sob o número 1.033.769 (CAAE 35775014.0.0000.5248) e do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG/UNIRIO) sob o número 1.764.182 (CAAE 59117015.0.0000.5258).

#### **3.3 – População estudada**

Participaram desse estudo doadores de duas coortes:

**Coorte #1:** 175 indivíduos adultos >18 anos, sem qualquer evidência de TBA e nenhum histórico de TB no passado, sem qualquer outra enfermidade ou imunodeficiência sabida (HIV, diabetes mellitus, câncer, leucemia ou linfoma), oriundos de doações espontâneas e voluntárias do serviço de hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), sob a política de doação anônima.

**Coorte #2:** 48 indivíduos gestantes >18 anos, doadoras espontâneas de sangue de cordão umbilical (veia umbilical) de neonatos (32 partos normais, 16 cesárias), sem qualquer evidência de TBA e sem qualquer outra enfermidade e imunodeficiência sabida (HIV, diabetes mellitus, câncer, leucemia ou linfoma), oriundas de doações voluntárias do serviço de obstetrícia do HUGG/UNIRIO.



### 3.4 – Coleta de sangue

As amostras clínicas de sangue periférico de indivíduos adultos foram obtidas por venopunção, onde cerca de 400 mL foram coletados em bolsa de sangue contendo citrato de sódio, e realizada a separação do concentrado de hemácias da camada leucoplaquetária (*Buffy-coat*), contendo cerca de 50 mL. Esse procedimento foi efetuado no HUCFF/UFRJ, sendo a amostra utilizada neste estudo coletada no mesmo dia da doação. As amostras clínicas de sangue da veia umbilical foram obtidas após ligadura e separação das partes placentária e fetal no HUGG/UNIRIO. O material clínico foi coletado por equipe médica treinada e capacitada, em alíquotas de cerca de 15 mL e armazenado refrigerado a 4°C em tubos estéreis com heparina sódica (Sigma-Aldrich®, Massachusetts, EUA), que foram preparados no LIC/FIOCRUZ, sendo a amostra coletada em até 24h. As amostras clínicas providas de ambos os nosocômios foram então identificadas e transportadas em recipiente próprio para o LIC, onde as mesmas foram manipuladas nas cabines de segurança biológica em ambiente estéril.

### 3.5 – Purificação das amostras

O **concentrado leucocitário de adultos**, assim como o sangue total proveniente do cordão umbilical, foram passados para tubos cônicos tipo *falcon* de 50 mL (Corning®, Nova York, EUA) e centrifugados a 350g por 7 min em temperatura ambiente (TA) (Eppendorf 5702R®, Hamburgo, Alemanha), permitindo a separação do plasma, cuja a maior parte foi retirada com pipeta Pasteur. Logo após, o volume restante dos tubos foi duplicado com tampão salina fosfato (PBS; Sigma-Aldrich®) para que o sangue ficasse mais diluído e menos viscoso. As PBMCs ou as células mononucleares do sangue de cordão umbilical (CBMCs) foram então obtidas através de método de centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich®), no qual 10 mL da solução foram adicionados sobrepondo-se ao Ficoll-Hypaque, formando uma camada bifásica. Após centrifugação a 400 g por 25 min em TA, o anel de células mononucleares formado foi coletado com pipeta Pasteur e depositado em tubo de 15 mL identificado. Após esse processo, as amostras permaneceram a 4°C. Após 2-3 lavagens com PBS, o *pellet* foi ressuspensão com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) e a concentração celular foi ajustada para 10<sup>6</sup> células/mL após contagem em azul de tripan (Sigma-Aldrich®) em câmara de Neubauer

(HERAEUS®, Hanau, Alemanha). As PBMCs e CBMCs foram então separadas em tubos de cultura com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell Embriolife®, Campinas, Brasil).

### 3.6 – Infecção *in vitro* com a vacina BCG Moreau

A vacina BCG Moreau RDJ liofilizada (Fundação Ataufo de Paiva, RJ) foi reconstituída em cabine de segurança biológica, misturando seu conteúdo com 1 mL de solução NaCl, conforme indicação da bula, sendo usada imediatamente após a reconstituição. Foram feitos os cálculos para a multiplicidade de infecção (MOI) de 2:1, deixando também tubos controle sem infecção. As células foram então incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24, 48 e/ou 72h (item 4.1.1).

### 3.7 – Citometria de fluxo

#### 3.7.1 – Marcação com anticorpos monoclonais

Os tubos com as amostras infectadas e sem infecção foram centrifugados a 350g por 7 min em TA e os sobrenadantes foram armazenados para as dosagens posteriores de mediadores imunológicos solúveis (item 3.8). As células foram retiradas dos tubos de cultura e lavadas em solução tampão para citometria de fluxo (PBS com 0,01% de Azida sódica-NaN<sub>3</sub> e 0,1% de albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich®)), sendo adicionados 1% de soro caprino (CECAL/FIOCRUZ) para evitar ligações inespecíficas, seguindo-se incubação por 10 min a TA. Após, as células suspensas em 50 uL de tampão foram submetidas à marcação com os anticorpos monoclonais anti-humanos, conjugados a fluorocromos, conforme a Tabela 1.

*Tabela 1 - Anticorpos monoclonais anti-humano com suas respectivas especificidades e fluorocromos conjugados utilizados para marcações fenotípicas por citometria de fluxo.*

Moléculas alvo	Fluorocromo	Marca
CD 284 (TLR4)	PE	Biologend®, Califórnia, EUA
CD 80 (B7-1)	FITC	Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA
CLec7a (DEC-1)	FITC	Thermo Scientific®
EP2	PE	Biologend®
TIM-3	BV421	Biologend®
CD14	PE.CY7	Biologend®

PE= Ficoeritrina, FITC= Isotiocianato de fluoresceína

Nos painéis utilizados, sempre se adicionou o CD14 aos demais marcadores. A diluição dos anticorpos utilizados foi de 1:40 no mesmo tampão e, após sua adição, as células foram incubadas por 30 min a 4°C na ausência de luz. Após incubação, as células foram lavadas duas vezes no mesmo tampão e fixadas com tampão PBS contendo 2% de paraformaldeído.

### 3.7.2 – Leitura no citofluorímetro e análises fenotípicas

As células mononucleares devidamente marcadas foram então lidas, após a cultura, em aparelho de citometria de fluxo CytoFLEX S (Beckman Coulter®) e FACSAria II (BD Biosciences®), nos quais 10,000 eventos foram adquiridos na região de interesse através dos *softwares* CytExpert (Beckman Coulter®, Califórnia, EUA) ou CellQuest (BD Biosciences®, New Jersey, EUA) respectivamente. As marcações simples para compensação de fluorocromos foram feitas utilizando-se microesferas de calibração comercial (OneComp eBeads, eBioscience®, Califórnia, EUA).

A análise dos resultados da citometria de fluxo foi feita pelo programa FlowJo, versão 10 (TreeStar®, Oregon, EUA). Para essa análise dos marcadores fenotípicos, a estratégia de *gates* utilizada se iniciou com a aferição de eventos acontecidos em uma única célula por vez (*Singlets*) (Figura 9).

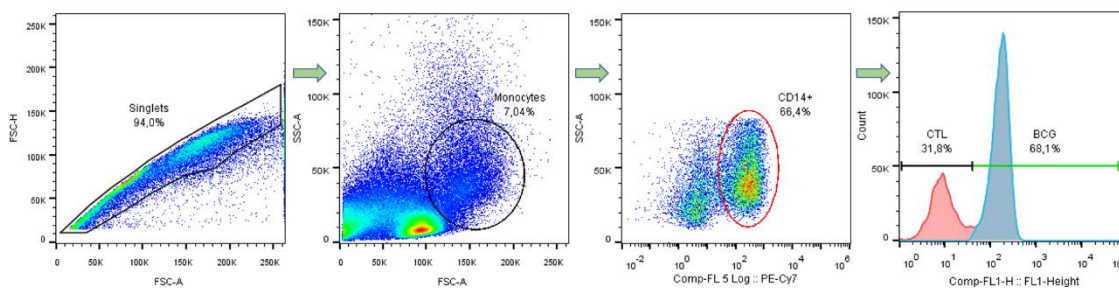


Figura 9 - Gráficos representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo. Primeiramente, excluíram-se os dupletes. Em seguida, foi feito um gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) característico da população estudada, com um *backgating* de CD14, e por fim, foi feito um histograma comparativo entre células não estimuladas (CTL) e células estimuladas (BCG).

Dentro desses eventos, a característica morfológica dos MONs foi identificada, através de um gráfico de tamanho (*Forward Scatter* (FSC)) e complexibilidade/granulosidade (*Side Scatter* (SSC)). A seguir, a população de células positivas para o marcador CD14 foi selecionada (AntalSzalmas1997). Por último, a expressão das moléculas TLR4, B7-1 DEC-1, EP2 e TIM-3 foi avaliada através de histogramas comparativos entre controle sem infecção e

células infectadas, de forma que não houvesse sobreposição de fluorescência entre os painéis. A porcentagem de células positivas para cada marcador foi tabulada, assim como a intensidade mediana de fluorescência (MFI) dessa população celular, que foi normalizada em LOG10 para descartar diferenças de voltagem após as distintas leituras das amostras.

### 3.8 – Ensaios de função imune pela detecção de mediadores imunológicos solúveis

Os sobrenadantes de culturas de PBMCs e CBMCs com e sem infecção com a vacina BCG Moreau por 48h e livres de células, foram descongelados até alcançarem a TA e utilizados para dosagem de mediadores imunológicos solúveis utilizando três métodos de dosagens distintos; um imunoenzimático (singular) e dois fluorimétricos e multiparamétricos (multiplex), para que pudéssemos estudar um maior número de mediadores.

As dosagens, independentes dos métodos, foram efetuadas baseadas nas respectivas curvas-padrão para cada citocina de interesse. Cada método demonstrou estar dentro dos parâmetros ótimos para realizar as análises, pois os índices de wSSE nos Multiplex, e r-square no singular, se comportaram de maneira esperada, conforme determinação de cada fabricante (Figura 10).

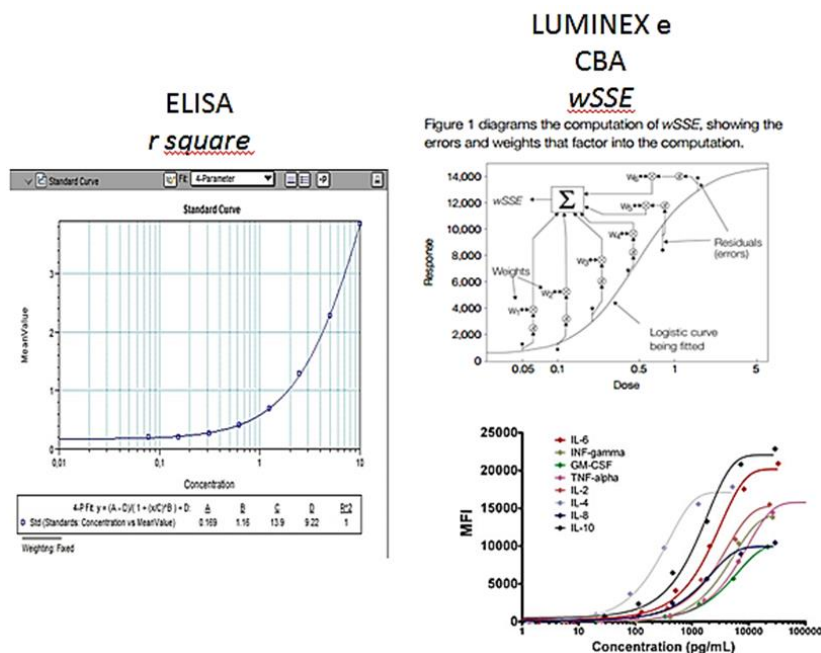


Figura 10 - Gráficos representativos de detecção de citocinas. ELISA (à esq.) baseado no r-square da curva padrão ( $r=1$ ); e do LUMINEX e CBA (à dir.) a partir de wSSE usado para formar uma curva do tipo 4-PL para cada citocina.

### 3.8.1 – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

A metodologia de ELISA utilizou kits comerciais para dosagens de IFN- $\beta$ , IL-17A, IL-18, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-27, LTB4, MMP9, PGE2, TGF- $\beta$ , TIMP-1 e TNF, seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems®, Minnesota, EUA). De modo geral, os anticorpos de captura específicos foram diluídos em 10 mL de PBS e as placas de 96 poços (Corning®) foram sensibilizadas, sendo aplicados 100  $\mu$ L por poço. A placa foi coberta e incubada de um dia para o outro, em TA. No dia seguinte, a aspiração do conteúdo de todos os poços foi realizada e, em seguida, três lavagens com 400  $\mu$ L de solução tampão (PBS/0,05% Tween-20) foram feitas. Removeu-se completamente o líquido dos poços por aspiração ou inversão da placa e o bloqueio com 300  $\mu$ L por poço de solução tampão bloqueadora (PBS/ BSA 4%) foi realizado com incubação por 1 a 2h, em TA. A cada poço foram adicionados 100  $\mu$ L das amostras, assim como 100  $\mu$ L naqueles poços da curva padrão feita por diluição seriada, seguindo incubação por 2h. Os anticorpos de detecção foram administrados no volume de 100  $\mu$ L e a placa foi coberta com um selador e incubada por 2h em TA. Em seguida, 100  $\mu$ L de estreptavidina peroxidase foram adicionados por poço, por 20 min, em TA, evitando a luz direta sobre a placa. Após esse período, 100  $\mu$ L de solução tampão substrato (tetrametilbenzidina (TMB)) foram adicionados por poço, incubando em TA por 20 a 30 min. Uma vez verificada a mudança de coloração nos poços, foram adicionados 50  $\mu$ L da solução de parada (ácido sulfúrico 2N). As leituras foram realizadas em leitor de microplacas (SpectraMax M2—Molecular Devices®, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. Os limites de mínimos e máximos de detecção dos testes estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Limites de detecção de mediadores imunológicos solúveis analisados pelo método de ELISA.

Mediador	Limite Min-Max. (pg/mL)	Biomarcador	Limite Min-Max. (pg/mL)
IFN- $\beta$	7,8-500	LTB4	10,3-2500
IL-17A	15,6-1000	MMP9	46,8-3000
IL-18	11,7-750	PGE2	39-2500
IL-1 $\alpha$	7,8-500	TGF- $\beta$	31,2-2000
IL-1 $\beta$	3,9-250	TIMP-1	31,2-2000
IL-23	125-8000	TNF	15,6-1000
IL-27	156,25-10000	-	-

### 3.8.2 – Ensaio por Cytometric Bead Array (CBA)

A metodologia CBA utilizou o kit comercial *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* (BD Biosciences®) para dosagem de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-6, e TNF, e conjuntos adicionais BD CBA *Flex Sets* para G-CSF, GM-CSF, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  (BD Biosciences®) seguindo as instruções do fabricante. De modo geral, 50ul das microesferas de captura foram adicionadas em todos os microtubos após serem homogeneizadas e, após feita a diluição em série, 50ul da curva padrão foram adicionados apenas nos microtubos selecionados tal. As amostras foram diluídas 1:4 em meio de cultura RPMI 1640 e então foram usados 50  $\mu$ L desta diluição nos microtubos identificados. Após, foram adicionados 50 uL do reagente de detecção PE em todos os microtubos, que foram incubados por 3h em TA, na ausência de luz. As beads foram lavados com 100  $\mu$ L de tampão de lavagem, cuidadosamente aspirados após centrifugação. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lavagem para realizar a leitura. As amostras foram então adquiridas através de citômetro de fluxo (FACSCalibur®), usando recomendação de análise do fabricante e observando a fluorescência de PE no canal FL2. As concentrações de citocinas foram estimadas usando o programa FCAP *Array Software* v3.0 (BD Biosciences®). Os limites mínimos e máximos de detecção estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Limites de detecção de mediadores imunológicos solúveis analisados pelo método de CBA.

Mediador	Limite Min-Max. (pg/mL)	Biomarcador	Limite Min-Max. (pg/mL)
G-CSF	20-5000	IL-4	2,6-5000
GM-CSF	20-5000	IL-6	2,5-5000
IFN- $\gamma$	7,1-5000	IL-8	0,2-5000
IL-10	3,3-5000	MCP-1	20-5000
IL-17A	2,8-5000	MIP-1 $\beta$	20-5000
IL-2	2,6-5000	TNF	2,8-5000

### 3.8.3 – Ensaio por Luminex

No ensaio multiparamétrico de fluorescência Multiplex/Luminex, foram utilizados os kits comerciais *Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine* e *Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* para dosagens de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , GM-CSF, G-CSF, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33 e SCD-40L, seguindo as instruções dos respectivos fabricantes (Bio-Rad®, Hercules, Califórnia, EUA e MILLIPLEX/MERK®). De modo geral, 200 uL de tampão de lavagem foram adicionados por poço sob agitação por 10 min em TA. Depois de

aspirada, 25 µL de cada padrão em diluição seriada foram adicionados nos poços apropriados. Conforme indicado, 25 µL das amostras de sobrenadantes diluídas 1:4 e 25 µL das microesferas magnéticas foram adicionados e a placa foi deixada, então, 2h sob agitação. Após mais duas lavagens, 25 µL de anticorpos de detecção foram adicionados, incubados por 1h, e 25 µL de Estreptavidina-PE adicionados a cada poço. Passados 30 min e após mais duas lavagens, 150 µL de tampão de corrida foram adicionados em todos os poços. As microesferas foram ressuspensas em um agitador de placas por 5 min, uma quantidade mínima de 50 microesferas/analito foi adquirida e o ensaio foi analisado por MAGPIX system (Luminex®), onde a intensidade média de fluorescência foi observada usando uma curva logística de 5 parâmetros (ou método *spline curve-fitting*) para calcular as concentrações de biomarcadores nas amostras. Os limites de mínimos e máximos de detecção estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Limites de detecção de mediadores imunológicos solúveis analisados pelo método de Luminex.

Mediador	Limite Min-Max. (pg/mL)	Biomarcador	Limite Min-Max. (pg/mL)
G-CSF	6,35-104106	IL-25	1,3-21804
GM-CSF	0,48-7846	IL-31	3,6-58723
IFN-γ	0,8-25665	IL-33	6,8-55852
IL-10	1,1-17427	IL-4	0,19-3044
IL-12p70	1,43-23425	IL-5	3,63-59499
IL-13	1,3-5157	IL-6	0,9-6244
IL-17A	2,44-39972	IL-7	1,92-31475
IL-17F	7,5-30743	IL-8	0,85-13992
IL-1β	0,8-4672	MCP-1	1,9-8755
IL-2	1,29-21178	MIP-1β	3,0-1439
IL-21	15,3-250446	SCD-40L	7,7-126350
IL-22	2,5-41572	TNF	0,7-54566
IL-23	10,7-132017	-	-

### 3.9 – Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas pelo programa *Prism* versão 7 (GraphPad Software®, Califórnia, EUA). A normalidade da distribuição das variáveis foi avaliada com os testes de Shapiro-Wilk e confirmados com gráficos Q-Q. Para comparações entre os grupos controle (sem infecção) e BCG foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, e para comparar a variação de expressão cinética (delta) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Um p valor <0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Marcadores fenotípicos

Para a citometria de fluxo, coortes de 62 adultos e 28 neonatos (21 partos normais e 7 cesárias) foram distribuídos entre os cinco marcadores fenotípicos investigados.

#### 4.1.1 – A infecção *in vitro* de monócitos humanos com a vacina BCG Moreau modula a expressão de receptores da resposta imune inata em diferentes momentos.

Primeiramente, foram avaliadas as cinéticas *in vitro* de expressão dos marcadores fenotípicos TLR4, B7-1, DEC-1, TIM-3 e EP2 na superfície de MONs de 5 grupos de doadores adultos saudáveis, induzidos pela vacina BCG Moreau nos tempos de infecção de 24h, 48h e 72h, por citometria de fluxo (Figura 11).

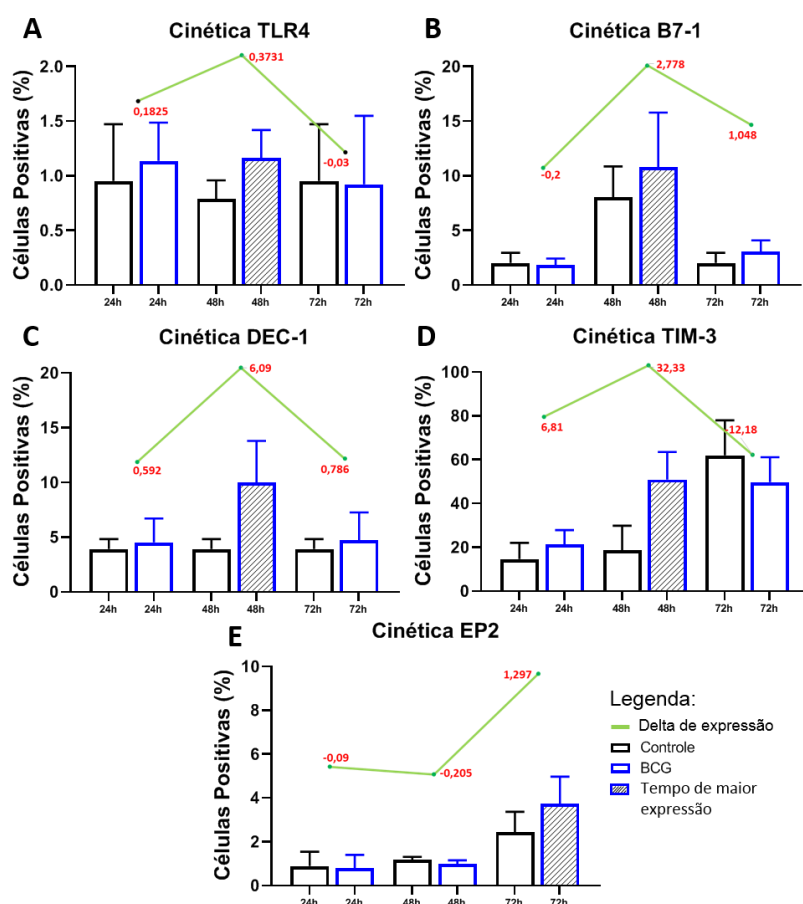


Figura 11 - Análise da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de adultos infectados *in vitro* com a vacina BCG Moreau nos tempos de 24h, 48h e 72h. Os marcadores (A) TLR4 (n=5), (B) B7 1 (n=5), (C) DEC-1 (n=5), (D) TIM-3 (n=5) e (E) E 2 (n=5) foram analisados em três momentos diferentes por citometria de fluxo. As barras indicam a média  $\pm$  SEM da porcentagem de células positivas que expressam os marcadores, em células não infectadas (Controle) e infectadas (BCG), assim como a linha de Delta de expressão entre BCG e Controle.



Sendo assim, foi observado, de maneira geral, que a BCG Moreau induziu um aumento, ainda que não estatisticamente significativo, do número de células expressando todos os marcadores. Esse aumento, em níveis diferentes, é indicado pela linha delta de expressão entre controle e BCG. De forma similar, quatro (TLR4, B7-1, DEC-1 e TIM-3) das cinco moléculas de superfície estudadas apresentaram um maior número de células expressando os marcadores em relação ao controle não infectado no tempo de 48h (Figuras 11A-D), exceto EP2, que mostrou aumento acentuado em 72h (Figura 11E). Apesar do nível de expressão de TLR4 ser semelhante em 24h e 48h, optamos por 48h pela maior diferença entre controle e infectado (Figura 11A). Sendo assim, escolhemos o tempo de 48h de infecção para TLR4, B7-1, DEC-1 e TIM-3, e 72h de infecção para EP2, nas demais fases deste estudo fenotípico.

#### **4.1.2 – A infecção *in vitro* com a vacina BCG Moreau induz um aumento da expressão de marcadores de superfície TLR4, B7-1, DEC-1 e EP2 em monócitos humanos de doadores adultos saudáveis.**

Dando continuidade ao estudo e para confirmar os dados observados, foi avaliada a capacidade da vacina BCG Moreau de induzir a expressão *in vitro* dos marcadores na superfície de MONs em grupos maiores (n=10 a 17) de doadores adultos saudáveis, usando PBMCs nos tempos de infecção estabelecidos anteriormente (48 ou 72h) (Figura 12A). A análise por citometria de fluxo revelou que a vacina BCG Moreau foi capaz de induzir um percentual maior de células expressando os marcadores TLR4, B7-1, DEC-1 e EP2 em MONs de adultos. Assim, após a infecção, observou-se quase o dobro de MONs de adultos expressando TLR4 ( $p=0,014$ ), quase três vezes mais expressando B7-1 ( $p=0,046$ ) e quase quatro vezes a mais expressando tanto DEC-1 ( $p=0,005$ ), quanto EP2 ( $p=0,005$ ). Os percentuais de MONs expressando TIM-3 não alcançaram relevância estatística. Procedemos também na análise da capacidade da vacina BCG Moreau induzir uma maior expressão desses marcadores fenotípicos por célula (MFI), porém nenhuma das induções se demonstraram significativas (Figura 12B).

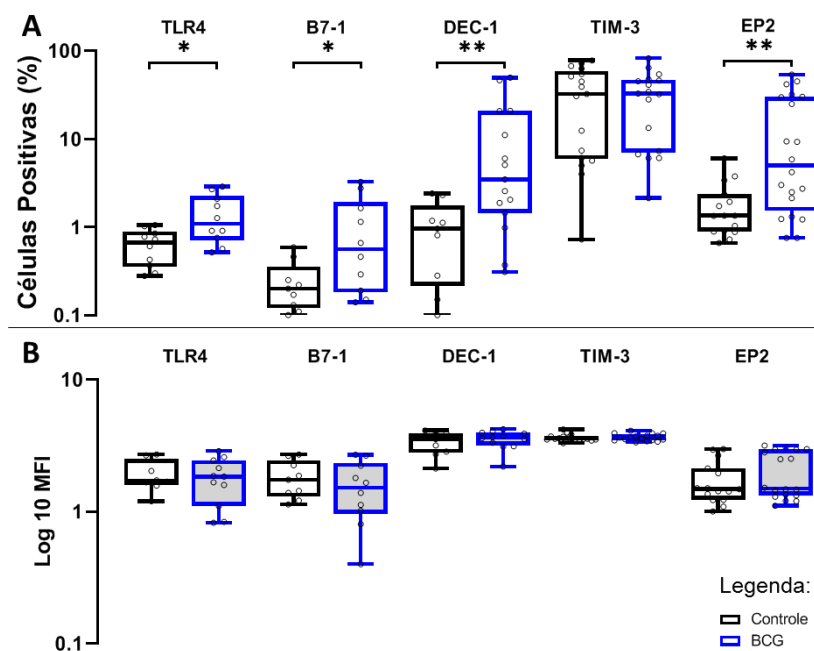


Figura 12 - Análise da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de adultos infectados e não infectados *in vitro* com a vacina BCG Moreau por 48h ou 72h. Porcentagem (A) e MFI (B) de células positivas nas populações de monócitos não infectados (Controle) ou infectados com a vacina BCG Moreau (BCG), obtidos através da técnica de citometria de fluxo. TLR4 (n=10), B7-1 (n=10), DEC-1 (n=15), TIM-3 (n=17) em 48h e EP2 (n=15) em 72h. Os gráficos demonstram a mediana e intervalo interquartil (IQR). Ambos os gráficos mostram os valores em LOG10. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

#### 4.1.3 – A infecção *in vitro* com a vacina BCG Moreau não modulou a expressão de marcadores de superfície em monócitos humanos de doadores neonatos saudáveis.

Da mesma forma que as células de adultos, a expressão dos marcadores fenotípicos TLR4, B7-1, DEC-1 e EP2 em MONs da veia umbilical (CBMCs) de neonatos saudáveis também foi avaliada (Figura 13). Essa análise não pôde ser realizada para o marcador fenotípico TIM-3 devido a não termos tido acesso às amostras clínicas frescas do sangue de veia umbilical dos neonatos durante a pandemia de COVID-19. A análise por citometria de fluxo de MONs destes neonatos revelou que a vacina BCG Moreau não induziu nenhuma expressão diferencial significativa na quantidade de células positivas (Figura 13A) ou na quantidade de marcadores por célula (Figura 13B).

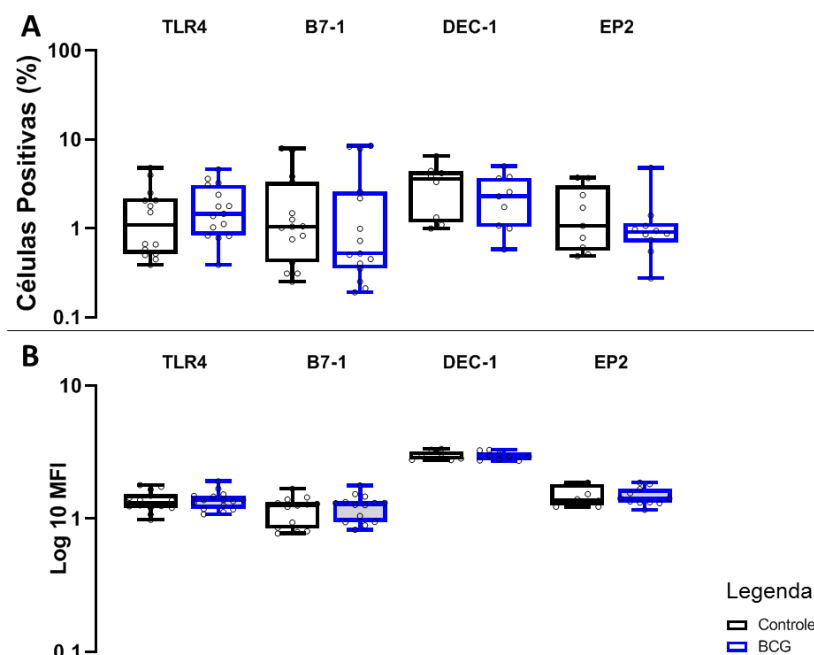


Figura 13 - Análise da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de neonatos infectados e não infectados *in vitro* com a vacina BCG Moreau por 48h ou 72h. Porcentagem (A) e MFI (B) de células positivas nas populações de monócitos não infectados (Controle) ou infectados com a vacina BCG Moreau (BCG), obtidos através da técnica de citometria de fluxo. TLR4 (n=15), B7-1 (n=15), DEC-1 (n=9) em 48h e EP2 (n=10) em 72h. Os gráficos demonstram a mediana e IQR. Ambos os gráficos mostram os valores em LOG10.

#### 4.1.4 – A vacina BCG Moreau induz uma expressão diferencial dos marcadores fenotípicos TLR4, B7-1 e DEC-1 em neonatos e adultos.

Após determinada *in vitro* a expressão dos marcadores fenotípicos utilizando a vacina BCG Moreau em MONs de doadores sadios neonatos e adultos, esses níveis constitutivos e induzidos detectados nos ensaios acima foram comparados (Figura 14). Essa análise demonstrou que constitutivamente, neonatos apresentam cinco vezes mais células expressando B7-1 ( $p < 0,001$ ) e quase quatro vezes mais células expressando DEC-1 ( $p = 0,011$ ), do que os adultos (Figura 14A). No entanto, constitutivamente as células de adultos possuíam um número maior de moléculas TLR4 ( $p = 0,016$ ) e B7-1 ( $p = 0,011$ ) em sua superfície (Figura 14B). Já o percentual de células expressando EP2 após indução *in vitro* com a vacina BCG Moreau na superfície de MONs de adultos sadios demonstrou estar cinco vezes elevada, quando comparada a população de MONs de neonatos sadios, sendo essa diferença significativa ( $p < 0,001$ ; Figura 14A).

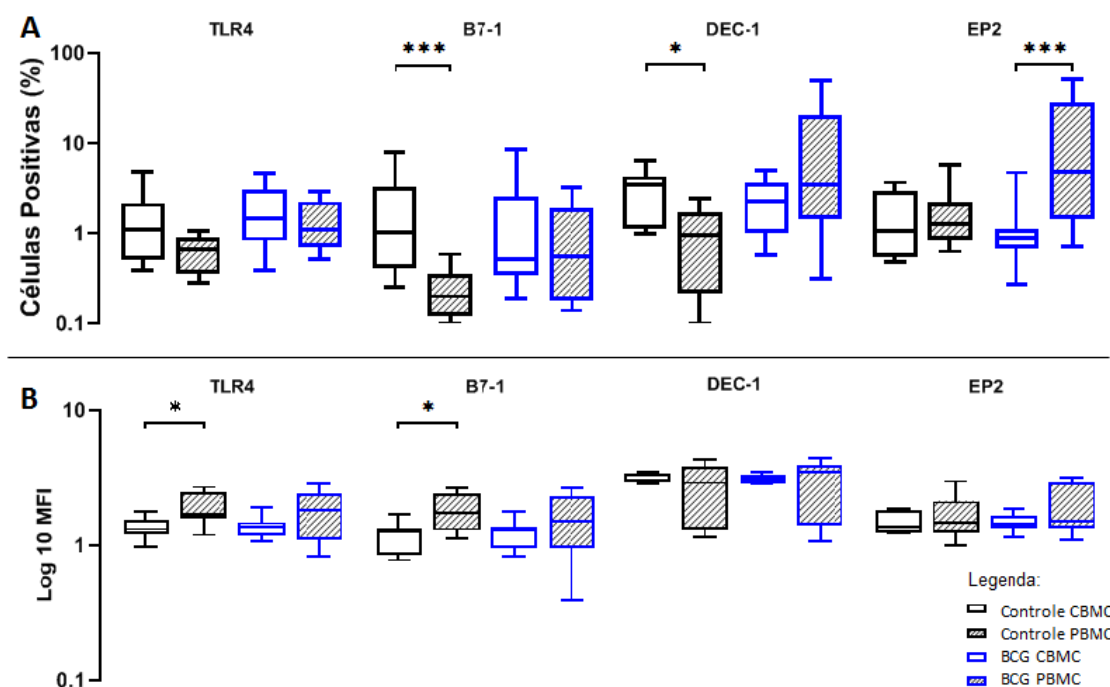


Figura 14 - Análise comparativa da expressão de marcadores fenotípicos na superfície de monócitos de neonatos e adultos infectados e não infectados *in vitro* com a vacina BCG Moreau por 48h ou 72h. Porcentagem (A) e MFI (B) das populações de monócitos não infectados (Controle) ou infectados com a vacina BCG Moreau (BCG) em neonatos (CBMC) e adultos (PBMC), obtidos através da técnica de citometria de fluxo. Os gráficos mostram a mediana e IQR. Ambos os gráficos demonstram os valores em LOG10. \*= $p < 0,05$ , \*\*\*= $p < 0,001$ .

## 4.2 – Secreção de mediadores imunológicos solúveis

Para as dosagens de citocinas e outros mediadores imunológicos solúveis, uma coorte de 128 adultos e 34 neonatos (23 partos normais, 11 cesárias) foram distribuídos entre os três métodos utilizados. Assim, a secreção de mediadores induzida *in vitro* após 48h de infecção pela vacina BCG Moreau foi dosada nos sobrenadantes de culturas de PBMCs e CBMCs pelos métodos de ELISA (singular), bem como Luminex e CBA (multiplex).

### 4.2.1 – A vacina BCG Moreau induziu *in vitro* um aumento da secreção de IL-1 $\beta$ em adultos e neonatos por um ensaio singular.

A vacina BCG Moreau induziu um aumento significativo de IL-1 $\beta$  tanto em adultos quanto neonatos (Tabela 5). Comparando os níveis dessa citocina entre adultos e neonatos (dados não mostrados), a diferença entre os dois grupos não mostrou ser relevante estatisticamente ( $p=0,077$ ). Observamos valores elevados de PGE2 induzidos pela vacina BCG Moreau em adultos, e a mesma induziu uma menor expressão de IL-18 e TGF- $\beta$  em neonatos.

Tabela 5 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método de ELISA (pg/ml) em adultos e neonatos.

MEDIADOR	NEONATOS (n=30)				ADULTOS (n=116)			
	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor
IL-1 $\beta$	135,70 (28,19-159,60)	490 (321,80-499,30)	3,6	0,009	235,60 (43,36-592,90)	1084 (664,30-1376)	4,6	<0,001
PGE2	73,27 (72-74,98)	77,72 (68,34-82,16)	1,1	0,499	67,51 (63,77-72,51)	75,61 (66,92-84,56)	1,1	<0,001
IL-18	0,10 (0,06-0,13)	0,06 (0,03-0,06)	0,6	0,002	0,06 (0,03-0,13)	0,06 (0,03-0,12)	1,0	0,993
TGF- $\beta$	0,25 (0,20-0,37)	0,20 (0,16-0,23)	0,8	0,016	0,29 (0,18-0,98)	0,21 (0,11-0,52)	0,7	0,238
IL-17A	0,06 (0,06-0,06)	0,70 (0,55-1,83)	11,7	0,07	3,31 (1,21-5,90)	4,42 (2,88-5,78)	1,3	0,394
IFN- $\beta$	3,17 (2,52-4,25)	3,35 (2,82-4,31)	1,1	0,653	1,15 (0,34-2,95)	1,68 (0,11-2,99)	1,5	0,549
IL-1 $\alpha$	0,04 (0,04-0,06)	0,04 (0,02-0,09)	1,0	0,88	0,09 (0,04-0,09)	0,09 (0,04-0,09)	1,0	>0,999
IL-23	0,076 (0,07-0,40)	0,25 (0,07-0,60)	3,3	0,231	0,65 (0,27-5,89)	0,63 (0,56-2,74)	1,0	0,910
IL-27	0,01 (0,01-0,02)	0,01 (0,01-0,02)	1,0	0,927	98 (20,28-162,40)	98 (19,24-391,70)	1,0	0,504
LTB4	66,10 (63,28-70,25)	66,99 (64,14-69,51)	1,0	0,972	64,98 (45,56-76,50)	69,22 (57,71-85,72)	1,1	0,242
TIMP-1	3045 (634,40-3099)	1354 (688,10-2535)	0,4	0,7	5,28 (0,05-6483)	0,52 (0,01-4839)	0,1	0,336

Mediadores imunológicos solúveis dosados em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de 116 adultos e 30 neonatos sadios após 48h de infecção pela vacina BCG Moreau.

Dois outros biomarcadores também foram dosados pelo método de ELISA, porém apenas em adultos sadios. Assim, observou-se que a vacina BCG Moreau induz um aumento significativo de TNF em adultos (Tabela 6).

Tabela 6 - TNF e MMP9 (Mediana e IQR) dosados pelo método de ELISA (pg/ml) em adultos.

MEDIADOR	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor
TNF	178 (282-94)	1449 (4465-487)	8,1	<0,001
MMP9	1104 (14034-320)	7288 (10449-634)	6,6	0,746

Mediadores imunológicos solúveis dosados em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de 116 adultos sadios após 48h de infecção pela vacina BCG Moreau

#### 4.2.2 – A vacina BCG Moreau induziu *in vitro* um aumento da secreção de IL-1 $\beta$ , além de IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-6, IL-8 e TNF, em adultos e neonatos por ensaios Multiplex.

Os ensaios Multiplex permitem a medida de um grande número mediadores imunológicos solúveis simultaneamente em um pequeno e único volume, reduzindo o erros e o desperdício (Siawaya *et al.*, 2008; Surenaud *et al.*, 2016). Dois deles foram utilizados no presente estudo: Luminex e CBA.

O ensaio de Luminex confirmou que a vacina BCG Moreau induz um aumento significativo de IL-1 $\beta$ , tanto em adultos quanto em neonatos (Tabela 7). Além disso, também revelou uma indução significativa de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-6, IL-8 e TNF em ambas as coortes. Analisando as diferenças entre os dois grupos (dados não mostrados), observa-se que a indução de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-6 e IL-8 são maiores em neonatos ( $p=<0,001$ ), enquanto IL-1 $\beta$  e TNF são mais abundantes em adultos ( $p=<0,001$ ). Essa diferença nos níveis de IL-1 $\beta$  entre adultos e neonatos, que não pôde ser observada pelo ensaio singular (Tabela 2), foi então confirmada. Nos adultos, também foram observados maiores níveis

de indução de IL-4 e IL-10, enquanto os neonatos apresentaram maiores níveis de IL-2, G-CSF, GM-CSF e MIP-1 $\beta$  (Tabela 7).

Tabela 7 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método Luminex (pg/ml) em adultos e neonatos

MEDI-ADOR	NEONATOS (n=17)				ADULTOS (n=30)			
	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor
IL-1 $\beta$	54,40 (54,40-54,40)	54,40 (54,40-296,80)	1,0	0,039	67,60 (3,50-801,70)	4715 (652,60-6256)	69,7	0,022
IFN- $\gamma$	182,50 (144-260,70)	442 (313,70-700)	2,4	<0,001	109 (53,71-117,30)	125,30 (125,30-131)	1,1	<0,001
IL-17A	182,50 (114,50-400)	487,70 (352,20-594)	2,7	0,001	14,20 (6,29-24,65)	27,87 (20,64-38,03)	2,0	0,001
IL-6	158,80 (158,80-1611)	4392 (2059-6533)	27,7	<0,001	159 (159-159)	159 (159-480,20)	1,0	0,012
IL-8	5809 (3029-10734)	11875 (11405-12895)	2,0	<0,001	8,70 (8,70-8,70)	16,80 (8,70-331,20)	1,9	0,008
TNF	8,60 (8,60-8,60)	104,50 (31,50-246,10)	12,2	<0,001	124,70 (30,16-956,70)	8330 (2828-8330)	66,8	0,001
IL-4	47,90 (47,90-47,90)	47,90 (47,90-47,90)	1,0	0,742	47,90 (44,32-47,90)	47,90 (47,90-55,26)	1,0	0,006
IL-10	12,10 (12,10-12,10)	12,10 (12,10-12,10)	1,0	>0,999	34,90 (6,97-53,20)	209,60 (103,30-418)	6,0	0,001
IL-2	0,30 (0,30-0,30)	0,30 (0,30-5,37)	1,0	0,043	0,30 (0,30-0,30)	0,30 (0,30-0,30)	1,0	>0,999
G-CSF	72,50 (72,50-72,50)	847,80 (189,30-1059)	11,7	<0,001	72,50 (72,50-72,50)	72,50 (72,50-72,50)	1,0	>0,999
GM-CSF	194,60 (160-323,30)	920,40 (427,60-1397)	4,7	<0,001	160,90 (91,90-200,30)	173 (96,15-209,40)	1,1	0,785
MIP-1 $\beta$	1708 (686-7180)	10988 (7471-11702)	6,4	0,001	47,40 (47,40-47,40)	47,40 (47,40-128)	1,0	0,180
IL-13	35,10 (35,10-35,10)	35,10 (35,10-35,10)	1,0	0,485	35,10 (35,10-35,10)	35,10 (35,10-35,10)	1,0	>0,999
MCP-1	2535 (852,60-5255)	1304 (497,50-4109)	0,5	0,563	13,60 (13,60-13,60)	13,60 (13,60-13,60)	1,0	>0,999

Mediadores imunológicos solúveis dosados em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de 30 adultos e 17 neonatos sadios após 48h de infecção pela vacina BCG Moreau.

Outros oito biomarcadores também foram dosados pelo método LUMINEX, porém apenas em adultos sadios. Assim, a vacina BCG Moreau induz um aumento significativo de IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33 e sCD40L (Tabela 8). Não houveram níveis detectados de IL-5, IL-7 e IL-12p70 (dados não mostrados).

Tabela 8 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método Luminex (pg/ml) em adultos.

MEDIADOR	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor
IL-17F	40,41 (18,91-99,36)	100,50 (86,23-271,60)	2,5	0,012
IL-21	467,30 (10,22-4727)	5870 (4987-6520)	12,6	0,011
IL-22	38,36 (5,60-70,66)	93,21 (72,51-238,30)	2,4	<0,001
IL-23	41,32 (7,68-200,70)	244,70 (229,80-283,90)	5,9	0,007
IL-25	5,75 (1,12-24,23)	27,05 (26,16-28,34)	4,7	0,022
IL-31	381,80 (150,90-1394)	1500 (1337-1618)	3,9	0,027
IL-33	10,39 (10,39-25,38)	27,22 (25,04-29,71)	2,6	0,006
sCD-40L	32,69 (8,89-72,25)	83,07 (72,39-91,16)	2,5	0,002

Mediadores imunológicos solúveis dosados em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de 30 adultos sadios após 48h de infecção pela vacina BCG Moreau

No ensaio de CBA, foi observado que a vacina BCG Moreau induz um aumento significativo de IFN- $\gamma$  e IL-4, tanto em adultos quanto neonatos (Tabela 9), apesar da diferença entre os dois grupos não ser relevante estatisticamente ( $p=0,515$  e  $p<0,999$ , respectivamente). Aqui, a dosagem de IL-1 $\beta$  não pode ser realizada devido ao formato comercial dos kits CBA. Em adultos, a vacina BCG também induziu níveis bastante aumentados de IL-10 e TNF, porém menores níveis de IL-6.

Tabela 9 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método CBA (pg/ml) em adultos e neonatos.

MEDI-ADOR	NEONATOS (n=11)				ADULTOS (n=29)			
	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor
IFN- $\gamma$	5,85 (1,50-27,48)	31,70 (18,85-212,20)	5,4	0,005	1,60 (2,25-1,50)	59 (16,80-532,20)	36,9	<0,001
IL-4	1,30 (1,30-1,30)	2 (2-2)	1,5	<0,001	1,30 (1,30-1,30)	2 (2-2)	1,5	<0,001
IL-10	5,60 (1,90-8,75)	3,30 (2,90-4)	0,6	0,371	1,50 (5,80-1,40)	31 (15,65-125,10)	20,7	<0,001
IL-6	2,10 (2,10-3,40)	1,80 (1,20-4,10)	0,9	0,293	2,10 (2,10-2,10)	1,75 (1,20-2,45)	0,8	0,026
TNF	23,80 (5,55-35,85)	43,65 (17,55-56,75)	1,8	0,63	1,30 (1,40-1,30)	95,60 (32,20-165,20)	73,5	<0,001
IL-2	2,10 (2,10-7,70)	2,10 (2,10-2,10)	1,0	0,151	2,10 (2,10-2,10)	2,70 (2,10-3,30)	1,3	0,128

Mediadores imunológicos solúveis dosados em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de 29 adultos e 11 neonatos sadios após 48h de infecção pela vacina BCG Moreau.

Outros seis mediadores imunológicos solúveis também foram dosados pelo método CBA, porém apenas em adultos sadios, sendo observado que a vacina BCG Moreau induz uma diminuição significativa de MCP-1 (Tabela 10).

Tabela 10 - Mediadores imunológicos solúveis (Mediana e IQR) dosados pelo método CBA (pg/ml) em adultos.

MEDIADOR	CONTROLE	BCG 48h	Razão	p Valor
MCP-1	4658 (3084-7457)	29,91 (23,42-31,17)	0,01	0,019
G-CSF	74,86 (24,46-202)	164,50 (34,40-325,10)	2,2	0,343
GM-CSF	180,90 (49,98-370,30)	294,30 (125,80-454,10)	1,6	0,553
IL-17A	2,17 (2,17-6,54)	18,75 (2,17-22,21)	8,6	0,214
IL-8	121430 (33753-147756)	55249 (11844-222407)	2,2	0,995
MIP-1 $\beta$	76,71 (6,92-383,80)	384,50 (8,45-815,10)	5,0	0,629

Mediadores imunológicos solúveis dosados em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de 29 adultos sadios após 48h de infecção pela vacina BCG Moreau.

## 5 – DISCUSSÃO

Uma das questões principais ainda não respondidas durante o curso da TB é a modulação da resposta imune durante a interação patógeno-hospedeiro. Esse desequilíbrio entre as respostas imunes protetiva e patológica pode induzir o estabelecimento da doença, a persistência do patógeno ou até mesmo o desenvolvimento de imunopatologias graves (Ehlers, 1999; Kidd, 2003; Wangoo *et al.*, 2001). A indução da resposta imune inata, que não é mediada somente por células residentes, mas também por aquelas que migram para os tecidos seguindo um estímulo, é uma estratégia para dar suporte à resposta imune adaptativa incipiente e constitui um tema relevante nos estudos em vacinas (Chumakov *et al.*, 2021; Clem, 2011). No presente estudo, descrevemos com sucesso a ação modulatória *in vitro* da vacina BCG cepa Moreau RDJ em induzir a expressão de marcadores fenotípicos na superfície de MONs de doadores adultos sadios vacinados, assim como a secreção de diferentes mediadores solúveis da resposta imune.

A regulação positiva de marcadores fenotípicos TLR4 e DEC-1 no tempo de 48h indica a capacidade dos MONs de aumentar o reconhecimento microbiano em resposta à infecção *in vitro* por *M. bovis*, apresentando esses PRRs em sua superfície logo em seguida (Marakalala & Ndlovu, 2017; Means *et al.*, 1999). Em estudos com MØs humanos, o pré-tratamento com a vacina BCG levou a uma indução de TLR4 após incubação com *M. leprae*, demonstrando o efeito dessa vacina em estimular uma proteção heteróloga (Polycarpou *et al.*, 2016). A capacidade da BCG Moreau de induzir TLR4 reforça as evidências em favor desse imunizante, como visto em modelos de linhagens celulares (Jin *et al.*, 2017), camundongos (John *et al.*, 2019, Liu *et al.*, 2018) e humanos, nos quais o BCG foi capaz de induzir a expressão desse PRR (Sun *et al.*, 2011), sendo essa dose-dependente (Yang *et al.*, 2012).

Neonatos dependem mais da imunidade inata até que seu sistema imune esteja completamente desenvolvido (Tsafaras *et al.*, 2020) e diferenças de funcionamento e regulação de TLR4 em neonatos já foram descritas (Levy *et al.*, 2006; Sugitharini *et al.*, 2014; Yerkovich *et al.*, 2007). Em casos de infecção grave que leve à sepse, TLR4 é um dos receptores que se encontra aumentado (Redondo *et al.*, 2014) e relatos de sua pouca expressão em neonatos de baixo



peso, mesmo após estimulação por LPS, indicam uma maior suscetibilidade à infecções por bactérias Gram-negativas, devido à falta de citocinas inflamatórias para aumentar a resposta imune incipiente (Foerster-Waldl *et al.*, 2005).

Em nossa coorte de neonatos sadios estudada, o aumento de TLR4 induzido *in vitro* pela vacina BCG Moreau foi irrisório. No entanto, observando os níveis basais constitutivos desse receptor, vimos que os neonatos estudados possuíam menos TLR4/célula do que os adultos, dado que destoa do estudo em uma outra coorte, após estímulo com LPS (Levy *et al.*, 2009). Porém, ambos estudos não corroboram com Yan *et al.* (2004), que reportam que adultos e neonatos têm expressão similares de moléculas TLR4. No entanto, não se sabe se há um mecanismo de compensação entre a quantidade de células expressando um marcador e a quantidade do marcador por célula, e tal fato deveria ser futuramente investigado. Apesar de Lichte *et al.* (2013) afirmarem que mudanças preliminares na expressão de TLR4 em MONs circulantes não são necessariamente parte de uma resposta inflamatória, Kleinnijenhuis *et al.* (2014) mostram que MONs de adultos após um ano de vacinação com BCG tiveram um aumento na expressão de TLR4, com concomitante acréscimo na expressão de citocinas após estímulo, o que poderia indicar a capacidade de retenção do estímulo inicial e de reprogramação epigenética (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012).

A função de DEC-1 no reconhecimento de patógenos também tem sido alvo de diversos estudos, estando esse receptor presente tanto no reconhecimento de Mtb, como de outras micobactérias (Wagener *et al.*, 2018). Apesar de linfócitos também serem capazes de expressar esse receptor, o bloqueio de DEC-1 nessas células demonstrou apenas uma capacidade seletiva de utilizar outra via de sinalização (Cortez-Espinosa *et al.*, 2012; Willment *et al.*, 2005,). Já em PBMCs, a alta expressão constitutiva de DEC-1 revela um caráter funcional importante no reconhecimento de patógenos (Reid *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2002). Neste estudo, constatamos a capacidade da vacina BCG Moreau em induzir uma expressão de DEC-1 em MONs de adultos sadios, e nossos achados corroboram aqueles que indicam os benefícios desse aumento, como o estudo de Betz *et al.* (2011) que, ao induzirem DEC-1 usando  $\beta$ -glucanos, inibiram o crescimento intracelular de BCG. Da mesma forma, Van der Meer *et*

*al.* (2015) também reportaram que tanto o BCG quanto a sinalização via DEC-1, seriam indutoras de reprogramação epigenética.

Tanto em DCs e MØs murinos (Bakhrú *et al.*, 2014), quanto em MØs de adultos (Saraav *et al.*, 2017) e neonatos (Lemoine2015), a ativação simultânea de DEC-1 e TLRs por diferentes agonistas conseguiu induzir a produção de IL-12p70 em moDCs, assim como a polarização de LT para o perfil Th1 e a expressão de moléculas coestimulatórias, como CD40, B7-1, B7-2 e HLA-DR. Assim, propôs-se que o uso de um agonista de DEC-1 como adjuvante pode ser uma estratégia para beneficiar a vacinação neonatal (Lemoine *et al.*, 2015). No entanto, nesta coorte utilizada em nosso estudo, a vacina BCG Moreau não agiu como tais agonistas, pois observamos que neonatos constitutivamente expressam mais células positivas para DEC-1 do que os adultos.

A expressão induzida de B7-1 pela vacina BCG Moreau em MONs de adultos sadios é um resultado promissor, indicando a capacidade dessas células quanto a uma apresentação antigênica eficiente (Collins *et al.*, 2005). Essa apresentação eficiente, por sua vez, tem a possibilidade de induzir à ativação de células da imunidade adaptativa, e uma resposta imune do tipo Th1 efetiva, necessária para o combate ao Mtb (Boom *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2019). Estudos com modelos experimentais corroboram a capacidade de indução de B7-1 pelo BCG, com intensa expressão por moDCs em camundongos (Tsuchiya *et al.*, 2002), assim como em DCs no modelo caprino quando estimuladas com a vacina BCG Dinamarquesa (Hamilton *et al.*, 2016). Porém, essa expressão em murinos parece ser dependente de vitamina D (Yang *et al.*, 2019). Componentes da vacina BCG Japonesa também já demonstraram a capacidade de induzir a expressão de B7-1 em DCs humanas (Tomita *et al.*, 2019). Em adultos vacinados com BCG quando crianças, estímulos como LPS, BCG ou BCG recombinante já mostraram capacidade de induzir a ativação de moDCs com aumento de B7-1 (Szpakowski *et al.*, 2015). Contudo, em pacientes com câncer cervical, moDCs infectadas com o BCG e reestimuladas com PPD reduziram a expressão de B7-1, sugerindo assim uma sinergia deletéria entre Mtb e câncer (Manickam & Sivanandham, 2011). A vacina BCG com adição da proteína ligante de maltose/maltodextrina (MPB) demonstrou aumentar a expressão de B7-1 em DCs de murinos (Jiang *et al.*, 2017). Em células de linhagem THP1, a

estimulação por LPS e polipeptídeo dializável de extrato de leucócitos provocou um aumento significativo em ambos B7-1 e B7-2 e esse aumento foi correlacionado com uma produção de IL-6 (Jiménez-Uribe *et al.*, 2019). Em DCs humanas, a estimulação com o BCG e partículas do vírus da dengue, resultou em uma expressão significativamente maior de B7-1, B7-2 e HLA-DR (Hunsawong *et al.*, 2015). CD40L também regula a atividade coestimulatória em APCs, induzindo a expressão de B7-1 (Caux *et al.*, 1994). Diante disso, a expressão de B7-1 parece ser aumentada quando há uma combinação da vacina BCG com outros componentes, podendo isso auxiliar na apresentação antigênica para outras doenças.

A importância de B7-1 na interface das imunidades inata e adaptativa torna sua indução por qualquer vacina extremamente desejável, especialmente no período neonatal (Muthukkumar *et al.*, 2000). Em nossa coorte de neonatos, não houve qualquer modulação de B7-1 pela BCG Moreau. Importaneamente, comparando as duas coortes estudadas, observamos (1) mais MONs de neonatos expressando B7-1 constitutivamente, e (2) mais MONs de adultos apresentando B7-1 induzido pela vacina BCG Moreau. Essa comparação já havia sido feita com outros tipos celulares, onde DCs de neonatos expressaram menos B7-1 e B7-2 (Kaur *et al.*, 2007) e LB não apresentaram expressão diferencial, mesmo depois de terem sido ativadas (Elliott *et al.*, 1999). Assim como nós, Kim *et al.*, (2015) também encontraram um MFI menor de B7-1 em moDCs de neonatos, afirmando ainda que essas células apresentaram propriedades tolerogênicas (KIM *et al.*, 2015). Ainda, um estudo com moDC infectadas com o vírus *influenza A* apresentou baixa expressão de B7-1 (Lin & Lee, 2014), apontando para a variância de acordo com o tipo celular e modelo experimental. Como um todo, esses estudos têm indicado que ainda há uma grande necessidade de se compreender melhor os padrões de expressão dessa molécula coestimulatória.

Por vezes, funções biológicas conflitantes são atribuídas à PGE2/EP2, como a supressão da maturação de MØs de forma dose-dependente (Zaslona *et al.*, 2012), mas seus efeitos na imunidade adaptativa também são observados (Harizi *et al.*, 2003). Assim, uma capacidade de induzir a expressão de EP2, a única isoforma desse receptor que perdura frente à inflamação, pode ser crucial

para uma imunidade efetiva. Níveis elevados de EP2 induzidos *in vitro* em 72h de infecção pela vacina BCG Moreau foram encontrados em nosso estudo. Porém, um pico de expressão de PGE2 posterior àquele em adultos e neonatos, como o encontrado por Lima *et al.* (2015), pode indicar que há uma retroalimentação positiva de PGE2/EP2. Visto isso, já era esperado que EP2 também fosse expresso em neonatos. Porém, em nossa coorte de neonatos, falhamos em demonstrar *in vitro* qualquer modulação relevante de EP2, revelando apenas uma expressão elevada em adultos sadios após o estímulo vacinal. A deleção de genes de EP2 em camundongos (Kaul *et al.*, 2012) ou seus polimorfismos (Liang *et al.*, 2016) levam a um aumento da carga micobacteriana nos pulmões durante a infecção por Mtb, indicando que PGE2/EP2 tem um papel importante na replicação do bacilo (Chen *et al.*, 2008). Ballinger *et al.* (2011) compararam MØs alveolares de camundongos jovens com aqueles de adultos e observaram que apesar de neonatos produzirem mais PGE2, isso também não induziu uma maior produção de EP2. A sinalização por PGE2 e coestimulação de TCR e CD28 é essencial para a diferenciação em um perfil Th1 em murinos (Li *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2009), promovendo a expressão de IL-12R e IFN- $\gamma$ R (Yao *et al.*, 2013), além de amplificar a expansão de Th17 mediada por IL-23 (Yao *et al.*, 2009). Em humanos, PGE2/EP2 inibe IL-12 e age sinergicamente com IL-23, coordenando sua secreção pelo uso diferencial de EP2 ou EP4 (Poloso *et al.*, 2013) e aumento de Th17 de memória (Chizzolini *et al.*, 2008). A combinação de PGE2, IL-1 $\beta$  e IL-23 promove a produção de IL-17, aumentando a expressão dos seus receptores (Boniface *et al.*, 2009).

Já na resposta imune contra outros patógenos, como HIV (Jones *et al.*, 2008) e o vírus da hepatite B (Liu *et al.*, 2016), a disfunção da molécula TIM-3 em TCD4+ e TCD8+ leva a uma progressão das doenças. Contrariamente, o bloqueio dessa molécula restaura a atividade celular e consegue também limitar o crescimento de Mtb intracelular nas células dos pacientes HIV+ (Sada-Ovalle *et al.*, 2015). GAL-9, ligante de TIM-3, também pode se ligar a DEC-1 em MØs via CD40 (Daley *et al.*, 2017), inibindo a proliferação de LT e induzindo a morte celular (Vaitaitis & Wagner, 2012). Hipoteticamente, uma maior expressão de TIM-3 poderia, por competição, diminuir a ligação de GAL-9 com DEC-1 ao limitar a biodisponibilidade de um ligante. Porém, um modelo experimental de

cocultura com LT revelaria melhor a atividade fisiológica de GAL-9/DEC-1/TIM3. Zhang *et al.* (2011a) observaram que a expressão de TIM-3 é significativamente reduzida quando há estimulação de TLR4 por LPS. Já em nosso estudo, onde houve uma regulação positiva de TLR4, TIM-3 não demonstrou qualquer alteração em MONs de adultos sadios após estímulo com a vacina BCG Moreau, enquanto a expressão *in vitro* de TIM-3 sob estímulo da vacina BCG Moreau em neonatos ainda carece de ser investigada.

O modelo de indução *in vitro* de citocinas utilizado no presente estudo é empregado com frequência para investigar a indução por diversos estímulos. Porém, nosso grupo foca naqueles induzidos pela vacina BCG, adicionando informações aos diversos estudos relacionados (Bitencourt *et al.*, 2021; Boer *et al.*, 2015, Lalor *et al.*, 2011, Soares *et al.*, 2008). Sendo assim, trabalhos seminais utilizando a cepa Moreau já demonstraram que IL-1 $\beta$  e TNF foram encontradas sendo diferencialmente expressos em adultos sadios (Simas *et al.*, 2011). Neste estudo, dentre todas as citocinas dosadas e estimuladas pela vacina BCG Moreau, as maiores amplitudes entre as coortes foram vistas para **IL-1 $\beta$  (~70x mais em adultos), IL-6 (27x mais em neonatos) e TNF (~55x mais em adultos)**. Sabendo que a nossa coorte de adultos sadios faz parte de uma parcela da população cuja vacinação prévia com BCG foi compulsória na infância, seria apropriado assumir que, repetindo o estímulo *in vitro*, haveria indução de citocinas pró-inflamatórias. Esse fato se repete em muitos indivíduos de forma homóloga ou heteróloga, por estímulos diversos e com grande variabilidade (Jensen *et al.*, 2014; Kleinnijenhuis *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2017), o que instiga ainda mais discussões sobre o tempo da ação imunomodulatória do BCG (Barreto *et al.*, 2006; Namakula *et al.*, 2020; Nguipdop-Djomo *et al.*, 2016; Sotgiu & Migliori, 2016).

Das sete citocinas encontradas aumentadas *in vitro* sob indução em ambas as coortes deste estudo, seis podem ser relacionadas ao perfil Th1, esse formado principalmente pelo eixo IL-2/TNF/IFN- $\gamma$  (Wilkinson & Wilkinson, 2010). Esse é um perfil celular desejável e que é tido como crucial na imunidade efetiva e protetora contra o Mtb (Boom *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2019). Anteriormente, a produção de IFN- $\gamma$  era tida como exclusiva de células TCD4+ e TCD8+, populações que aumentam progressivamente em número com a idade (Chipeta

*et al.*, 1998), mas sua produção por células da resposta imune inata contribui para a ativação adiantada das APC no sítio da infecção (Schroder *et al.*, 2004). O IFN- $\gamma$  sozinho consegue estimular a apresentação antigênica via MHC II e também induzir APCs não profissionais a expressar essa molécula (Schroder *et al.*, 2004). Visto que a indução de IFN- $\gamma$  pela vacina BCG Moreau em adultos saudáveis já foi observada como sendo um diferencial em comparação com a cepa Russa dessa vacina (da Silva *et al.*, 2021), assume-se uma capacidade maior da cepa brasileira em induzir uma resposta imune mais efetiva.

A produção de IL-18 apresenta um nível de dependência da presença de IFN- $\gamma$ , principalmente visando uma resposta imune de memória (Dinarello *et al.*, 1998, 1999). Ainda assim, nosso resultado atual corrobora com dados de um estudo anterior (Ponte *et al.*, 2018), no qual houve grande indução de IFN- $\gamma$  pela BCG Moreau em adultos saudáveis, não obstante a diminuição dos níveis de IL-18, revelando que essa dependência parece não ser absoluta. A vacinação com BCG na infância também está associada à produção elevada de IFN- $\gamma$  em resposta a outros estímulos, como a toxina tetânica, associando o BCG com uma resposta imune do tipo Th1 e heteróloga (Libraty *et al.*, 2014). As CBMCs produzem relativamente baixas quantidades de citocinas do tipo Th1, incluindo TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12p70 e IFN- $\alpha$  (Levy, 2007). Então, conseguir uma indução *in vitro* de IFN- $\gamma$  nas CBMCs maior que em adultos saudáveis, como demonstrado neste estudo, representa uma capacidade imunomodulatória excepcional.

A produção de TNF no sangue periférico costuma ser majoritariamente induzida em MONs e MØs (Vilcek & Lee, 1991). Essa produção é crucial para o controle do Mtb (Lynch *et al.*, 2010; Seong *et al.*, 2007). Já foi vista uma sensibilidade menor aos estímulos via TLRs em neonatos, levando a uma reduzida produção de TNF (Levy *et al.*, 2004). Nesse mesmo estudo, apesar de não haver uma diminuição da expressão de mRNA para TNFR1 e R2, sugere-se uma inibição por outros fatores. Embora cepas virulentas e avirulentas de Mtb sejam capazes de induzir níveis comparáveis de TNF em MØs alveolares humanos, as virulentas induzem a secreção de TNF com menor bioatividade, sendo um exemplo da manipulação das respostas imunes por Mtb (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998). Aquele mesmo estudo revelou uma menor indução

atribuída principalmente aos níveis elevados de IL-10, resultando na liberação de sTNFR2, inibindo assim sua função.

As IL-1 tem sido ligadas a uma variedade de patologias inflamatórias, como asma, fibrose pulmonar e a formação de granulomas (Osei *et al.*, 2019; Sheat *al.*, 2021; Yamada *et al.*, 2000). Assim como TNF, IL-1 $\beta$  desempenha *in vivo* um papel importante no controle de Mtb em murinos (Fremond *et al.*, 2007; Jayaraman *et al.*, 2013; Mayer-Barber *et al.*, 2010; Sugawara *et al.*, 2003), assim como *in vitro* na indução de apoptose em MONs infectados por micobactérias (Hernandez *et al.*, 2003; Keane *et al.*, 1997). Essa produção expressiva de IL-1 $\beta$ , e também de IL-18, pode ser alcançada através da ativação da via do inflamossomo NLRP3/Caspase-1 (Shamaa *et al.*, 2015), via na qual anteriormente e provavelmente observamos estar ativada após a infecção *in vitro* pela vacina BCG Moreau (Antas *et al.*, 2019). De fato, a vacina BCG Moreau já demonstrou induzir *in vitro* um aumento de níveis de IL-1 $\beta$  em células da linhagem THP1 (Monteiro-Maia *et al.*, 2018), PBMCs (da Silva *et al.*, 2021; Simas *et al.*, 2011) e também em CBMCs (Antas *et al.*, 2019), entretanto, IL-1 $\alpha$  não foi observada estar sendo induzida *in vitro* pela vacina BCG Moreau no presente estudo, ou mesmo em outros pregressos de nosso grupo (Ponte *et al.*, 2018). Outras cepas de Mtb transgênicas e atenuadas, como H37Rv $\Delta$ RD-1 e H37Rv $\Delta$ ESAT-6, falharam em demonstrar tal imunomodulação (Dwivedi *et al.*, 2012). Maiores níveis de TNF e IFN- $\gamma$  induzidos *in vitro* pela vacina BCG Moreau já foram anteriormente observados estarem aumentados somente em adultos saudáveis (Ponte *et al.*, 2015, 2018). Boer *et al.* (2015) investigaram em adultos não vacinados quando crianças, que após receberem a vacina BCG Dinamarquesa, apresentaram uma dicotomia nos perfis de resposta imune, produzindo IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF e IL-17A, ou um perfil de citocinas virtualmente ausente, com indução de TCD8 $^+$  regulatórias. Essa divergência pareceu persistir em diferentes populações (Subbian *et al.*, 2020; van den Biggelaar *et al.*, 2009).

Por muito tempo, a IL-6 foi considerada apenas como uma citocina pró-inflamatória (Gabay, 2006; Tanaka *et al.*, 2014). Porém, assim como tantas outras, sua ação depende do contexto fisiológico em que esteja inserida, podendo atenuar ou induzir a síntese de outras citocinas inflamatórias (Luo & Zheng, 2016). Sua presença e função pleiotrópica já foi vista em pacientes com

TB, mas seu papel nessa doença continua incerto (Hussain *et al.*, 2002, Siawaya *et al.*, 2009). Em nossos resultados apresentados utilizando um dos métodos multiplex empregado (Luminex), houve um aumento de IL-6 induzido *in vitro* pela vacina BCG Moreau em ambos os grupos, sendo esse diferencialmente maior em neonatos. Em paralelo, também observamos um decréscimo por outro método multiplex (CBA). Porém, mesmo aparentemente sutil, esse decréscimo foi relevante em adultos saudáveis. Em estudo anterior de nosso grupo, essa citocina não apresentou variação pela vacina BCG Moreau (Ponte *et al.*, 2015). Já em outros estudos, a mesma se mostrou aumentada por aquele estímulo em adultos saudáveis (da Silva *et al.*, 2021; Ponte *et al.*, 2018). A indução de IL-6 pelo BCG em neonatos já pôde ser observada por Freyne *et al.* (2018), mas quando reavaliada após um segundo estímulo de peptoglicanos, aqueles autores relataram menor produção. Em células THP1 infectadas com BCG recombinante, a IL-6 foi inibida (Monteiro-Maia *et al.*, 2018).

Uma indução de altos níveis de IL-2 foi associada a uma imunidade protetiva na LTBI (Andersen & Woodworth, 2014). Porém, resultados conflitantes e variáveis inferem na exatidão das respostas imunes (Luabeya *et al.*, 2015; Tameris *et al.*, 2015). A indução *in vitro* de IL-2 pela cepa Moreau foi confirmada em nossos resultados aqui apresentados com neonatos saudáveis. Assim, isto soma-se aos achados anteriores, onde a IL-2 já havia sido mostrada estar sendo induzida pela vacina BCG Moreau apenas em adultos saudáveis (Ponte *et al.*, 2015, 2018) e pela vacina BCG Dinamarquesa em neonatos (Soares *et al.*, 2008). Na terapia intravesical com BCG no câncer de bexiga, a presença de IL-2 também pode estar associada a uma atividade antitumoral (Haaff *et al.*, 1986).

A IL-7 previne que TCD4+ de memória entrem em apoptose (Chetoui *et al.*, 2010) e resgata LT da exaustão (Tan *et al.*, 2001), com sua expressão podendo ser mais vantajosa a longo prazo. Por esse motivo, a IL-7 é amplamente apontada como um adjuvante vacinal (Bekele *et al.*, 2021; Pellegrini *et al.*, 2009; Stevceva *et al.*, 2006), apresentando ação protetiva em mucosas (Logerot *et al.*, 2021), além de induzir anticorpos no modelo com vacina anti-rábica (Li *et al.*, 2017). Possivelmente, respostas imunes mais tardias à vacina BCG podem demonstrar uma indução que leve ao resgate de LT (Singh *et al.*, 2010). Porém, até o momento, a IL-7 induzida *in vitro* pela vacina BCG Moreau não conseguiu



ser mensurada nos nossos sobrenadantes, seja neste estudo, ou naquele de Ponte *et al.* (2018).

Sendo uma das principais citocinas a induzir a diferenciação de TCD4+ para o perfil Th1, IL-12p70 requer uma transcrição coordenada de suas duas subunidades IL-12p35 e IL-12p40 (Vignali & Kuchroo, 2012). Essa ativação de transcrição depende da ativação de TLRs ou CD40 e de IFN- $\gamma$  (Hayes *et al.*, 1995; Mosca *et al.*, 2000). Durante o curso da TB, há expressão de IL-12 nos pulmões (Zhang *et al.*, 1994) e sua expressão está inversamente associada com a carga bacteriana no modelo experimental (Cooper *et al.*, 1995). O estímulo por BCG falha em induzir a produção de mRNA de IL-12p35, ainda que induza IL-12p40 em moDCs de neonatos (Kativhu & Libraty, 2016). No presente estudo, e de forma análoga a outro (Ponte *et al.*, 2018), não observamos observar qualquer indução *in vitro* de IL-12p70 pela vacina BCG Moreau. Destarte, em populações celulares mais específicas, como DCs e moDCs, essa produção possa ser diferencial (Goriely *et al.*, 2001; Renneson *et al.*, 2009). No entanto, a produção reduzida de IL-12 em neonatos parece ser um fator-chave ligado ao estado de desenvolvimento imunológico (Lee *et al.*, 1996).

O IFN- $\beta$  diminui a expressão de MHC II e moléculas coestimulatórias em APCs, levando a um menor nível de ativação dessas células e menor probabilidade de apresentação antigênica (Markowitz, 2007). Além disso, o IFN- $\beta$  já foi mostrado reduzir o número de DCs mielóides circulantes e também de prevenir que células do tipo Th17 se diferenciem, reduzindo a produção de IL-17 (Haji Abdolvahab *et al.*, 2016). No entanto, como muitos fatores relacionados à imunidade, há um cenário em que a presença de IFN- $\beta$  se mostra benéfica: DCs tratadas com IFN- $\beta$  e infectadas com o BCG demonstraram maior capacidade de maturação e liberação de IL12p70 (Giacomini *et al.*, 2008).

Com o avanço de uma infecção pulmonar, IFNs do tipo I também induzem o acúmulo de células inflamatórias no sítio de infecção, através da produção de quimiocinas por fagócitos locais (Antonelli *et al.*, 2010; Desvignes *et al.*, 2012; Dorhoi & Kaufmann, 2014). Essa função danosa de IFN-I pode ser balanceada por IL-1 induzida por PGE2 durante o curso da TB (Mayer-Barber *et al.*, 2014), e também durante a infecção pelo vírus da *Influenza* (Coulombe *et al.*, 2014). Cepas virulentas de *Mtb* têm sido reportadas como indutoras de LXA4, com esse

inibindo a produção de PGE2, enquanto a vacina BCG já foi reportada induzir níveis elevados de PGE2, protegendo a membrana plasmática e gerando apoptose, ou seja, morte celular desejável em modelos vacinais (Behar *et al.*, 2010; Divangahi *et al.*, 2010; Nore *et al.*, 2020). Nossos resultados anteriores já demonstram uma indução *in vitro* pela vacina BCG Moreau desse eicosanoide em adultos e neonatos saudáveis (Lima *et al.*, 2015) e, nos resultados atuais, esse eicosanoide foi induzido apenas em adultos saudáveis. Porém, naquele estudo a indução *in vitro* de IFN- $\beta$  pelo mesmo estímulo apresentou variação entre as duas coortes, estando apenas aumentado tardiamente nos neonatos. Aumento de PGE2 já foi visto também em DCs, sendo esse necessário para posterior indução de IL-10, IL-23 e IL-17 (Gopal *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2020).

A síntese de LTB4, outro eicosanoide, pode produzir um estado hiperinflamatório e levar a uma maior suscetibilidade durante a TB (Tobin & Ramakrishnan, 2013). Porém, um estudo revelou que pacientes com TB nas diferentes formas clínicas não apresentam alterações na expressão de LTB4 (Nore *et al.*, 2020). Em outro estudo com neonatos saudáveis, encontramos aumentos tardios nos níveis de LTB4 induzidos *in vitro* pela vacina BCG Moreau, mas não nos adultos (Lima *et al.*, 2015). O papel dessa molécula ainda é dúvida, visto que camundongos expressando mais LTB4 conseguiram controlar melhor o crescimento intracelular de Mtb, mas seu bloqueio os tornou mais suscetíveis (Franco, 2009). Em estudo mais recente, a inoculação de LTB4 aumentou a suscetibilidade ao Mtb, com uma piora na inflamação em camundongos (Sorgi *et al.*, 2020).

O TGF- $\beta$  antagoniza várias funções pró-inflamatórias de outras citocinas, assim como regula a quimiotaxia (Roberts & Sporn, 1993; Wrzesinski *et al.*, 2007). Entretanto, a sua ação vai depender muito do contexto em que esteja sendo produzido, podendo induzir o acúmulo de células inflamatórias no sítio de infecção e expansão de células com perfil Th17 (Yang *et al.*, 2012), mas também inibir TNF (Mendez-Samperio *et al.*, 1998) e IFN- $\gamma$  (Schroder *et al.*, 2004). Em um estudo sobre a asma experimental no contexto da vacina BCG, o TGF- $\beta$  já foi visto estar inibido em ratos que receberam esta vacina, os quais apresentaram menor inflamação e remodelação das vias aéreas, associada à transição epitélio-mesenquimal induzida por TGF- $\beta$  (Tian *et al.*, 2017). Ao

mesmo tempo, o TGF- $\beta$  parece prejudicar os efeitos heterólogos do BCG contra helmintíases (Elias *et al.*, 2008). De maneira geral, LT de neonatos apresentaram uma redução na produção de TGF- $\beta$ , em relação aos adultos (Schultz *et al.*, 2004). Da mesma forma, o TGF- $\beta$  foi observado estar sendo inibido nos neonatos saudáveis, contrariando aqueles nossos achados anteriores nos quais não houve modulação (Ponte *et al.*, 2018). A capacidade da vacina BCG Moreau em inibir TGF- $\beta$  *in vitro* também já foi observada em adultos (da Silva *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2015), mas não no presente estudo ou naquele de Ponte *et al.* (2018).

Durante o parto, hormônios maternos, como progesterona, estradiol e a gonadotrofina coriônica humana, têm efeitos indutores dos perfis Th2 e Treg, mas efeitos inibidores dos perfis Th1 e Th17, favorecendo um estado propício para a gravidez (Wegmann *et al.*, 1993). As Treg são recrutadas antes da implantação do embrião, sendo vital para a sua manutenção, enquanto as Th17 são sugeridas como tendo um impacto negativo na fertilidade (Polese *et al.*, 2014). Sendo esse estado parcialmente compartilhado com o neonato após o parto, isso pode limitar a eficácia de imunizantes (Willems *et al.*, 2009). Incapazes de formar uma resposta imune com perfil Th1 como adultos, essa resposta em neonatos pode tentar compensar a manobra com uma indução de Th17 produtoras de IFN- $\gamma$  (Debock & Flamand, 2014). Destarte, observa-se um aumento na suscetibilidade ao Mtb, caso haja uma supressão do perfil Th17 (Khader *et al.*, 2007; Monin *et al.*, 2015; Segueni *et al.*, 2016). Isso posto, a vacina BCG Moreau pôde estimular uma produção *in vitro* de IL-17A em ambas coortes, sendo essa modulação diferencial entre adultos e neonatos, assim como também induziu *in vitro* IL-17F em adultos. Essa indução já havia sido observada em PBMC de adultos saudáveis estimuladas *in vitro* por diversas cepas do BCG (da Silva *et al.*, 2021; Ponte *et al.*, 2018). Adultos do Reino Unido quando imunizados com BCG ainda apresentavam maior resposta imune no grupo de primovacinados, com produção alta de IL-17 e IFN- $\gamma$ , correlacionadas com menor crescimento micobacteriano (Matsumiya *et al.*, 2014). Isso pode significar que, mesmo em adultos que ao longo da vida tenham entrado em contato com micobactérias ambientais e desenvolvido alguma parcela de imunidade, a resposta imune dependente de IL-17 e IFN- $\gamma$  ainda é maior naqueles vacinados. Ao mesmo tempo, a atividade de IL17A durante a TB pode ser um fator

discriminatório entre LTBI e TBA, havendo evidências de que durante a LTBI, a produção de IL-17A esteja diminuída em PBMCs (Khan *et al.*, 2017; Pollara *et al.*, 2021; Rai *et al.*, 2016; Shen & Chen, 2017). Já na TBA, essa resposta imune do compartimento Th17 parece estar desregulada ou interrompida (Luo *et al.*, 2017; Shen & Chen, 2017; Torrado & Cooper, 2010), enquanto o perfil Th1 é comparável nas duas. Apesar disso, há estudos que confirmam a participação do perfil Th17 e aquelas citocinas relacionadas, ainda que não haja um papel consoante quanto à imunidade protetora contra TB (Goldsack & Kirman, 2007; Romano *et al.*, 2006; Segueni *et al.*, 2021, Torrado & Cooper, 2010,).

A IL-25 desempenha um papel antagônico dentro da família das IL-17, induzindo a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13 em diversos tecidos (Angkasekwinai *et al.*, 2007; Fort *et al.*, 2001). Tratamentos com IL-25 elevam IL-13, o que suprime respostas imunes com perfil Th17 ao inibir IL-23, IL-1 $\beta$  e IL-6 em DCs (Kleinschek *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, IL-25 promove o aumento da secreção de muco e hiperplasia celular no parênquima pulmonar durante infecções fúngicas (McGeachy *et al.*, 2019, Owyang *et al.*, 2006). Sendo um importante fiel no balanço Th1/Th2, o nível exato de influência dessa modulação é uma questão ainda a ser explorada. Em nosso estudo *in vitro* de infecção com a vacina BCG Moreau, a IL-25 se mostrou aumentada quando dosada em adultos.

Embora os níveis basais constitutivos de IL-23 em neonatos sadios estejam marcadamente reduzidos em relação aos adultos (Antas *et al.*, 2016), a indução de IL-23 pode ser detectada no primeiro dia após a vacinação com BCG (Umamura *et al.*, 2007). Neste nosso estudo atual, PBMCs de adultos sadios frente a cepa Moreau demonstram essa indução *in vitro* após 48h de infecção. Esse aumento se mostra essencial, visto que regula de forma dependente as sínteses de IL-17 e IL-10 induzidas por micobactérias (Gopal *et al.*, 2011). Da mesma forma, essa regula a geração de LT produtores de IFN- $\gamma$  em murinos (Wozniak *et al.*, 2006) e adultos (Khader *et al.*, 2007). Estudos anteriores falharam em demonstrar diferenças em níveis de IL-23 quando mononucleares foram estimulados *in vitro* por três cepas diferentes do BCG (Ponte *et al.*, 2018). Em patologias, como esclerose múltipla (Chen *et al.*, 2012) e lúpus eritematoso sistêmico (Wong *et al.*, 2008), IL-18 e IL-23 foram encontradas elevadas no

plasma e ambas se mostram correlacionadas no plasma de neonatos sadios (Antas *et al.*, 2016).

Em resposta à estimulação por IL-23, células Th17, T $\gamma$  $\delta$ , Th22 e NKs produzem IL-22 (Khader *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006). A IL-22 possui um papel importante nas defesas de mucosa do hospedeiro, sendo induzida *in vitro* pela vacina BCG Moreau em adultos sadios neste estudo. A IL-22 age facilitando a fusão fagolisossomal, ao aumentar a expressão da molécula Rab7 em M $\phi$ s infectados por Mtb (Dhiman *et al.*, 2013). Estudo em derrames pleurais e pericárdicos de pacientes com TB releva que níveis de IL-22 se encontram abundantes, mas não aqueles de IL-17, e os níveis de IL-22 também excediam os de IL-17 no sangue periférico (Matthews *et al.*, 2011). No entanto, níveis de IL-22 se correlacionam também positivamente com MMP9, podendo induzir patologia (Matthews *et al.*, 2011). Estudos também afirmam que, em biopsias de TCT, a IL-22 não se apresentou aumentada em paciente com TBA (Pollara *et al.*, 2021). Esse fato veio afirmar que a IL-22 parece ter um papel dispensável, por ser compensada por outros mediadores solúveis (Behrends *et al.*, 2013).

Neste estudo, os níveis de IL-21 também foram induzidos *in vitro* pela vacina BCG Moreau em adultos, corroborando com os achados de Harada *et al.* (2006). A IL-21 é expressa por TCD4+ ativadas (Kuchen *et al.*, 2007) e aparenta ter um papel protetivo na TB, associado a uma indução de IFN- $\gamma$  (Booty *et al.*, 2016). Interessantemente, durante a vacinação com BCG, já foi observada a expansão de uma população de NKs produtoras de IFN- $\gamma$  com capacidade de memória e maior sobrevivência e envolvidas na proteção contra o Mtb, além de se mostrarem dependentes de IL-21 (Venkatasubramanian *et al.*, 2016). Um veredito sobre sua atividade, assim como sobre muitos fatores relacionados ao BCG, são contestados por outros estudos, como o de Huang *et al.* (2016), que relataram um papel inibitório de IL-21 sobre células T $\gamma$  $\delta$  produtoras de IL-17A.

Assim como a IL-23, a IL-27 se encontra naturalmente reduzida em sua forma constitutiva em neonatos (Antas *et al.*, 2016). Corroborando com achados anteriores de Ponte *et al.* (2018), novamente não fomos capazes de demonstrar qualquer alteração *in vitro* nos níveis de IL-27 modulados pela vacina BCG Moreau em ambas as coortes deste estudo. Porém, a IL-27 já provou ser induzível por micobactérias, em um contexto no qual essas estimularam células

tanto da resposta imune inata, quanto da adaptativa, ao induzir secreção de IFN- $\gamma$  (Zhang *et al.*, 2011b). Contudo, seu aumento em MØs de camundongos neonatos sugere um papel imunossupressor, que predomina no período gestacional, e seu bloqueio também é indicado como opção para melhorar as respostas imunes em neonatos (Kraft *et al.*, 2013). Além disso, sua alta produção durante o curso da TB pleural sugere um papel patogênico (Abdalla *et al.*, 2015).

Nossos resultados também encontraram um aumento dos níveis da forma solúvel de CD-40L induzido *in vitro* pela vacina BCG Moreau em adultos saudáveis. Outra população adulta de Bangladesh, recém imunizada com a vacina BCG da cepa Japonesa, apresentou uma diminuição de sCD-40L após estímulos com antígenos de *M. leprae* (Richardus *et al.*, 2018). Já em neonatos, a vacinação com a cepa Dinamarquesa não demonstrou capacidade de induzir qualquer modulação desse ligante (Whittaker *et al.*, 2018a). Por termos observado um aumento de algumas das citocinas inflamatórias possivelmente induzidas pela ativação de CD40, como IL-8, IL-17 e TNF (Kawabe *et al.*, 2011; Sia *et al.*, 2017), essa estimulação pode não estar convertendo para a liberação da forma sCD40L (Lazarevic *et al.*, 2003).

Como dito anteriormente, há influência direta dos hormônios liberados durante a gravidez que podem propiciar alterações nos mecanismos imunoinflamatórios (Holt *et al.*, 2005; Polese *et al.*, 2014; Prescott *et al.*, 1998), podendo comprometer as respostas imunes anti-micobacterianas (Rook, 2007). De modo geral, já foi observado que neonatos saudáveis expressaram constitutivamente e temporalmente níveis elevados da citocina anti-inflamatória IL-4; porém, a IL-10 está aumentada apenas em adultos saudáveis (Hoffmann *et al.*, 2005). Já em nosso estudo, a vacina BCG Moreau induziu *in vitro* níveis elevados de IL-4 em ambas as coortes e os níveis elevados de IL-10 foram induzidos apenas em adultos saudáveis.

Quando controlada, a secreção de IL-10 se torna benéfica, pois a mesma é uma das principais citocinas anti-inflamatórias e potente inibidora das respostas imunes do tipo Th1 (Saraiva & O'Garra, 2010). Enquanto TNF eleva a síntese de NO e RNI, a IL-10 suprime essa atividade, mantendo o balanço imunológico desejado durante doenças crônicas, como a TB (Higgins *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2016). Em consonância com nossos achados

atuais, estudos prévios também encontraram níveis aumentados de IL-10 em adultos (Ponte *et al.*, 2015), neonatos (van den Biggelaar *et al.*, 2009) e em ambos (Bitencourt *et al.*, 2021). Porém, há discrepância naqueles achados de neonatos (Whittaker *et al.*, 2018a). Interessantemente, DCs maturadas na presença do BCG expressaram mais IL-10 e primaram LT a secretarem IL-10 (Gagliardi, 2005; Larsen *et al.*, 2007). A IL-10, quando em conjunto à IL-2, pode também servir como um biomarcador promissor capaz de distinguir TBA de LTBI com alta sensibilidade e especificidade (Wu *et al.*, 2017).

Indivíduos que apresentam respostas imunes com elevados níveis de IFN- $\gamma$  aparentam ser também aqueles que produzem respostas imunes do tipo Th2 mais elevadas (Lalor *et al.*, 2011). Há evidências crescentes de que a IL-4 participe da resposta imune contra TB em humanos (Rook *et al.*, 2004). Essa, no entanto, se mostra mais variável que a IL-10 entre os estudos, podendo (Bitencourt *et al.*, 2021) ou não (Ponte *et al.*, 2018; Subbian *et al.*, 2020) ser induzida em adultos e neonatos pela BCG Moreau ou outras cepas. Ao contrário do suposto até o momento, a progressão da TB pode estar menos relacionada a uma diminuição da resposta imune do tipo Th1 e mais com um perfil Th2 subversivo, capaz de prejudicar as funções micobactericidas, aumentando a toxicidade mediada por TNF e a fibrose. (Rook *et al.*, 2004). A variante IL-4 $\delta$ 2 é produzida por células com perfil Th1, sendo antagonista de IL-4 (Arinobu *et al.*, 1999) e inibidora de PGE2 em MONs (Atamas *et al.*, 1996). Por ser expressa em altos níveis por tímócitos e células do lavado bronco-alveolar, é sugerido que IL-4 $\delta$ 2 possa ter algum tipo de especificidade tecidual (Atamas *et al.*, 1996; Vasiliev *et al.*, 2003), como visto em modelo de coinfeção TB-HIV (Dheda2005a). Nesse modelo, ambas, IL-4 e IL-4 $\delta$ 2, são expressas no pulmão, mas periféricamente apenas IL-4 é expressa. Em LTBI, apenas IL-4 $\delta$ 2 se mostrou com níveis elevados (Demissie *et al.*, 2004; Fletcher *et al.*, 2004).

A IL-5 estimula e ativa LB (Whiteside, 1994). Essa citocina já foi vista como possível biomarcador para diferenciar LTBI e TBA (Suzukawa *et al.*, 2016). Uma modulação positiva poderia significar uma atividade humoral elevada em resposta ao estímulo, possivelmente benéfica no controle ao Mtb (Jacobs *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016). Entretanto, a vacinação com BCG em camundongos, apesar de inibir inflamação alérgica, não foi capaz de induzir níveis de IL-5

maiores após desafio com o alérgeno (Shen *et al.*, 2008). Em outro estudo utilizando modelos transgênicos deletados para IL-4, IL-10 ou IL-5 e desafiados com o BCG, não foi demonstrada diferença na capacidade de controlar a infecção pulmonar (Erb *et al.*, 1998). Em nosso estudo atual, a vacina BCG Moreau não foi capaz de induzir *in vitro* níveis elevados de IL-5 nas duas coortes avaliada, o que corrobora com achados anteriores do nosso grupo, mesmo após estímulo de diferentes cepas dessa vacina (Ponte *et al.*, 2018). A IL-13, que pode regular negativamente TNF e IL-8, tem ação significativa na indução de moléculas de superfície em MONs e MØs (Junttila *et al.*, 2008). No presente estudo, a IL-25 foi induzida *in vitro* pela vacina BCG Moreau em adultos saudáveis. Esta citocina já havia sido mostrada estimular a produção de IL-5 e IL-13 (Fort, 2001). Contrariamente, a secreção de IL-13 induzida pela cepa Moreau não foi diferencial em ambas as coortes, fato que corrobora com nosso estudo prévio (Ponte *et al.*, 2018). De fato, PBMCs em resposta ao Mtb também não demonstraram indução significativa de IL-13 (Ameixa & Friedland, 2001), o que aponta para um papel alternativo e ainda não desvendado durante a infecção por Mtb.

Assim como IL-17 e IL-22, a IL-31 sinaliza para receptores em células na sua maioria não-imunes e que se encontram em diversos tecidos (Cornelissen *et al.*, 2012; Nemmer *et al.*, 2021). A sua expressão está associada a diversas desordens alérgicas em humanos e animais (Dillon *et al.*, 2004, Ozceker *et al.*, 2018), assim como infecções helmínticas (Perrigoue *et al.*, 2009). Neste estudo, IL-31, bem como IL-33, dosadas em adultos saudáveis, mostraram ser induzidas *in vitro* pela vacina BCG Moreau. Em modelo experimental de diabetes mellitus 2, a vacinação por BCG reduziu a expressão de IL-31 após infecção por Mtb (Radhakrishnan *et al.*, 2020). Ainda, quando células de pacientes com TB pleural foram estimuladas com antígenos de Mtb, essas tiveram uma indução de IL-31 (Gao *et al.*, 2016). Com mais evidências acumuladas, a IL-31 hipoteticamente poderia vir a ser considerada um promissor biomarcador para diagnóstico de derrame pleural de origem tuberculosa. Concomitantemente, investigações revelaram que a IL-33 também se mostra elevada naqueles pacientes (Al-aarag *et al.*, 2019; Fenhua *et al.*, 2021; Qama *et al.*, 2012). A IL-33 pode vir a ser usada para diferenciar pleurites tuberculosas, de outros derrames pleurais malignos



(Lee *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2021; Wei-Xia *et al.*, 2014). Em modelos experimentais, além de ser capaz de induzir uma forte resposta imune TCD8+ frente ao vírus da coriomeningite linfocítica (Bonilla *et al.*, 2012), a IL-33 também protegeu camundongos contra o Mtb após estímulo de ovalbumina (Pineros *et al.*, 2017). Em conjunto, o impacto da modulação desses mediadores, negativa ou positivamente, deve ser correlacionada com as suas propriedades diagnósticas para que se forme uma conclusão mais robusta.

Considerando que o G-CSF seja encontrado periféricamente em baixas concentrações, e o GM-CSF ainda menos (Panopoulos & Watowich, 2008; Ushach & Zlotnik, 2016; Wicks & Roberts, 2016), a utilização de CSFs como outro possível adjuvante vacinal, assim como já abordado para DEC-1 e IL-7, tem sido estudada com o intuito de induzir uma melhor resposta imune do tipo Th1 (Melchionda *et al.*, 2005; Triccas *et al.*, 2007). Há também a possibilidade de seu uso como indutor neutrofílico para corrigir efeitos adversos do tratamento com antibióticos na TB (Cormican *et al.*, 2004). Nossos resultados atuais demonstraram a capacidade da vacina BCG Moreau em induzir *in vitro* níveis elevados de ambos, G-CSF e GM-CSF, em neonatos saudáveis, mas não em adultos. Esses CSFs já foram estudados também em uma outra coorte de adultos saudáveis, na qual GM-CSF foi induzido pela vacina BCG Moreau, e G-CSF foi induzido pelas cepas Moreau, Pasteur e Dinamarquesa (Ponte *et al.*, 2018). De fato, o G-CSF parece ser finamente regulado *in vitro* e dependente da cepa BCG vacinal (Antas *et al.*, 2021). O GM-CSF é comprovadamente aumentado em níveis após infecção por Mtb, sendo necessário para o controle do crescimento micobacteriano em modelos experimentais de MØs murinos e humanos (Benmerzoug *et al.*, 2018; Bryson *et al.*, 2019; Mishra *et al.*, 2020; Robinson, 2017; Rothchild *et al.*, 2017). Uma combinação de IL-23 e IL-1 *in vitro* induziu aumento de GM-CSF em LT (Becher *et al.*, 2016). Apesar da vacina BCG Moreau ter induzido um aumento nos níveis de IL-23 e IL-1 $\beta$  em adultos saudáveis, isso não conferiu um aumento paralelo e expressivo dos CSFs estudados aqui.

O estímulo pelo BCG leva a uma produção de IL-17 que pode ocasionar um aumento de IL-8, o que infere um recrutamento celular mais rápido (McAleer & Kolls, 2014). Essa produção também contribui para a formação de granulomas maduros (Gopal *et al.*, 2014; Khader *et al.*, 2007) e, assim, um melhor

prognóstico da TB. No entanto, durante as LTBI e TBA, uma exacerbação de IL-8 induzida por células do perfil Th17 pode ser prejudicial, causando influxo excessivo de neutrófilos e agravando a inflamação tecidual (Pollara *et al.*, 2021; Torrado *et al.*, 2011). Porém, esse quadro pode ser regulado pela expressão de IL-4 e IL-10 (Ameixa & Friedland, 2001). Em nosso estudo atual, a vacina BCG Moreau induziu aumento dos níveis *in vitro* de IL-8 em ambas as coortes avaliadas, sendo significativamente mais expressa em neonatos quando comparada com o grupo adultos. Esses dados somam-se aos resultados anteriores de nosso grupo, nos quais as cepas Moreau, Pasteur e Dinamarquesa também induziram aumento dos níveis *in vitro* de IL-8 em adultos saudáveis (Ponte *et al.*, 2018). Interessantemente, a IL-8 também tem outros efeitos benéficos durante a infecção pelo Mtb. Já foi demonstrado que esse quimiotático se liga diretamente ao bacilo, aumentando a habilidade de MONs e MØs de fagocitá-lo e destruí-lo, além de ser a principal quimiocina responsável pelo recrutamento de TCD4+ e TCD8+ (Krupa *et al.*, 2015). Sendo assim, sua regulação positiva induzida pela vacina BCG pode indicar uma capacidade maior de resposta imune frente ao Mtb, visto que, assim como a IL-8, essa vacina induz fatores regulatórios.

Estudos pioneiros em modelos experimentais indicam que a necrose tecidual, oriunda da quebra do colágeno pulmonar, provavelmente precede o processo de cavitação (Shammari *et al.*, 2015). Esse processo patológico envolve uma abundância de MMPs, como visto em diversos modelos (Elkington *et al.*, 2011; Subbian *et al.*, 2011), correlacionando a concentração de collagenases, com a extensão de dano tecidual (Walker *et al.*, 2012). LM de diferentes espécies micobacterianas induzem a expressão de MMP9 em MØs humanos primários e THP1, além de modularem negativamente TIMP-1 (Elass *et al.*, 2005), seu maior regulador endógeno (Sundararajan *et al.*, 2012; UgarteGil *et al.*, 2013). O antígeno solúvel alvo antigênico de 6kDa secretado precocemente (ESAT-6) de Mtb também induz uma alta produção de MMP9, aumentando o recrutamento de MØs em camundongos e contribuindo para formação do granuloma, sendo essencial para a resistência à infecção micobacteriana pulmonar (Taylor *et al.*, 2006; Volkman *et al.*, 2009). A expressão gênica de todas as MMPs em MØs humanos infectados com Mtb, bem como em

pacientes com TBP, mostrou níveis basais aumentados (Elkington *et al.*, 2005). Em modelo de THP1, a vacina BCG já foi capaz de induzir a expressão de mRNA de TIMP-1 (Chen *et al.*, 2016). Porém, estudos prévios de nosso grupo com neonatos e adultos mostraram que a vacina BCG Moreau não induziu significativamente a produção de MMP9 (Simas *et al.*, 2011), ou de seu regulador TIMP-1 (MS em preparação). A modulação dessas duas moléculas induzidas *in vitro* pela vacina BCG aparenta não ser detectável no sangue periférico. Cabe ressaltar que a junção de ambas formam complexos (Grünwald *et al.*, 2019), que também podem ser alvos de estudos futuros.

Algumas quimiocinas das famílias CC, como a MIP-1 $\beta$  e MCP-1, foram dosadas *in vitro* neste estudo. A MIP-1 $\beta$  tem sua secreção aumentada por IFN- $\gamma$  e diminuída pela ação de IL-4 e IL-10 (Menten *et al.*, 2002). A MIP-1 $\beta$  pareceu ser mais produzida em resposta as cepas virulentas e avirulentas do Mtb, já tendo sido mostrada ser capaz de suprimir o crescimento micobacteriano intracelular (Saukkonen *et al.*, 2002). Já a presença de MCP-1 em concentrações adequadas, também se mostrou importante na formação de granulomas e no controle do Mtb (Deshmane *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 1998), assim como na migração de T $\gamma\delta$  (Penido *et al.*, 2003). Em contraponto ao modelo de linhagem THP1 (Monteiro-Maia *et al.*, 2018), no presente estudo a vacina BCG Moreau induziu *in vitro* um aumento de MIP-1 $\beta$  apenas em neonatos saudáveis, acrescentando aos estudos anteriores onde foi encontrado um aumento em PBMCs (Mendez-Samperio *et al.*, 2003; Ponte *et al.*, 2018). Já MCP-1 foi encontrada diminuída em adultos saudáveis, diferente do que foi visto por Ponte *et al.* (2018), que não reportou qualquer modulação. Em outros estudos com neonatos vacinados com a cepa Dinamarquesa, demonstrou-se aumento de ambos, MCP-1 e MIP-1 $\beta$ , assim como de IL-8 (Subbian *et al.*, 2020). Já um estudo com crianças imunizadas com a vacina BCG apresentou diminuição de MIP-1 $\beta$  e MCP-1 somente após re-estímulo de peptoglicanos (Freyne *et al.*, 2018). Esses são exemplos claros da ampla gama de modulação diferencial entre populações e cepas da vacina BCG, provando a necessidade de se estabelecer um modelo de comparação mais amplo e unificado no futuro.

Parece haver uma estreita relação entre a expressão de PRRs e a secreção de citocinas (Ferlazzo *et al.*, 2020; Li & Wu, 2021; Takeuchi & Akira,

2010). A sinalização por TLR4 induz a produção de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-12 (Akira, 2003; Takeda & Akira, 2004), assim como IL-27 e IFN- $\beta$ , sinergicamente (McNab *et al.*, 2015; Vignali & Kuchroo, 2012). Jian *et al.* (2019) observaram que IL-21 induziu a expressão de TLR4 e, essa expressão, foi aumentada por LPS, além de IL-21 regular positivamente a secreção de IL-6, IL-8, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10 em células de linhagem THP-1. A ativação de TLR4 também foi necessária para que houvesse uma produção de IL-17A (Happel *et al.*, 2003). Em neonatos, o engajamento dos TLRs também induzem a produção de IL-12p70, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em baixa quantidade e, moderadamente de TNF, mas sem diferença nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-23 e IL-10, comparados aos adultos (Kollmann *et al.*, 2009). Já DEC-1 também auxilia na sinalização por  $\beta$ -glucanos, o que induz a proliferação em PBMCs (Chan *et al.*, 2007), aumenta a funcionalidade e maturação de DCs (Lin *et al.*, 2005), com produção de IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Lin *et al.*, 2006). Em resposta ao Mtb (Zenaro *et al.*, 2009) e sua cepa H37Rv (Gerosa *et al.*, 2008), DEC-1 permite que moDCs promovam uma resposta imune dos tipos Th1 e Th17, com a produção de IL-1 $\beta$ , TNF, IL-23 e IL-6. A DEC-1, crucial contra infecções fúngicas na atividade de reconhecimento de micobactérias, foi vista altamente expressa na superfície de M $\phi$ s e DCs murinos infectados com *Neospora caninum* (da Silva *et al.*, 2017). Nesse modelo, o bloqueio de DEC-1 levou a um decréscimo da carga parasitária, assim como um aumento da produção de IL-12p40. Lemoine *et al.* (2015) observaram que a coativação de DEC-1 e TLRs levou moDCs de neonatos a secretarem IL-12p70, através da maior produção da subunidade IL-12p35. Em outros estudos, esses receptores foram cruciais para a indução de IL-17 após infecção por Mtb (van de Veerdonk *et al.*, 2010) e ambas, MIP-1 $\alpha$  e  $\beta$ , em resposta a vacina BCG *Connaught* (Bisiaux *et al.*, 2017). A produção de IL-23 em DCs induzida por TLR4 também é maximizada por um sinal adicional de DEC-1 (Dudakov *et al.*, 2015). A ativação de ambos receptores acontece de forma sinérgica em neonatos e adultos, aumentando a indução de Caspase-1, NF-K $\beta$  e produção de citocinas do perfil Th1, sendo esse nível de sinergia maior em neonatos, diminuindo conforme a idade (van Haren *et al.*, 2016).

Incontáveis estudos clínicos com a vacina BCG tem sido realizados ao longo do último século, muitos deles focados na segurança desta vacina

(Bannister *et al.*, 2021) ou na resposta imune conferindo proteção contra Mtb (Abubakar *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2021; Roy *et al.*, 2014). Não surpreendentemente, esses tem demonstrado dicotomias clássicas em diversos parâmetros. Em sua grande maioria, os estudos parecem ignorar as diferenças intrínsecas entre as cepas da vacina BCG, as quais já foram demonstradas serem importantes (Anderson *et al.*, 2012; Antas *et al.*, 2018; Bitencourt *et al.*, 2021; da Silva *et al.*, 2021; Ponte *et al.*, 2018; Ritz *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019). Cada um desses estudos também utiliza uma coorte com diferentes capacidades de resposta, genoma e contatos com agentes patogênicos ambientais, como nos estudos de Lalor *et al.* (2011), Anderson *et al.* (2012), Blakney *et al.* (2015), e Subbian *et al.* (2020).

Este estudo possui algumas limitações. Por conta do caráter clínico abordado, sendo esse um estudo transversal seccional realizado em momentos distintos, os universos amostrais foram variados e de tamanhos diferentes. Assim, poucas foram as amostras em comum referente aos dois tipos de abordagem nos itens 4.1 – Marcadores fenotípicos e 4.2 – Secreção de mediadores imunológicos solúveis. Dessa forma, não obtivemos um número suficiente daqueles indivíduos pareados e, por isso, não foi possível correlacionar a marcação fenotípica com a produção de citocinas. Entretanto, outros estudos correlatos, realizados em paralelo a este por nosso grupo, já apontam resultados interessantes, os quais pretendemos usar como norteador em nossa investigação vindoura. Outra limitação refere-se à quantidade de marcadores e mediadores imunológicos solúveis investigados. Certamente, teremos que ampliar a gama de possibilidades metodológicas para abarcar outros candidatos em um estudo mais robusto.

Assim, os resultados deste estudo encontrados até agora nas duas coortes avaliadas, levantam uma questão fundamental: **como a imunomodulação induzida *in vitro* pela vacina BCG Moreau sobre essas moléculas, poderia levar a uma proteção mais efetiva e duradoura?** Quais moléculas e quais níveis de combinação de citocinas seriam necessários para conferir proteção, são questões ainda não totalmente esclarecidas. Durante o curso da TB, uma resposta inflamatória do tipo Th1 parece ser crucial (Boom *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2019). Porém, se exacerbada, esse processo pode levar

ao dano tecidual, sendo necessário uma regulação refinada (Dlugovitzky *et al.*, 1997; Kidd, 2003; Orme, 2014; Wangoo *et al.*, 2001). Por outro lado, se as respostas imunes dos tipos Th2 ou Treg forem exacerbadas, não parece haver controle da infecção (de Martino *et al.*, 2019; Korbel *et al.*, 2008). Além disso, observamos que existem muitos dos componentes mediadores envolvidos na resposta imune na TB com explícita dualidade, podendo alterar o delicado balanço imunológico já abordado mais acima, facilitando ou impedindo o avanço da doença.

Até então, alguns mecanismos para a imunomodulação conferida pela vacina BCG são hipotetizados: **(1) A “imunidade treinada”**, provavelmente mediada através de reprogramação epigenética de células da imunidade inata (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012; Levy & Netea, 2013; Netea *et al.*, 2016; O'Neill & Netea, 2020; van der Meer *et al.*, 2015), ou ainda, **(2) efeitos de longo prazo**, mediados por imunidade heteróloga, podendo carrear efeitos residuais da imunidade treinada (Aspatwar *et al.*, 2021; Brook *et al.*, 2020; Escobar *et al.*, 2020; Kleinnijenhuis *et al.*, 2014, 2015; Leentjens *et al.*, 2015; Moorlag *et al.*, 2019; Morra *et al.*, 2017; Ota *et al.*, 2002; Ritz *et al.*, 2013; Rousseau *et al.*, 2015; Saadatian-Elahi *et al.*, 2016; Thoestesen *et al.*, 2017; Whittaker *et al.*, 2018).

Visto que a expressão *in vitro* da maioria dos marcadores e mediadores imunológicos solúveis avaliados neste estudo pode ser regulada de maneira diferencial pela vacina BCG Moreau e que o estágio de maturação e diferenciação celular se reflete na expressão dos mesmos, um entendimento aprofundado de sua indução pode mudar a forma como entendemos não só a TB, mas também outras doenças de cunho infeccioso e que podem se beneficiar dessa vacina pelos estudos em células humanas. Talvez ainda não haja uma resposta absoluta para qual seria a melhor indução, ou talvez, o mais importante seja apenas manter o equilíbrio daquele delicado balanço imunológico. Maiores e melhores estudos com a centenária vacina BCG devem ser elaborados na tentativa de alcançar um veredito.

## **6 – CONCLUSÕES**

A vacina BCG Moreau foi capaz de induzir in vitro um aumento significativo da expressão dos marcadores fenotípicos estudados, exceto TIM-3, nas populações de MONs de adultos saudáveis. Comparando adultos e neonatos, a expressão in vitro induzida desses marcadores demonstrou ser diferencial apenas para EP2. No entanto, um caráter diferencial de expressão constitutiva foi observado para TLR4, B7-1 e DEC-1.

A vacina BCG Moreau foi capaz de induzir in vitro uma modulação significativa dos níveis de vinte e quatro mediadores solúveis estudados, demonstrando a capacidade da mesma de estimular simultaneamente importantes respostas imunes protetivas.

## **7 – PERSPECTIVAS**

Estudos exploratórios, experimentais e observacionais sempre levantam diversas questões no intuito de responder a outras. Pretendemos expandir os experimentos, avaliando a expressão fenotípica do marcador TIM-3 no grupo dos neonatos e buscar correlações entre marcadores. Mais importante ainda, pretendemos correlacionar a expressão de marcadores fenotípicos com os padrões de citocinas apresentados, realizar uma análise de componentes principais e investigando relações intrínsecas entre a quantidade (%) de células positivas e a quantidade (MFI) de marcadores por célula, para expandir o trabalho e obter uma melhor compreensão da modulação conferida pela vacina BCG Moreau.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaby P, Kollmann TR, Benn CS. Nonspecific effects of neonatal and infant vaccination: public-health, immunological and conceptual challenges. *Nat Immunol.* 2014;15(10):895-899.
- Abbas AK, Trotta E, D RS, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol.* 2018;3(25).
- Abdalla AE, Li Q, Xie L, Xie J. Biology of IL-27 and its role in the host immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Biol Sci.* 2015;11(2):168-175.
- Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, Beynon R, Mangtani P, Sterne JA, Fine PE, Smith PG, Lipman M, Elliman D, Watson JM, Drumright LN, Whiting PF, Vynnycky E, Rodrigues LC. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis. *Health Technol Assess.* 2013;17(37):1-372, v-vi.
- Actor JK. T-Cell Immunity. In: Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology: Elsevier; 2012:25–32-25–32.
- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17(1):593-623.
- Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012;119(3):651-665.
- Ahmed A, Rakshit S, Adiga V, Dias M, Dwarkanath P, D'Souza G, Vyakarnam A. A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunol Rev.* 2021;301(1):98-121.
- Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in Biology and Medicine. *Adv Immunol: Elsevier;* 1993:1–78-71–78.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2(8):675-680.
- Akira S. Toll-like Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38105–38108-38105–38108.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
- Al-aarag A-sH, Kamel MH, Abdelgawad ER, Abo-Youssef SM, Moussa HH, Einaggar ME, Hendy RM, Diab KA. Diagnostic role of interleukin -33 in the differentiation of pleural effusions especially tuberculous and malignant effusions. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1).
- Al Shammari B, Shiomi T, Tezera L, Bielecka MK, Workman V, Sathyamoorthy T, Mauri F, Jayasinghe SN, Robertson BD, D'Armiento J, Friedland JS, Elkington PT. The Extracellular Matrix Regulates Granuloma Necrosis in Tuberculosis. *J Infect Dis.* 2015;212(3):463-473.



- Almeida FcM, Ventura TLB, Amaral EP, Ribeiro SCM, Calixto SD, Manhães MR, Rezende AL, Souzal GS, de Carvalho IS, Silva EC, da Silva JA, Carvalho ECQ, Kritski AL, Lasunskaja EB. Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. PLOS ONE. 2017;12(3):e0173715-e0173715.
- Ambrose CT. The Osler slide, a demonstration of phagocytosis from 1876 Reports of phagocytosis before Metchnikoff's 1880 paper. Cell Immunol. 2006;240(1):1-4.
- Ameixa C, Friedland JS. Down-Regulation of Interleukin-8 Secretion from Mycobacterium tuberculosis -Infected Monocytes by Interleukin-4 and -10 but Not by Interleukin-13. Infect Immun. 2001;69(4):2470–2476-2470–2476.
- Amini S, Hoffner S, Torkaman MRA, Hamzehloo G, Nasiri MJ, Salehi M, Kashkooli GS, Shahraki MS, Mohsenpoor M, Soleimanpour S, Mir R. Direct drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis using the proportional method: A multicenter study. J Glob Antimicrob Resist. 2019;17:242–244-242–244.
- Andersen P, Woodworth JS. Tuberculosis vaccines--rethinking the current paradigm. Trends Immunol. 2014;35(8):387-395.
- Anderson EJ, Webb EL, Mawa PA, Kizza M, Lyadda N, Nampijja M, Elliott AM. The influence of BCG vaccine strain on mycobacteria-specific and non-specific immune responses in a prospective cohort of infants in Uganda. Vaccine. 2012;30(12):2083-2089.
- Angelidou A, Levy O. Vaccination of Term and Preterm Infants. Neoreviews. 2020;21(12):e817-e827.
- Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, Wang YH, Chang SH, Corry DB, Liu YJ, Zhu Z, Dong C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. J Exp Med. 2007;204(7):1509-1517.
- Antas PR, Castello-Branco LR. New vaccines against tuberculosis: lessons learned from BCG immunisation in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102(7):628-630.
- Antas PRZ. Crucial requirement for standardization during the development of novel recombinant BCG vaccines: Does the corresponding substrain background matter? Hum Vaccin Immunother. 2016;12(12):3099–3102-3099–3102.
- Antas PR, Pedro TQ, Santiago EA, Lima JR, Silva FC, Melca LA, Ponte CG. Human neonates display altered ex vivo monokine production related to healthy adults. Immunol Lett. 2016;170:64-67.
- Antas PRZ, Flores-Valdez M, Shann F. An opportunity to compare the effects of BCG-Moreau and BCG-Russia in Brazil. Int J Tuberc Lung Dis. 2018;22(9):1108-1109.

- Antas PRZ, Ponte CGG, Almeida MR, Albuquerque LHP, Sousa-Vasconcelos PS, Pedro Tz, Gomes NLS, Moreira OIC, Silva FC, Castello-Branco LzRR, Pinho RT. The in vitro Mycobacterium bovis BCG Moreau infection of human monocytes that induces Caspase-1 expression, release and dependent cell death is mostly reliant upon cell integrity. *J Inflamm.* 2019;16(1).
- Antas PRZ, Silva A, Ponte CG. Technical Comment on “BCG vaccination-induced emergency granulopoiesis provides rapid protection from neonatal sepsis”. *Sci Transl Med.* 2021; eLetter URL: <https://stm.sciencemag.org/content/12/542/eaax4517>
- Antonelli LRV, Gigliotti Rothfuchs A, Gonçalves R, Roffê E, Cheever AW, Bafica A, Salazar AM, Feng CG, Sher A. Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J Clin Invest.* 2010;120:1674–1682-1674–1682.
- Appelberg R, Castro AG, Pedrosa J, Minoprio P. Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. *Immunology.* 1994;82(3):361-364.
- Arinobu Y, Atamas SP, Otsuka T, Niuro H, Yamaoka K, Mitsuyasu H, Niho Y, Hamasaki N, White B, Izuhara K. Antagonistic effects of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4delta2, on IL-4 activities in human monocytes and B cells. *Cell Immunol.* 1999;191(2):161-7.
- Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev.* 2008;223:20-38.
- Aspatwar A, Gong W, Wang S, Wu X, Parkkila S. Tuberculosis vaccine BCG: the magical effect of the old vaccine in the fight against the COVID-19 pandemic. *Int Rev Immunol.* 2021:1-14.
- Atamas SP, Choi J, Yurovsky VV, White B. An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation. *J Immunol.* 1996;156(2):435-441.
- Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 2008;14(3):275-281.
- Awomoyi AA, Marchant A, Howson JMM, McAdam KPWJ, Blackwell JM, Newport MJ. Interleukin-10, Polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and Susceptibility to Tuberculosis. *J Infect Dis.* 2002;186(12):1808–1814-1808–1814.
- Baena A, Porcelli SA. Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis. *Tissue Antigens.* 2009;74(3):189–204-189–204.

- Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992;307(1):97-101.
- Bakhru P, Sirisaengtaksin N, Soudani E, Mukherjee S, Khan A, Jagannath C. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. *Cell Immunol.* 2014;287(1):53–61-53–61.
- Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol.* 1998;161(5):2636-2641.
- Ballinger MN, Peters-Golden M, Moore BB. Impaired neonatal macrophage phagocytosis is not explained by overproduction of prostaglandin E2. *Resp Res.* 2011;12(1).
- Bannister S, Sudbury E, Villanueva P, Perrett K, Curtis N. The safety of BCG revaccination: A systematic review. *Vaccine.* 2021;39(20):2736-2745.
- Barata JT, Durum SK, Seddon B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol.* 2019;20(12):1584-1593.
- Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, Band H, Rea TH, Modlin RL. Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis. *J Infect Dis.* 1992;165(3):506-512.
- Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun.* 1993;61:3482–3489-3482–3489.
- Barreto ML, Pereira SM, Ferreira AA. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. *J Pediatr (Rio J).* 2006;82(3).
- Barrios C, Brawand P, Berney M, Brandt C, Lambert P-H, Siegrist C-A. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur J Immunol.* 1996;26(7):1489–1496-1489–1496.
- Barry CE, 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, Schnappinger D, Wilkinson RJ, Young D. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(12):845-855.
- Bartee E, McFadden G. Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. *Cytokine.* 2013;63(3):237-240.
- Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(9):1171-1184.
- Basu S, Dunn A, Ward A. G-CSF: function and modes of action (Review). *Int J Mol Med.* 2002;10(1):3-10.

- Bates M, Marais BJ, Zumla A. Tuberculosis Comorbidity with Communicable and Noncommunicable Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(11):a017889-a017889.
- Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity.* 2016;45(5):963-973.
- Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):668–674-668–674.
- Behar SM. Antigen-Specific CD8+ T Cells and Protective Immunity to Tuberculosis. *Adv Exp Med Biol.* 2013;141–163-141–163.
- Behr MA. Correlation between BCG Genomics and Protective Efficacy. *Scandinavian J Infect Dis.* 2001;33(4):249–252-249–252.
- Behr MA. BCG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis.* 2002;2(2):86-92.
- Behrends J, Renauld J-C, Ehlers S, Hölscher C. IL-22 Is Mainly Produced by IFN gamma-Secreting Cells but Is Dispensable for Host Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e57379-e57379.
- Bekele Y, Sui Y, Berzofsky JA. IL-7 in SARS-CoV-2 Infection and as a Potential Vaccine Adjuvant. *Front Immunol.* 2021;12.
- Benmerzoug S, Marinho FV, Rose S, Mackowiak C, Gosset D, Sedda D, Poisson E, Uyttenhove C, Van Snick J, Jacobs M, Garcia I, Ryffel B, Quesniaux VFJ. GM-CSF targeted immunomodulation affects host response to M. tuberculosis infection. *Sci Rep.* 2018;8(1):8652.
- Betz BE, Azad AK, Morris JD, Rajaram MVS, Schlesinger LS.  $\beta$ -Glucans inhibit intracellular growth of Mycobacterium bovis BCG but not virulent Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Microb Pathog.* 2011;51(4):233–242-233–242.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature.* 1985;316(6028):552-554.
- Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol.* 1993;64(5 Suppl):456-460.
- Bisiaux A, Boussier J, Duffy D, Quintana-Murci L, Fontes M, Albert ML. Deconvolution of the Response to Bacillus Calmette–Guérin Reveals NF-kappa B-Induced Cytokines As Autocrine Mediators of Innate Immunity. *Front Immunol.* 2017;8.
- Bitencourt J, Sarno A, Oliveira C, Souza RA, Lima CC, Takenami I, Pereira SM, Arruda S. Comparing cytokine production and clinical response following vaccination with BCG Moreau and BCG Russia strains in a Brazilian infant population. *Vaccine.* 2021;39(23):3189-3196.

- Blakney AK, Tchakoute CT, Hesseling AC, Kidzeru EB, Jones CE, Passmore JA, Sodora DL, Gray CM, Jaspan HB. Delayed BCG vaccination results in minimal alterations in T cell immunogenicity of acellular pertussis and tetanus immunizations in HIV-exposed infants. *Vaccine*. 2015;33(38):4782-4789.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):749–795-749–795.
- Boer MC, Prins C, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Ottenhoff TH, Joosten SA. Mycobacterium bovis BCG Vaccination Induces Divergent Proinflammatory or Regulatory T Cell Responses in Adults. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(7):778-788.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol*. 1994;55(2):227-233.
- Bomanji JB, Gupta N, Gulati P, Das CJ. Imaging in tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(6):a017814–a017814-a017814–a017814.
- Bombarda S, Figueiredo C, Funari MBG, Júnior JS, Seiscento M, Filho MT. Imagem em tuberculose pulmonar. *J Bras Pneumol*. 2001;27(6):329–340-329–340.
- Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med*. 2009;206(3):535–548-535–548.
- Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreuzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Löhning M, Pinschewer DD. The Alarmin Interleukin-33 Drives Protective Antiviral CD8+ T Cell Responses. *Science*. 2012;335(6071):984–989-984–989.
- Boom WH. The role of T-cell subsets in Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Agents Dis*. 1996;5(2):73-81.
- Boom WH. Gamma-delta T cells and Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect*. 1999;1(3):187–195-187–195.
- Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(1-3):98-106.
- Booty MG, Barreira-Silva P, Carpenter SM, Nunes-Alves C, Jacques MK, Stowell BL, Jayaraman P, Beamer G, Behar SM. IL-21 signaling is essential for optimal host resistance against Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci Rep*. 2016;6(1).
- Bourigault ML, Segueni N, Rose S, Court N, Vacher R, Vasseur V, Erard F, Le Bert M, Garcia I, Iwakura Y, Jacobs M, Ryffel B, Quesniaux VF.

Relative contribution of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF to the host response to Mycobacterium tuberculosis and attenuated M. bovis BCG. *Immun Inflamm Dis.* 2013;1(1):47-62.

- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Tuberculose. Brasília. 2021.
- Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995;64(1):29-63.
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):55-71.
- Brightling CE. Clinical applications of induced sputum. *Chest.* 2006;129(5):1344-1348.
- Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol.* 2004;53(2):391-403.
- Brites D, Gagneux S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunol Rev.* 2015;264(1):6–24-26–24.
- Brombacher F. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *Bioessays.* 2000;22(7):646-656.
- Brook B, Harbeson DJ, Shannon CP, Cai B, He D, Ben-Othman R, Francis F, Huang J, Varankovich N, Liu A, Bao W, Bjerregaard-Andersen M, Scholtz-Buchholzer F, Sanca L, Golding CN, Larsen KL, Levy O, Kampmann B, Consortium E, Tan R, Charles A, Wynn JL, Shann F, Aaby P, Benn CS, Tebbutt SJ, Kollmann TR, Amenyogbe N. BCG vaccination-induced emergency granulopoiesis provides rapid protection from neonatal sepsis. *Sci Transl Med.* 2020;12(542):eaax4517-eaax4517.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of  $\beta$ -Glucans. *J Exp Med.* 2003;197(9):1119–1124-1119–1124.
- Brynjolfsson SF, Bjarnarson SP, Mori E, Del Giudice G, Jonsdottir I. Concomitant administration of Mycobacterium bovis BCG with the meningococcal C conjugate vaccine to neonatal mice enhances antibody response and protective efficacy. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(11):1936-1942.
- Bryson BD, Rosebrock TR, Tafesse FG, Itoh CY, Nibasumba A, Babunovic GH, Corleis B, Martin C, Keegan C, Andrade P, Realegeno S, Kwon D, Modlin RL, Fortune SM. Heterogeneous GM-CSF signaling in macrophages is associated with control of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun.* 2019;10(1).
- Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol.* 2008;45(13):3567-3572.

- Calmette A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med.* 1931;24(11):1481-1490.
- Cambi A, Koopman M, Figdor CG. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* 2005;7(4):481–488-481–488.
- Campbell HD, Tucker WQ, Hort Y, Martinson ME, Mayo G, Clutterbuck EJ, Sanderson CJ, Young IG. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(19):6629-6633.
- Campelo TA, de Sousa PRC, de Lima Nogueira L, Frota CC, Antas PRZ. Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far? *Access Microbiology.* 2021;3(8).
- Campos C, Marchiori E, Rodrigues R. Tuberculose pulmonar: achados na tomografia computadorizada de alta resolução do tórax em pacientes com doença em atividade comprovada bacteriologicamente. *J Bras Pneumol.* 2002;28(1):23–29-23–29.
- Cardona P, Cardona PJ. Regulatory T Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front Immunol.* 2019;10:2139.
- Carranza C, Pedraza-Sanchez S, de Oyarzabal-Mendez E, Torres M. Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. *Front Immunol.* 2020;11:2006.
- Carreno BM, Collins M. The b7 Family Ofligands And its receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20(1):29–53-29–53.
- Carrol ED, Clark JE, Cant AJ. Non-pulmonary tuberculosis. *Paediatr Respir Rev.* 2001;2(2):113-119.
- Casela M, Cerqueira SMA, de Oliveira Casela T, Pereira MA, dos Santos SQ, Pozo FAD, Freire SM, Matos ED. Rapid molecular test for tuberculosis: impact of its routine use at a referral hospital. *J Bras Pneumol.* 2018;44(2):112–117-112–117.
- Castro F, Cardoso APc, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol.* 2018;9.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Kooten CV, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994;180(4):1263–1272-1263–1272.
- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 1996;184(2):747-752.
- Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* Is Influenced by Host Factors and

- Precedes the Initiation of T-Cell Immunity. *Infect Immun.* 2002;70(8):4501–4509-4501–4509.
- Chan WK, Law HK, Lin ZB, Lau YL, Chan GC. Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. *Int Immunol.* 2007;19(7):891-899.
  - Chan GC-F, Chan WK, Sze DM-Y. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol.* 2009;2(1).
  - Chao W-C, Yen C-L, Hsieh C-Y, Huang Y-F, Tseng Y-L, Nigrovic PA, Shieh C-C. Mycobacterial infection induces higher interleukin-1 $\beta$  and dysregulated lung inflammation in mice with defective leukocyte NADPH oxidase. *PLOS ONE.* 2017;12(12):e0189453-e0189453.
  - Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
  - Cheadle EJ, Selby PJ, Jackson AM. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells potently activate autologous T cells via a B7 and interleukin-12-dependent mechanism. *Immunology.* 2003;108(1):79-88.
  - Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-j, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198(12):1875–1886-1875–1886.
  - Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(5):336-347.
  - Chen M, Gan H, Remold HG. A Mechanism of Virulence: Virulent Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. *J Immunol.* 2006;176(6):3707–3716-3707–3716.
  - Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM, Serhan CN, Behar SM, Remold HG. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J Exp Med.* 2008;205(12):2791-2801.
  - Chen YC, Chen SD, Miao L, Liu ZG, Li W, Zhao ZX, Sun XJ, Jiang GX, Cheng Q. Serum levels of interleukin (IL)-18, IL-23 and IL-17 in Chinese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012;243(1-2):56-60.
  - Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene.* 2017;614:8-14.
  - Chen Y, Wang J, Ge P, Cao D, Miao B, Robertson I, Zhou X, Zhang L, Chen H, Guo A. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1, a novel biomarker of tuberculosis. *Mol Med Rep.* 2017;15(1):483-487.
  - Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins



- and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology*. 2010;130(3):418–426-418–426.
- Cheung TC, Ware CF. Tumor Necrosis Factor Receptors. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*: Elsevier; 2013:454–459-454–459.
  - Chipeta J, Komada Y, Zhang X-L, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, Sakurai M. CD4+ and CD8+Cell Cytokine Profiles in Neonates, Older Children, and Adults: Increasing T Helper Type 1 and T Cytotoxic Type 1 Cell Populations with Age. *Cell Immunol*. 1998;183(2):149–156-149–156.
  - Chizzolini C, Chicheportiche R, Alvarez M, de Rham C, Roux-Lombard P, Ferrari-Lacraz S, Dayer JM. Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood*. 2008;112(9):3696–3703.
  - Chumakov K, Avidan MS, Benn CS, Bertozzi SM, Blatt L, Chang AY, Jamison DT, Khader SA, Kottlil S, Netea MG, Sparrow A, Gallo RC. Old vaccines for new infections: Exploiting innate immunity to control COVID-19 and prevent future pandemics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(21):e2101718118.
  - Churchyard G, Kim P, Shah NS, Rustomjee R, Gandhi N, Mathema B, Dowdy D, Kasmar A, Cardenas V. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *J of Infect Dis*. 2017;216(suppl\_6):S629–S635-S629–S635.
  - Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis*. 2011;3(1):73-78.
  - Clark RA, Blakley SL, Greer D, Smith MH, Brandon W, Wisniewski TL. Hematogenous dissemination of Mycobacterium tuberculosis in patients with AIDS. *Rev Infect Dis*. 1991;13(6):1089-1092.
  - Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*. 2008;29(2):283-294.
  - Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol*. 1974;12(1):150-159.
  - Colangeli R, Gupta A, Vinhas SA, Venkata UDC, Kim S, Grady C, Jones-López EC, Soteropoulos P, Palaci M, Marques-Rodrigues Pc, Salgame P, Ellner JJ, Dietze R, Alland D. Mycobacterium tuberculosis progresses through two phases of latent infection in humans. *Nat Commun*. 2020;11(1).
  - Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*. 1994;271(9):698-702.
  - Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties,

- distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994;46:205–229-205–229.
- Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 2005;6(6):223.
  - Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet.* 2013;45(10):1176-1182.
  - Concepcion NDP, Laya BF, Andronikou S, Daltro PAN, Sanchez MO, Uy JAU, Lim TRU. Standardized radiographic interpretation of thoracic tuberculosis in children. *Pediatr Radiol.* 2017;47(10):1237-1248.
  - Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993;178(6):2243-2247.
  - Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology.* 1995;84(3):423-432.
  - Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) Is Crucial to the Development of Protective Immunity in Mice Intravenously Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 1997;186(1):39–45-39–45.
  - Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Mice Lacking Bioactive IL-12 Can Generate Protective, Antigen-Specific Cellular Responses to Mycobacterial Infection Only if the IL-12 p40 Subunit Is Present. *J Immunol.* 2002;168(3):1322–1327-1322–1327.
  - Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):393-422.
  - Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol.* 2011;4(3):252-260.
  - Cormican LJ, Schey S, Milburn HJ. G-CSF enables completion of tuberculosis therapy associated with iatrogenic neutropenia. *Eur Respir J.* 2004;23(4):649-650.
  - Cornelissen C, Lüscher-Firzlaff J, Baron JM, Lüscher B. Signaling by IL-31 and functional consequences. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(6-7):552-66.
  - Cortez-Espinosa N, García-Hernández MH, Reynaga-Hernández E, Cortés-García JD, Corral-Fernández NE, Rodríguez-Rivera JG, Bravo-Ramírez Aa, González-Amaro R, Portales-Pérez DP. Abnormal expression and function of Dectin-1 receptor in type 2 diabetes mellitus patients with poor glycemic control (HbA1c >8%). *Metabolism.* 2012;61(11):1538–1546-1538–1546.

- Coulombe F, Jaworska J, Verway M, Tzelepis F, Massoud A, Gillard J, Wong G, Kobinger G, Xing Z, Couture C, Joubert P, Fritz JH, Powell WS, Divangahi M. Targeted Prostaglandin E2 Inhibition Enhances Antiviral Immunity through Induction of Type I Interferon and Apoptosis in Macrophages. *Immunity*. 2014;40(4):554–568-554–568.
- Cousens LP, Peterson R, Hsu S, Dorner A, Altman JD, Ahmed R, Biron CA. Two Roads Diverged: Interferon alpha/beta and interleukin 12-mediated pathways in promoting T Cell Interferon gamma Responses during Viral Infection. *J Exp Med*. 1999;189(8):1315–1328-1315–1328.
- Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(6):L715-731.
- Cruz AT, Starke JR. Clinical manifestations of tuberculosis in children. *Paediatr Respir Rev*. 2007;8(2):107-117.
- Cruz A, Torrado Ed, Carmona J, Fraga AG, Costa Pc, Rodrigues F, Appelberg R, Correia-Neves M, Cooper AM, Saraiva M, Pedrosa J, Castro AG. BCG vaccination-induced long-lasting control of Mycobacterium tuberculosis correlates with the accumulation of a novel population of CD4+ IL-17+ TNF+ IL-2+ T cells. *Vaccine*. 2015;33(1):85–91-85–91.
- Cudahy P, Sheno SV. Diagnostics for pulmonary tuberculosis: Table 1. *Postgrad Med J*. 2016;92(1086):187–193-187–193.
- Curtis N. Potential role for BCG in treatment of autoimmune diseases. *BMJ*. 2016;355:i6091.
- da Silva Jr JB. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. *J Bras Pneumol*. 2004;30(suppl 1):S57–S86-S57–S86.
- da Silva MV, Ferreira Franca FB, Mota CM, de Macedo Junior AG, Ramos EL, Santiago FM, Mineo JR, Mineo TW. Dectin-1 Compromises Innate Responses and Host Resistance against Neospora caninum Infection. *Front Immunol*. 2017;8:245.
- da Silva ASM, Albuquerque LHP, de Ponte CGG, de Almeida MR, de Faria SER, da Silva Ribeiro M, da Silva Pereira ENG, Antas PRZ. Time to face the proofs: the BCG Moreau vaccine promotes superior inflammatory cytokine profile in vitro when compared with Russia, Pasteur, and Danish strains. *Hum Vaccin Immunother*. 2021 12:1-7.
- Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toossi Z. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 1996;64(2):399-405.
- Dai SY, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, Katoh S, Kontani K, Kihara M, Zhang SL, Hata T, Nakamura T, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2005;175(5):2974-2981.
- Daley D, Mani VR, Mohan N, Akkad N, Ochi A, Heindel DW, Lee KB, Zambirinis CP, Pandian GSB, Savadkar S, Torres-Hernandez A, Nayak S,

- Wang D, Hundeyin M, Diskin B, Aykut B, Werba G, Barilla RM, Rodriguez R, Chang S, Gardner L, Mahal LK, Ueberheide B, Miller G. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance. *Nat Med*. 2017;23(5):556-567.
- Dannenberg AM, Jr., Sugimoto M. Liquefaction of caseous foci in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1976;113(3):257-259.
  - Davenne T, McShane H. Why don't we have an effective tuberculosis vaccine yet? *Expert Review of Vaccines*. 2016;15(8):1009–1013-1009–1013.
  - Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013;14(10):986-995.
  - Davis MR, Zhu Z, Hansen DM, Bai Q, Fang Y. The role of IL-21 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015;358(2):107-114.
  - de-Andrade TCB, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LRR. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis - review. *Mem I Oswaldo Cruz*. 2005;100(5):459–465-459–465.
  - de Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994;36(2):185-192.
  - de Carvalho FM, Rodrigues LS, Duppre NC, Alvim IMP, Ribeiro-Alves M, Pinheiro RO, Sarno EN, Pessolani MCV, Pereira GMB. Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to *Mycobacterium leprae* specific antigens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5):e0005560-e0005560.
  - de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9):e744-e744.
  - De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Type I interferons. *Int Rev Immunol*. 1998;17(1-4):53-73.
  - de Martino M, Lodi L, Galli L, Chiappini E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. *Front Pediatr*. 2019;7:350.
  - de Oliveira Liberato IR, de Fatima P. Militão de Albuquerque M, Campelo ARL, de Melo HsRL. Characteristics of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients in a Northeastern region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(1):46–50-46–50.
  - Debock I, Flamand V. Unbalanced Neonatal CD4(+) T-Cell Immunity. *Front Immunol*. 2014;5:393.
  - del-Barrio PC, Souza-Galvão MLD, Prat-Aymerich C, Domínguez J. Impact of COVID-19 on Tuberculosis Control. *Arch Bronconeumol*. 2021;57:5–6-5–6.

- Delgado BJ, Bajaj T. Ghon Complex. [Updated 2021 Sep 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551706/>
- Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991;78(11):2791-2808.
- Demissie A, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Fletcher H, Zumla A, Weldingh K, Brock I, Andersen P, Doherty TM. Healthy Individuals That Control a Latent Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Express High Levels of Th1 Cytokines and the IL-4 Antagonist IL-4 $\delta$ 2. *J Immunol*. 2004;172(11):6938–6943.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-326.
- Desvignes L, Wolf AJ, Ernst JD. Dynamic Roles of Type I and Type II IFNs in Early Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2012;188(12):6205–6215.
- Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GA. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2005;192(7):1201-1209.
- Dheda K, Chang JS, Breen RA, Haddock JA, Lipman MC, Kim LU, Huggett JF, Johnson MA, Rook GA, Zumla A. Expression of a novel cytokine, IL-4 $\delta$ 2, in HIV and HIV-tuberculosis co-infection. *AIDS*. 2005a;19(15):1601-1606.
- Dheda K, van Zyl Smit R, Badri M, Pai M. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15(3):188–200.
- Dhiman R, Venkatasubramanian S, Paidipally P, Barnes PF, Tvinnereim A, Vankayalapati R. Interleukin 22 inhibits intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing calgranulin A expression. *J Infect Dis*. 2014;209(4):578-587.
- di Giovine FS, Duff GW. Interleukin 1: the first interleukin. *Immunol Today*. 1990;11(1):13-20.
- Di Paolo NC, Shafiani S, Day T, Papayannopoulou T, Papayannopoulou T, Russell DW, Iwakura Y, Sherman D, Urdahl K, Shayakhmetov DM. Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Immunity*. 2015;43:1125–1136.
- Dickensheets HL, Donnelly RP. Inhibition of IL-4-inducible gene expression in human monocytes by type I and type II interferons. *J Leukoc Biol*. 1999;65(3):307-312.
- Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, Lange C, Losi M, Markova R, Migliori GB, Nienhaus A, Ruhwald M, Wagner D,

- Zellweger JP, Huitric E, Sandgren A, Manissero D. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011;37(1):88-99.
- Dietzold J, Gopalakrishnan A, Salgame P. Duality of lipid mediators in host response against *Mycobacterium tuberculosis*: good cop, bad cop. *F1000Prime Rep*. 2015;7:29.
  - Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, Haugen HS, Maurer M, Harder B, Johnston J, Bort S, Mudri S, Kuijper JL, Bukowski T, Shea P, Dong DL, Dasovich M, Grant FJ, Lockwood L, Levin SD, LeCiel C, Waggle K, Day H, Topouzis S, Kramer J, Kuestner R, Chen Z, Foster D, Parrish-Novak J, Gross JA. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol*. 2004;5(7):752-760.
  - Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Mühl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol*. 1998;63:658–664-658–664.
  - Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods*. 1999;19(1):121-132.
  - Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1:S34-45.
  - Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2017;281(1):8–27-28–27.
  - Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, Fortune S, Behar SM, Remold HG. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol*. 2009;10(8):899-906.
  - Divangahi M, Desjardins D, Nunes-Alves C, Remold HG, Behar SM. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol*. 2010;11(8):751-758.
  - Dlugovitzky D, Torres-Morales A, Rateni L, Farroni MA, Largacha C, Molteni O, Bottasso O. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;18(3):203-207.
  - Dockrell HM, Smith SG. What Have We Learnt about BCG Vaccination in the Last 20 Years? *Front Immunol*. 2017;8.
  - Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5).
  - Donald PR, Diacon AH, Lange C, Demers AM, von Groote-Bidlingmaier F, Nardell E. Droplets, dust and guinea pigs: an historical review of tuberculosis transmission research, 1878-1940. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22(9):972-982.

- Donoghue HD, Lee OYC, Minnikin DE, Besra GS, Taylor JH, Spigelman M. Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2009;277(1678):51–56-51–56.
- Dorhoi A, Kaufmann SH. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. *Semin Immunol.* 2014;26(3):203-209.
- Dorhoi A, Yeremeev V, Nouailles G, Weiner J, 3rd, Jorg S, Heinemann E, Oberbeck-Muller D, Knaul JK, Vogelzang A, Reece ST, Hahnke K, Mollenkopf HJ, Brinkmann V, Kaufmann SH. Type I IFN signaling triggers immunopathology in tuberculosis-susceptible mice by modulating lung phagocyte dynamics. *Eur J Immunol.* 2014;44(8):2380-2393.
- Dorhoi A, Kaufmann SH. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. *Semin Immunopathol.* 2016;38(2):153-166.
- Drobniowski F, Cooke M, Jordan J, Casali N, Mugwagwa T, Broda A, Townsend C, Sivaramakrishnan A, Green N, Jit M, Lipman M, Lord J, White PJ, Abubakar I. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technol Assess.* 2015;19(34):1-188, vii-viii.
- Drummond RA, Brown GD. Signalling C-type lectins in antimicrobial immunity. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003417.
- Dubos R, Dubos J. *The white plague: Tuberculosis, man, and society*, 2nd ed. New Brunswick, N.J.: Rutgers University Press, 1987; *J. Hist. Behav. Sci.*, 26: 307-307.
- Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol.* 2015;33(1):747-785.
- Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Matthew MARGARET, Morley J, Howson WT. Lymphokines: Non-Antibody Mediators of Cellular Immunity generated by Lymphocyte Activation. *Nature.* 1969;224(5214):38–42-38–42.
- Dunsmore SE, Rannels DE. Extracellular matrix biology in the lung. *Am J Physiol.* 1996;270(1 Pt 1):L3-27.
- Dwivedi VP, Bhattacharya D, Chatterjee S, Prasad DVR, Chattopadhyay D, Kaer LV, Bishai WR, Das G. Mycobacterium tuberculosis Directs T Helper 2 Cell Differentiation by Inducing Interleukin-1 $\beta$  Production in Dendritic Cells. *J Biol Chem.* 2012;287(40):33656–33663-33656–33663.
- Dzodanu EG, Afrifa J, Acheampong DO, Dadzie I. Diagnostic Yield of Fluorescence and Ziehl-Neelsen Staining Techniques in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Comparative Study in a District Health Facility. *Tuberc Res Treat.* 2019;2019:4091937.
- Ehlers S. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology, *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;23(2): 149-158.

- Ehlers S, Schaible UE. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol.* 2012;3:411.
- Ehrt S, Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol.* 2009;11(8):1170-1178.
- Ellass E, Aubry L, Masson M, Denys A, Guerardel Y, Maes E, Legrand D, Mazurier J, Kremer L. Mycobacterial Lipomannan Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Macrophagic Cells through a Toll-Like Receptor 1 (TLR1)/TLR2- and CD14-Dependent Mechanism. *Infect Immun.* 2005;73(10):7064–7068-7064–7068.
- Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009;229(1):152-172.
- Elias D, Britton S, Aseffa A, Engers H, Akuffo H. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF- $\beta$  production. *Vaccine.* 2008;26(31):3897–3902-3897–3902.
- Elkington P, Shiomi T, Breen R, Nuttall RK, Ugarte-Gil CA, Walker NF, Saraiva L, Pedersen B, Mauri F, Lipman M, Edwards DR, Robertson BD, D'Armiento J, Friedland JS. MMP-1 drives immunopathology in human tuberculosis and transgenic mice. *J Clin Invest.* 2011;121(5):1827-1833.
- Elkington PTG, Nuttall RK, Boyle JJ, O’Kane CM, Horncastle DE, Edwards DR, Friedland JS. Mycobacterium tuberculosis, but Not Vaccine BCG, Specifically Upregulates Matrix Metalloproteinase-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(12):1596–1604-1596–1604.
- Elliott SR, Macardle PJ, Robertson DM, Zola H. Expression of the costimulator molecules, CD80, CD86, CD28, and CD152 on lymphocytes from neonates and young children. *Hum Immunol.* 1999;60(11):1039-1048.
- Erb KJ, Kirman J, Delahunt B, Chen W, Le Gros G. IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of *M. bovis*-BCG infection in mice. *Immunol Cell Biol.* 1998;76:41–46-41–46.
- Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1998;66(4):1277-1281.
- Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C, Krensky AM, Leippe M, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol.* 2000;165(12):7102-8.
- Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):581-591.
- Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(30):17720-17726.



- Etna MP, Giacomini E, Severa M, Coccia EM. Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. *Semin Immunol.* 2014;26(6):543-551.
- Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(10):820-832.
- Favorov M, Ali M, Tursunbayeva A, Aitmagambetova I, Kilgore P, Ismailov S, Chorba T. Comparative tuberculosis (TB) prevention effectiveness in children of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines from different sources, Kazakhstan. *PLoS One.* 2012;7(3):e32567.
- Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Bi.* 2005;21:659–693-659–693.
- Fenhua J, Daohui W, Hui L, Xiaodong X, Wen H. Diagnostic value of combined pleural interleukin-33, adenosine deaminase and peripheral blood tuberculosis T cell spot detection TB for tuberculous pleurisy. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):861.
- Fennelly KP. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. *Lancet Respir Med.* 2020;8(9):914-924.
- Ferlazzo G, Ruggeri J, Boniotti MB, Guarneri F, Barbieri I, Tonni M, Bertasio C, Alborali GL, Amadori M. In vitro Cytokine Responses to Virulent PRRS Virus Strains. *Front Vet Sci.* 2020;7:335.
- Ferreira TF, Matsuoka Pda F, Santos AM, Caldas Ade J. Diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: tuberculin test versus interferon-gamma release. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(6):724-730.
- Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouanguy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of IL-12/23- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol.* 2006;18(6):347-361.
- Fine PEM, Vynnycky E. The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g. BCG) vaccines. *Vaccine.* 1998;16(20):1923–1928-1923–1928.
- Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(4):420-426.
- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol.* 2012;7(1):61-98.
- Fletcher HA, Owiafe P, Jeffries D, Hill P, Rook GA, Zumla A, Doherty TM, Brookes RH, Vacsel Study G. Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of Mycobacterium tuberculosis, in the absence of in vitro stimulation. *Immunology.* 2004;112(4):669-673.

- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993;178(6):2249-2254.
- Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2:561–572.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):93-129.
- Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun*. 2001a;69(7):4195-4201.
- Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):271-278.
- Forster-Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, Hayde M, Prusa AR, Herkner K, Boltz-Nitulescu G, Pollak A, Spittler A. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. *Pediatr Res*. 2005;58(1):121-124.
- Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*. 2001;15(6):985-995.
- Franco LH. Papel dos leucotrienos na proteção conferida pela imunização heteróloga BCG/DNA-HSP65 contra tuberculose [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo; 2009.
- Fremont CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, Maillet I, Jacobs M, Ryffel B, Quesniaux VFJ. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2007;179:1178–1189.
- Freyne B, Donath S, Germano S, Gardiner K, Casalez D, Robins-Browne RM, Amenyogbe N, Messina NL, Netea MG, Flanagan KL, Kollmann T, Curtis N. Neonatal BCG Vaccination Influences Cytokine Responses to Toll-like Receptor Ligands and Heterologous Antigens. *J Infect Dis*. 2018;217(11):1798-1808.
- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003;362(9387):887–899.
- Friedland JS, Remick DG, Shattock R, Griffin GE. Secretion of interleukin-8 following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocyte cell lines. *Eur J Immunol*. 1992;22(6):1373–1378.
- Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 2(Suppl 2):S3.

- Gagliardi MC, Teloni R, Giannoni F, Pardini M, Sargentini V, Brunori L, Fattorini L, Nisini R. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *J Leukoc Biol.* 2005;78(1):106-113.
- Galkina E, Kondratenko I, Bologov A. Mycobacterial Infections in Primary Immunodeficiency Patients. *Adv Exp Med Biol.* 2007;75–81-75–81.
- Galli R, Starace D, Busa R, Angelini DF, Paone A, De Cesaris P, Filippini A, Sette C, Battistini L, Ziparo E, Riccioli A. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. *J Immunol.* 2010;184(12):6658-6669.
- Ganbat D, Seehase S, Richter E, Vollmer E, Reiling N, Fellenberg K, Gaede KI, Kugler C, Goldmann T. Mycobacteria infect different cell types in the human lung and cause species dependent cellular changes in infected cells. *BMC Pulm Med.* 2016;16(1):19.
- Ganesan S, Rathinam VAK, Bossaller L, Army K, Kaiser WJ, Mocarski ES, Dillon CP, Green DR, Mayadas TN, Levitz SM, Hise AG, Silverman N, Fitzgerald KA. Caspase-8 Modulates Dectin-1 and Complement Receptor 3-Driven IL-1 $\beta$  Production in Response to  $\beta$ -Glucans and the Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *J Immunol.* 2014;193(5):2519–2530-2519–2530.
- Gao X, Zhu Y, Li G, Huang H, Zhang G, Wang F, Sun J, Yang Q, Zhang X, Lu B. TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e30676-e30676.
- Gao Y, Ou Q, Wu J, Zhang B, Shen L, Chen S, Weng X, Zhang Y, Zhang W, Shao L. Potential diagnostic value of serum/pleural fluid IL-31 levels for tuberculous pleural effusion. *Sci Rep.* 2016;6(1):20607.
- Garcia SB, Perin C, Silveira MM, Vergani G, Menna-Barreto SS, Dalcin Pde T. Bacteriological analysis of induced sputum for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in the clinical practice of a general tertiary hospital. *J Bras Pneumol.* 2009;35(11):1092-1099.
- Garcia-Perez BE, Castrejon-Jimenez NS, Luna-Herrer J. The Role of Non-Phagocytic Cells in Mycobacterial Infections, Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity, Pere-Joan Cardona, IntechOpen; 2012.
- Garg N, Lee YI. Reactivation TB with severe Covid-19. *Chest.* 2020;158(4):A777-A777.
- Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, De Simone M, Pagani M, Abrignani S. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol.* 2014;5:630.
- Gengenbacher M, Kaufmann SHE. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):514–532-514–532.

- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Lyakh LA, Batoni G, Esin S, Winkler-Pickett RT, Consolaro MR, De Marchi M, Giachino D, Robbiano A, Astegiano M, Sambataro A, Kastelein RA, Carra G, Trinchieri G. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med*. 2008;205(6):1447-1461.
- Ghodbane R, Raoult D, Drancourt M. Dramatic reduction of culture time of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2014;4(1):4236.
- Giacomini E, Remoli ME, Gafa V, Pardini M, Fattorini L, Coccia EM. IFN- $\beta$  improves BCG immunogenicity by acting on DC maturation. *J Leukoc Biol*. 2008;85(3):462–468-462–468.
- Gleason MK, Lenvik TR, McCullar V, Felices M, O'Brien MS, Cooley SA, Verneris MR, Cichocki F, Holman CJ, Panoskaltsis-Mortari A, Niki T, Hirashima M, Blazar BR, Miller JS. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 2012;119(13):3064–3072-3064–3072.
- Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician*. 2005;72(9):1761-1768.
- Goldsack L, Kirman JR. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4+ T cells and protective memory against tuberculosis. *Tuberculosis*. 2007;87(6):465–473-465–473.
- Gonzalez-Perez M, Sanchez-Tarjuelo R, Shor B, Nistal-Villan E, Ochando J. The BCG Vaccine for COVID-19: First Verdict and Future Directions. *Front Immunol*. 2021;12:632478.
- Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178(5):3107-3115.
- Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, Gillis S, Cosman D, Namen AE. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(1):302-306.
- Gopal R, Lin Y, Obermajer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, Kalinski P, Khader SA. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Eur J Immunol*. 2012;42(2):364-373.
- Gopal R, Monin L, Slight S, Uche U, Blanchard E, Fallert Junecko BA, Ramos-Payan R, Stallings CL, Reinhart TA, Kolls JK, Kaushal D, Nagarajan U, Rangel-Moreno J, Khader SA. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004099.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
- Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. 2016;44(3):463-475.

- Goriely S, Vincart B, Stordeur P, Vekemans J, Willems F, Goldman M, De Wit D. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol.* 2001;166(3):2141-6.
- Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, Putz EM. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Front Immunol.* 2019;10.
- Gou X, Pan L, Tang F, Gao H, Xiao D. The association between vitamin D status and tuberculosis in children. *Medicine.* 2018;97(35):e12179-e12179.
- Graf D, Müller S, Korthäuer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol.* 1995;25(6):1749–1754-1749–1754.
- Grange JM, Gibson J, Osborn TW, Collins CH, Yates MD. What is BCG? *Tubercle.* 1983;64(2):129–139-129–139.
- Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16(1):111-135.
- Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:475.
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32(1):659-702.
- Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, Theelen B, van der Vlist M, Boekhout T, Geijtenbeek TBH. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat Immunol.* 2012;13(3):246–254-246–254.
- Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I, Ruland J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature.* 2006;442(7103):651-656.
- Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(4):317-323.
- Grünwald B, Schoeps B, Kruger A. Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends Cell Biol.* 2019;29(1):6-19.
- Gruss HJ, Dower SK. The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol Ther.* 1995;1(2):75-105.
- Gualano G, Mencarini P, Lauria FN, Palmieri F, Mfinanga S, Mwaba P, Chakaya J, Zumla A, Ippolito G. Tuberculin skin test - Outdated or still useful for Latent TB infection screening? *Int J Infect Dis.* 2019;80S:S20-S22.
- Guler R, Parihar SP, Spohn G, Johansen P, Brombacher F, Bachmann MF. Blocking IL-1 $\alpha$  but not IL-1 $\beta$  increases susceptibility to chronic

- Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Vaccine*. 2011;29:1339–1346-1339–1346.
- Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1119-1127.
  - Haaff EO, Catalona WJ, Ratliff TL. Detection of interleukin 2 in the urine of patients with superficial bladder tumors after treatment with intravesical BCG. *J Urol*. 1986;136(4):970-974.
  - Haji Abdolvahab M, Mofrad MR, Schellekens H. Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;326:343-372.
  - Hamilton CA, Mahan S, Entrican G, Hope JC. Interactions between natural killer cells and dendritic cells favour T helper1-type responses to BCG in calves. *Vet Res*. 2016;47(1).
  - Hampton HR, Chtanova T. Lymphatic Migration of Immune Cells. *Front Immunol*. 2019;10:1168.
  - Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol*. 2003;170(9):4432-4436.
  - Happel KI, Lockhart EA, Mason CM, Porretta E, Keoshkerian E, Odden AR, Nelson S, Ramsay AJ. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs. *Infect Immun*. 2005;73(9):5782-5788.
  - Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, Horiguchi S, Okamoto Y, Nakayama T, Suzuki N, Yeh W-C, Akira S, Kitamura H, Ohara O, Seino K-i, Taniguchi M. IL-21-induced Bupepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med*. 2006;203(13):2929–2937-2929–2937.
  - Harizi H, Grosset C, Gualde N. Prostaglandin E2modulates dendritic cell function via EP2and EP4receptor subtypes. *J Leukoc Biol*. 2003;73(6):756–763-756–763.
  - Harriff MJ, Purdy GE, Lewinsohn DM. Escape from the Phagosome: The Explanation for MHC-I Processing of Mycobacterial Antigens? *Front Immunol*. 2012;3:40.
  - Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, Zheng XX, Strom TB, Hafler DA, Kuchroo VK. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol*. 2009;39(9):2492–2501-2492–2501.
  - Hayes MP, Wang J, Norcross MA. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood*. 1995;86(2):646-650.

- He Y-W, Malek TR. The structure and function of gamma c-dependent cytokines and receptors: regulation of T lymphocyte development and homeostasis. *Crit Rev Immunol*. 1998;18(6):503–524-503–524.
- He R, Chen Y, Cai Q. The role of the LTB4-BLT1 axis in health and disease. *Pharmacol Res*. 2020;158:104857-104857.
- Heemskerck D, Caws M, Marais B, Farrar J. *Tuberculosis in Adults and Children*: Springer International Publishing; 2015.
- Hendrix AY, Kheradmand F. The Role of Matrix Metalloproteinases in Development, Repair, and Destruction of the Lungs. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;148:1-29.
- Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. *Immunology*. 2003;109(1):156-164.
- Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Rosas-Taraco AG, Lee EJ, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89(2):149-157.
- Hilda JN, Selvaraj A, Das SD. *Mycobacterium tuberculosis*H37Rv is more effective compared to vaccine strains in modulating neutrophil functions: an in vitro study. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66(3):372–381-372–381.
- Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Infect Dis*. 1994;170(5):1229-1237.
- Hnizdo E, Singh T, Churchyard G. Chronic pulmonary function impairment caused by initial and recurrent pulmonary tuberculosis following treatment. *Thorax*. 2000;55(1):32-38.
- Hoffmann F, Albert MH, Arenz S, Bidlingmaier C, Berkowicz N, Sedlacek S, Till H, Pawlita I, Renner ED, Weiss M, Belohradsky BH. Intracellular T-cell cytokine levels are age-dependent in healthy children and adults. *Eur Cytokine Netw*. 2005;16(4):283-288.
- Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999;10(1):41-60.
- Holscher C, Holscher A, Ruckerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T, Saris C, Ehlers S. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol*. 2005;174(6):3534-3544.
- Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(1):16-24; quiz 25.

- Holtmann H, Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften*. 1995;82(4):178-187.
- Holtmeier W, Kabelitz D. gammadelta T Cells Link Innate and Adaptive Immune Responses. *Chem Immunol Allergy*; 2005:151–183-151–183.
- Hooper JK, Eggink LL, Cote R. Stories From the Dendritic Cell Guardhouse. *Front Immunol*. 2019;10:2880.
- Hopkins SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo)*. 2003;5 Suppl 1:S45-57.
- Horne DJ, Kohli M, Zifodya JS, Schiller I, Dendukuri N, Tollefson D, Schumacher SG, Ochodo EA, Pai M, Steingart KR. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;6:CD009593.
- Hou Y, Zhu L, Tian H, Sun HX, Wang R, Zhang L, Zhao Y. IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. *Protein Cell*. 2018;9(12):1027-1038.
- Huang Y, Matsumura Y, Hatano S, Noguchi N, Murakami T, Iwakura Y, Sun X, Ohara N, Yoshikai Y. IL-21 inhibits IL-17A-producing  $\gamma\delta$  T-cell response after infection with *Bacillus Calmette-Guérin* via induction of apoptosis. *Inate Immun*. 2016;22(8):588–597-588–597.
- Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. 2018;285(16):2944–2971-2944–2971.
- Hunsawong T, Sunintaboon P, Warit S, Thaisomboonsuk B, Jarman RG, Yoon IK, Ubol S, Fernandez S. Immunogenic Properties of a BCG Adjuvanted Chitosan Nanoparticle-Based Dengue Vaccine in Human Dendritic Cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0003958.
- Hunter RL. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(6):497-509.
- Hussain R, Kaleem A, Shahid F, Dojki M, Jamil B, Mehmood H, Dawood G, Dockrell HM. Cytokine profiles using whole-blood assays can discriminate between tuberculosis patients and healthy endemic controls in a BCG-vaccinated population. *Clin Vaccine Immunol*. 2002;264(1-2):95–108-95–108.
- Huynh KK, Grinstein S. Regulation of Vacuolar pH and Its Modulation by Some Microbial Species. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(3):452–462-452–462.
- Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-195.
- Ilonidis G, Parapanisiou E, Anogeianaki A, Giavazis I, Theofilogiannakos EK, Tsekoura P, Kidonopoulou K, Trakatelli C, Polimenidis Z, Conti P, Anogianakis G. Interleukin -1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF) in plasma and pleural fluid of pneumonia, lung



- cancer and tuberculous pleuritis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2006;20(1-2):41-46.
- Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, Kinoshita T, Akira S, Yoshikai Y, Yamasaki S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med*. 2009;206(13):2879-2888.
  - Ishikawa E, Mori D, Yamasaki S. Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors. *Trends Immunol*. 2017;38(1):66-76.
  - Islam MR, Khatun R, Uddin MK, Khan MS, Rahman MT, Ahmed T, Banu S. Yield of two consecutive sputum specimens for the effective diagnosis of pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2013;8(7):e67678.
  - Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol*. 2003;4(8):733-739.
  - Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011;34(2):149-162.
  - Jacobs AJ, Mongkolsapaya J, Sreaton GR, McShane H, Wilkinson RJ. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;101:102-113.
  - Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Beladi S, Anderson AC, Dardalhon V, Hotta C, Kuchroo VK, Behar SM. Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med*. 2010;207(11):2343-2354.
  - Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Nishimura T, Anderson AC, Kuchroo VK, Remold HG, Behar SM. IL-1 $\beta$  Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and Caspase-3 Activation. *J Immunol*. 2013;190(8):4196–4204-4196–4204.
  - Jayaraman P, Jacques MK, Zhu C, Steblenko KM, Stowell BL, Madi A, Anderson AC, Kuchroo VK, Behar SM. TIM3 Mediates T Cell Exhaustion during Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS Pathog*. 2016;12(3):e1005490.
  - Jensen KJ, Larsen N, Biering-Sorensen S, Andersen A, Eriksen HB, Monteiro I, Hougaard D, Aaby P, Netea MG, Flanagan KL, Benn CS. Heterologous immunological effects of early BCG vaccination in low-birth-weight infants in Guinea-Bissau: a randomized-controlled trial. *J Infect Dis*. 2015;211(6):956-967.
  - Jian L, Sun L, Li C, Yu R, Ma Z, Wang X, Zhao J, Liu X. Interleukin-21 enhances Toll-like receptor 2/4-mediated cytokine production via phosphorylation in the STAT3, Akt and p38 MAPK signalling pathways in human monocytic THP-1 cells. *Scand J Immunol*. 2019;89(6):e12761.
  - Jiang L, Liu G, Ni W, Zhang N, Jie J, Xie F, Tai G. The Combination of MBP and BCG-Induced Dendritic Cell Maturation through TLR2/TLR4 Promotes Th1 Activation In Vitro and Vivo. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1–14-11–14.

- Jiménez-Urbe AP, Valencia-Martínez H, Carballo-Uicab G, Vallejo-Castillo L, Medina-Rivero E, Chacón-Salinas R, Pavón L, Velasco-Velázquez MA, Mellado-Sánchez G, Estrada-Parra S, Pérez-Tapia SM. CD80 Expression Correlates with IL-6 Production in THP-1-Like Macrophages Costimulated with LPS and Dialyzable Leukocyte Extract (Transferon®). *J Immunol Research*. 2019;2019:1–9-1–9.
- Jin Z, Tian Y, Yan D, Li D, Zhu X. BCG Increased Membrane Expression of TRIM59 Through the TLR2/ TLR4/IRF5 Pathway in RAW264.7 Macrophages. *Protein Pept Lett*. 2017;24(8).
- Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol*. 2007;9(5):1087-1098.
- John V, Kotze LA, Ribechini E, Walzl G, Du Plessis N, Lutz MB. Caveolin-1 Controls Vesicular TLR2 Expression, p38 Signaling and T Cell Suppression in BCG Infected Murine Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Front Immunol*. 2019;10:2826.
- Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schweneker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hycza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2008;205(12):2763-2779.
- Jost TS. Medicare peer review organizations. *Qual Assur Health Care*. 1989;1(4):235-248.
- Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, North RJ. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice. *Infect Immun*. 2002;70(11):6436-6443.
- Jung S-B, Yang C-S, Lee J-S, Shin AR, Jung S-S, Son JW, Harding CV, Kim H-J, Park J-K, Paik T-H, Song C-H, Jo E-K. The Mycobacterial 38-Kilodalton Glycolipoprotein Antigen Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and Release of Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptors 2 and 4 in Human Monocytes. *Infect Immun*. 2006;74(5):2686–2696-2686–2696.
- Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, de Souza AWS, de Melo Cruvinel W, Andrade LsEC, da Silva NP. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(5):552–580-552–580.
- Junttila IS, Mizukami K, Dickensheets H, Meier-Schellersheim M, Yamane H, Donnelly RP, Paul WE. Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gammac regulates relative cytokine sensitivity. *J Exp Med*. 2008;205(11):2595–2608-2595–2608.

- Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol.* 2018;9:888.
- Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen.* 2019;39(1):12.
- Kang DD, Lin Y, Moreno JR, Randall TD, Khader SA. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. *PLoS One.* 2011;6(1):e16161.
- Kang J, Wei ZF, Li MX, Wang JH. Modulatory effect of Tim-3/Galectin-9 axis on T-cell-mediated immunity in pulmonary tuberculosis. *J Biosci.* 2020;45.
- Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)- $\beta$ -Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages. *J Immunol.* 2010;184(11):6335–6342-6335–6342.
- Kativhu CL, Libraty DH. A Model to Explain How the Bacille Calmette Guérin (BCG) Vaccine Drives Interleukin-12 Production in Neonates. *PLOS ONE.* 2016;11(8):e0162148-e0162148.
- Kaul V, Bhattacharya D, Singh Y, Van Kaer L, Peters-Golden M, Bishai WR, Das G. An important role of prostanoid receptor EP2 in host resistance to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Infect Dis.* 2012;206(12):1816-1825.
- Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood.* 2007;110(8):2948-2954.
- Kaushansky K, O'Hara PJ, Berkner K, Segal GM, Hagen FS, Adamson JW. Genomic cloning, characterization, and multilineage growth-promoting activity of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(10):3101-3105.
- Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J Med Sci.* 2011;73(3-4):69-78.
- Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(4):414-421.
- Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 1997;65(1):298-304.
- Khader SA, Pearl JE, Sakamoto K, Gilmartin L, Bell GK, Jelley-Gibbs DM, Ghilardi N, deSavauge F, Cooper AM. IL-23 Compensates for the Absence of IL-12p70 and Is Essential for the IL-17 Response during Tuberculosis but Is Dispensable for Protection and Antigen-Specific IFN- $\gamma$  Responses if IL-12p70 Is Available. *J Immunol.* 2005;175(2):788–795-788–795.

- Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-377.
- Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine.* 2008;41(2):79-83.
- Khader SA, Guglani L, Rangel-Moreno J, Gopal R, Junecko BAF, Fountain JJ, Martino C, Pearl JE, Tighe M, Lin Y-y, Slight S, Kolls JK, Reinhart TA, Randall TD, Cooper AM. IL-23 Is Required for Long-Term Control of Mycobacterium tuberculosis and B Cell Follicle Formation in the Infected Lung. *J Immunol.* 2011;187(10):5402–5407-5402–5407.
- Khan N, Aqdas M, Vidyarthi A, Negi S, Pahari S, Agnihotri T, Agrewala JN. Triggering through NOD-2 Differentiates Bone Marrow Precursors to Dendritic Cells with Potent Bactericidal activity. *Sci Rep.* 2016;6(1).
- Khan N, Pahari S, Vidyarthi A, Aqdas M, Agrewala JN. Stimulation through CD40 and TLR-4 Is an Effective Host Directed Therapy against Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol.* 2016a;7.
- Khan N, Vidyarthi A, Pahari S, Negi S, Aqdas M, Nadeem S, Agnihotri T, Agrewala JN. Signaling through NOD-2 and TLR-4 Bolsters the T cell Priming Capability of Dendritic cells by Inducing Autophagy. *Sci Rep.* 2016b;6(1).
- Khan N, Vidyarthi A, Amir M, Mushtaq K, Agrewala JN. T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(2):133-141.
- Khayat M, Fan H, Vali Y. COVID-19 promoting the development of active tuberculosis in a patient with latent tuberculosis infection: A case report. *Respir Med Case Rep.* 2021;32:101344.
- Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity.* 2004;20(5):529-538.
- Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003;8(3):223-246.
- Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J.* 2005;25(3):564-569.
- Kim N, Luster AD. Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. *ScientificWorldJournal.* 2007;7:1307-1328.
- Kim JS, Kim WS, Choi HG, Jang B, Lee K, Park JH, Kim HJ, Cho SN, Shin SJ. Mycobacterium tuberculosis RpfB drives Th1-type T cell immunity via a TLR4-dependent activation of dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2013;94(4):733-749.

- Kim SK, Yun CH, Han SH. Dendritic Cells Differentiated from Human Umbilical Cord Blood-Derived Monocytes Exhibit Tolerogenic Characteristics. *Stem Cells Dev.* 2015;24(23):2796-807
- Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Hoshino T, Okamoto M, Kawase Y, Yokota K, Yoshino K, Takeda K, Akira S, Saito A. Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40. *J Immunol.* 2002;169(1):323-329.
- Kirby AC, Coles MC, Kaye PM. Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes. *J Immunol.* 2009;183(3):1983-1989.
- Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Crevel RV. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:1–12-11–12.
- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Ifrim DC, Saeed S, Jacobs C, van Loenhout J, de Jong D, Stunnenberg HG, Xavier RJ, van der Meer JW, van Crevel R, Netea MG. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(43):17537-17542.
- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LAB, Jacobs C, van Loenhout J, Xavier RJ, Aaby P, van der Meer JWM, van Crevel R, Netea MG. Long-Lasting Effects of BCG Vaccination on Both Heterologous Th1/Th17 Responses and Innate Trained Immunity. *Journal of Inate Immun.* 2014;6(2):152–158-152–158.
- Kleinnijenhuis J, van Crevel R, Netea MG. Trained immunity: consequences for the heterologous effects of BCG vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109(1):29-35.
- Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, Blumenschein WM, McClanahan T, Brombacher F, Hurst SD, Kastelein RA, Cua DJ. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2007;204(1):161-170.
- Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose (Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlinam 24. März gehaltenem Vortrage). *Berliner klin Wochenschr.* 1882;19:221-230.
- Koch R. An Address on Bacteriological Research. *Br Med J.* 1890;2(1546):380-383.
- Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, Blimkie D, Thommai F, Wang XY, Lavoie PM, Furlong J, Fortuno ES, Hajjar AM, Hawkins NR, Self SG, Wilson CB. Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults. *J Immunol.* 2009;183(11):7150–7160-7150–7160.
- Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21(4):467-476.

- Kolls JK, McCray PB, Jr., Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(11):829-835.
- Korbelt DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect.* 2008;10(9):995-1004.
- Korppi M, Teräsjärvi J, Lauhkonen E, Huhtala H, Nuolivirta K, He Q. Toll-like receptor 4 polymorphisms were associated with low serum pro-inflammatory cytokines in BCG osteitis survivors. *Acta Paediatrica.* 2019;109(7):1417–1422-1417–1422.
- Kraft JD, Horzempa J, Davis C, Jung J-Y, Peña MMO, Robinson CM. Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses. *Immunology.* 2013;139(4):484–493-484–493.
- Kroon EE, Coussens AK, Kinnear C, Orlova M, Moller M, Seeger A, Wilkinson RJ, Hoal EG, Schurr E. Neutrophils: Innate Effectors of TB Resistance? *Front Immunol.* 2018;9:2637.
- Krupa A, Fol M, Dziadek BR, Kepka E, Wojciechowska D, Brzostek A, Torzewska A, Dziadek J, Baughman RP, Griffith D, Kurdowska AK. Binding of CXCL8/IL-8 to Mycobacterium tuberculosis Modulates the Innate Immune Response. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1–11-11–11.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003;9(5):525-532.
- Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, Ettinger R. Essential Role of IL-21 in B Cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4+ T Cell-B Cell Collaboration. *J Immunol.* 2007;179(9):5886–5896-5886–5896.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011;30(1):16-34.
- Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T, Matsushima K. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(4):1474-1477.
- Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun.* 1997;65(11):4843-4849.
- Lalor MK, Floyd S, Gorak-Stolinska P, Ben-Smith A, Weir RE, Smith SG, Newport MJ, Blitz R, Mvula H, Branson K, McGrath N, Crampin AC, Fine PE, Dockrell HM. BCG vaccination induces different cytokine profiles following infant BCG vaccination in the UK and Malawi. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1075-1085.
- Lalor SJ, Dungan LS, Sutton CE, Basdeo SA, Fletcher JM, Mills KHG. Caspase-1-Processed Cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 Promote IL-17

- Production by gammadelta and CD4 T Cells That Mediate Autoimmunity. *J Immunol.* 2011a;186(10):5738–5748-5738–5748.
- Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol.* 2003;73(1):49-56.
  - Larsen JM, Benn CS, Fillie Y, van der Kleij D, Aaby P, Yazdanbakhsh M. BCG stimulated dendritic cells induce an interleukin-10 producing T-cell population with no T helper 1 or T helper 2 bias in vitro. *Immunology.* 2007;121(2):276–282-276–282.
  - Latoria JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol.* 2014;89(2):205-218.
  - Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(12):731-744.
  - Lazarevic V, Myers AJ, Scanga CA, Flynn JL. CD40, but Not CD40L, Is Required for the Optimal Priming of T Cells and Control of Aerosol M. tuberculosis Infection. *Immunity.* 2003;19(6):823–835-823–835.
  - Leal IS, Smedegard B, Andersen P, Appelberg R. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. *Infect Immun.* 1999;67(11):5747-5754.
  - Lee F, Yokota T, Otsuka T, Gemmell L, Larson N, Luh J, Arai K, Rennick D. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(13):4360-4364.
  - Lee SM, Suen Y, Chang L, Bruner V, Qian J, Indes J, Knoppel E, van de Ven C, Cairo MS. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. *Blood.* 1996;88(3):945-954.
  - Lee MP, Chan JW, Ng KK, Li PC. Clinical manifestations of tuberculosis in HIV-infected patients. *Respirology.* 2000;5(4):423-426.
  - Lee K-S, Kim H-R, Kwak S, Choi K-H, Cho J-H, Lee Y-J, Lee M-K, Lee J-H, Park S-D, Park D-S. Association between Elevated Pleural Interleukin-33 Levels and Tuberculous Pleurisy. *Ann Lab Med.* 2013;33(1):45–51-45–51.
  - Lee SH. Diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2015;78(2):56-63.
  - Leentjens J, Kox M, Stokman R, Gerretsen J, Diavatopoulos DA, van Crevel R, Rimmelzwaan GF, Pickkers P, Netea MG. BCG Vaccination Enhances the Immunogenicity of Subsequent Influenza Vaccination in Healthy Volunteers: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *J Infect Dis.* 2015;212(12):1930-1938.

- Leitaó JH. Microbial Virulence Factors. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5320-5320.
- Lemoine S, Jaron B, Tabka S, Ettoreiki C, Deriaud E, Zhivaki D, Le Ray C, Launay O, Majlessi L, Tissieres P, Leclerc C, Lo-Man R. Dectin-1 activation unlocks IL12A expression and reveals the TH1 potency of neonatal dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(5):1355-1368 e1351-1315.
- Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol.* 2015;17(9):1277-1285.
- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998;16(1):137-161.
- Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective Impairment of TLR-Mediated Innate Immunity in Human Newborns: Neonatal Blood Plasma Reduces Monocyte TNF- $\alpha$  Induction by Bacterial Lipopeptides, Lipopolysaccharide, and Imiquimod, but Preserves the Response to R-848. *J Immunol.* 2004;173(7):4627–4634-4627–4634.
- Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR. The Adenosine System Selectively Inhibits TLR-Mediated TNF- $\alpha$  Production in the Human Newborn. *J Immunol.* 2006;177(3):1956–1966-1956–1966.
- Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-390.
- Levy E, Xanthou G, Petrakou E, Zacharioudaki V, Tsatsanis C, Fotopoulos S, Xanthou M. Distinct roles of TLR4 and CD14 in LPS-induced inflammatory responses of neonates. *Pediatr Res.* 2009;66(2):179-184.
- Levy O, Netea MG. Innate immune memory: implications for development of pediatric immunomodulatory agents and adjuvanted vaccines. *Pediatr Res.* 2014;75(1-2):184-188.
- Li MO, Flavell RA. TGF- $\beta$ : A Master of All T Cell Trades. *Cell.* 2008;134(3):392–404-392–404.
- Li X, Murray F, Koide N, Goldstone J, Dann SM, Chen J, Bertin S, Fu G, Weinstein LS, Chen M, Corr M, Eckmann L, Insel PA, Raz E. Divergent requirement for G $\alpha$ s and cAMP in the differentiation and inflammatory profile of distinct mouse Th subsets. *J Clin Invest.* 2012;122(3):963–973-963–973.
- Li Y, Zhou M, Luo Z, Zhang Y, Cui M, Chen H, Fu ZF, Zhao L. Overexpression of Interleukin-7 Extends the Humoral Immune Response Induced by Rabies Vaccination. *J Virol.* 2017;91(7).
- Li J, Casanova JL, Puel A. Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):581-589.



- Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):291.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-2279.
- Liang L, Zhang Q, Luo LL, Yue J, Zhao YL, Han M, Liu LR, Xiao HP. Polymorphisms in the prostaglandin receptor EP2 gene confers susceptibility to tuberculosis. *Infect Genet Evol.* 2016;46:23-27.
- Liao W, Lin J-X, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):598–604-598–604.
- Libraty DH, Zhang L, Woda M, Acosta LP, Obcena A, Brion JD, Capeding RZ. Neonatal BCG vaccination is associated with enhanced T-helper 1 immune responses to heterologous infant vaccines. *Trials Vaccinol.* 2014;3:1–5-1–5.
- Lichte P, Grigoleit J-S, Steiner EM, Kullmann JS, Schedlowski M, Oberbeck R, Kobbe P. Low dose LPS does not increase TLR4 expression on monocytes in a human in vivo model. *Cytokine.* 2013;63(1):74–80-74–80.
- Lima J, Siqueira M, Pedro T, Ponte C, Peres L, Marinho S, Castello-Branco LR, Antas PRZ. The role of host soluble inflammatory mediators induced by the BCG vaccine for the initiation of in vitro monocyte apoptosis in healthy Brazilian volunteers. *J Inflamm (Lond).* 2015;12(1):60.
- Lin Y, Gong J, Zhang M, Xue W, Barnes PF. Production of monocyte chemoattractant protein 1 in tuberculosis patients. *Infect Immun.* 1998;66(5):2319-2322.
- Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1998a;66(3):1121-1126.
- Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000;127(2):117-126.
- Lin Y-L, Liang Y-C, Lee S-S, Chiang B-L. Polysaccharide purified from Ganoderma lucidum induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Leukoc Biol.* 2005;78(2):533–543-533–543.
- Lin YL, Lee SS, Hou SM, Chiang BL. Polysaccharide purified from Ganoderma lucidum induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice. *Mol Pharmacol.* 2006;70(2):637-644.
- Lin PL, Rutledge T, Green AM, Bigbee M, Fuhrman C, Klein E, Flynn JL. CD4 T Cell Depletion Exacerbates Acute Mycobacterium tuberculosis

While Reactivation of Latent Infection Is Dependent on Severity of Tissue Depletion in Cynomolgus Macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(12):1693–1702-1693–1702.

- Lin SJ, Lee YC. Effect of influenza A infection on maturation and function of neonatal monocyte-derived dendritic cells. *Viral Immunol*. 2014;27(6):277-284.
- Lin Y, Feng T, Lan J, Chen C, Qin Z, Wu Y, Shi H, Ye J, Wei C, Wang W, Huang L. Expression of Toll-like Receptor 2 and Toll-like Receptor 4 in Tuberculous Pleural Effusion. *Med Chem*. 2017;13(6):569-576.
- Lin J, Zhu Z, Xiao H, Wakefield MR, Ding VA, Bai Q, Fang Y. The role of IL-7 in Immunity and Cancer. *Anticancer Res*. 2017a;37(3):963-967.
- Liu PT, Modlin RL. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(4):371-376.
- Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF- $\beta$  signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(6):632–640-632–640.
- Liu Y, Gao LF, Liang XH, Ma CH. Role of Tim-3 in hepatitis B virus infection: An overview. *World J Gastroenterol*. 2016;22(7):2294-2303.
- Liu G, Zhai X, Zhou H, Yang X, Zhang N, Tai G, Ni W. The combination of maltose-binding protein and BCG-induced Th1 activation is involved in TLR2/9-mediated upregulation of MyD88-TRAF6 and TLR4-mediated downregulation of TRIF-TRAF3. *Cell Immunol*. 2018;325:56–63-56–63.
- Liu X, Li F, Niu H, Ma L, Chen J, Zhang Y, Peng L, Gan C, Ma X, Zhu B. IL-2 Restores T-Cell Dysfunction Induced by Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Antigen Stimulation. *Front Immunol*. 2019;10:2350.
- Liu H, Xiong X, Zhai W, Zhu T, Zhu X, Zhu Y, Peng Y, Zhang Y, Wang J, Chen H, Chen Y, Guo A. Upregulation of Cytokines and Differentiation of Th17 and Treg by Dendritic Cells: Central Role of Prostaglandin E2 Induced by *Mycobacterium bovis*. *Microorganisms*. 2020;8(2):195-195.
- Lo CY, Huang YC, Huang HY, Chung FT, Lin CW, Chung KF, Wang CH. Increased Th1 Cells with Disease Resolution of Active Pulmonary Tuberculosis in Non-Atopic Patients. *Biomedicines*. 2021;9(7):724-724.
- Lodenkemper R, Lipman M, Zumla A. Clinical Aspects of Adult Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;6(1):a017848.
- Logerot S, Figueiredo-Morgado S, Charmeteau-de-Muylder B, Sandouk A, Drillet-Dangeard AS, Bomsel M, Bourgault-Villada I, Couedel-Courteille A, Cheynier R, Rancez M. IL-7-Adjuvanted Vaginal Vaccine Elicits Strong Mucosal Immune Responses in Non-Human Primates. *Front Immunol*. 2021;12:614115.
- Lousberg EL, Fraser CK, Tovey MG, Diener KR, Hayball JD. Type I Interferons Mediate the Innate Cytokine Response to Recombinant Fowlpox Virus but Not the Induction of Plasmacytoid Dendritic Cell-

- Dependent Adaptive Immunity. *J Virol.* 2010;84(13):6549–6563-6549–6563.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145-151.
  - Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, Schoen MK, Tafesse F, Martin C, Leung V, Mahan AE, Sips M, Kumar MP, Tedesco J, Robinson H, Tkachenko E, Draghi M, Freedberg KJ, Streeck H, Suscovich TJ, Lauffenburger DA, Restrepo BI, Day C, Fortune SM, Alter G. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell.* 2016;167(2):433-443 e414.
  - Luabeya AK, Kagina BM, Tameris MD, Geldenhuys H, Hoff ST, Shi Z, Kromann I, Hatherill M, Mahomed H, Hanekom WA, Andersen P, Scriba TJ, Group HTS, Schoeman E, Krohn C, Day CL, Africa H, Makhethhe L, Smit E, Brown Y, Suliman S, Hughes EJ, Bang P, Snowden MA, McClain B, Hussey GD. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56:IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. *Vaccine.* 2015;33(33):4130-4140.
  - Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11:415-429.
  - Lukacs NW, Addison CL, Gauldie J, Graham F, Simpson K, Strieter RM, Warmington K, Chensue SW, Kunkel SL. Transgene-induced production of IL-4 alters the development and collagen expression of T helper cell 1-type pulmonary granulomas. *J Immunol.* 1997;158(9):4478-4484.
  - Lundtoft C, Afum-Adjei Awuah A, Rimpler J, Harling K, Nausch N, Kohns M, Adankwah E, Lang F, Olbrich L, Mayatepek E, Owusu-Dabo E, Jacobsen M. Aberrant plasma IL-7 and soluble IL-7 receptor levels indicate impaired T-cell response to IL-7 in human tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2017;13(6):e1006425.
  - Luo Y, Zheng SG. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front Immunol.* 2016;7:604.
  - Luo J, Zhang M, Yan B, Zhang K, Chen M, Deng S. Imbalance of Th17 and Treg in peripheral blood mononuclear cells of active tuberculosis patients. *Braz J Infect Dis.* 2017;21(2):155-161.
  - Lupton SD, Gimpel S, Jerzy R, Brunton LL, Hjerrild KA, Cosman D, Goodwin RG. Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol.* 1990;144(9):3592-3601.
  - Ly A, Liu J. Mycobacterial Virulence Factors: Surface-Exposed Lipids and Secreted Proteins. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):3985-3985.
  - Lyadova IV, Panteleev AV. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:854507.

- Lynch K, Farrell M. Cerebral tuberculoma in a patient receiving anti-TNF alpha (adalimumab) treatment. *Clin Rheumatol*. 2010;29(10):1201-1204.
- MacEwan DJ. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British J Pharmacol*. 2002;135(4):855–875-855–875.
- Maciel ELN, de Aguiar Brotto LD, Sales CMM, Zandonade E, Sant'Anna CC. Coleta de lavado gástrico para diagnóstico de tuberculose pulmonar infantil: revisão sistemática. *Rev Saude Publica*. 2010;44(4):735–742-735–742.
- Madkour MM. Miliary/Disseminated Tuberculosis. *Tuberculosis: Springer Berlin Heidelberg*; 2004:273–300-273–300.
- Maeurer MJ, Trinder P, Hommel G, Walter W, Freitag K, Atkins D, Storkel S. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*. 2000;68(5):2962-2970.
- Mahla RS, Reddy MC, Prasad DV, Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol*. 2013;4:248.
- Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, Freedman VH, Kaplan G. Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5752–5757-5752–5757.
- Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, Barry C, Kaplan G. Hypervirulent M. tuberculosis W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(11):694-701.
- Manickam A, Sivanandham M. Mycobacterium bovis BCG and purified protein derivative-induced reduction in the CD80 expression and the antigen up-take function of dendritic cells from patients with cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;159(2):413-417.
- Mansouri D, Adimi P, Mirsaeidi M, Mansouri N, Khalilzadeh S, Masjedi MR, Adimi P, Tabarsi P, Naderi M, Filipe-Santos O, Vogt G, de Beaucoudrey L, Bustamante J, Chapgier A, Feinberg J, Velayati AA, Casanova J-L. Inherited disorders of the IL-12-IFN- $\gamma$  axis in patients with disseminated BCG infection. *Eur J Pediatr*. 2005;164(12):753–757-753–757.
- Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Starke JR, Hesselning AC, Donald PR, Beyers N. A proposed radiological classification of childhood intra-thoracic tuberculosis. *Pediatr Radiol*. 2004;34(11):886-894.
- Marakalala MJ, Graham LM, Brown GD. The Role of Syk/CARD9-Coupled C-Type Lectin Receptors in Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infections. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:1–9-1–9.
- Marakalala MJ, Ndlovu H. Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. *PLoS Pathog*. 2017;13(6):e1006333.

- Markowitz CE. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology*. 2007;68(24 Suppl 4):S8-11.
- Marodi L, Kaposzta R, Nemes E. Survival of group B streptococcus type III in mononuclear phagocytes: differential regulation of bacterial killing in cord macrophages by human recombinant gamma interferon and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun*. 2000;68(4):2167-2170.
- Marshall HD, Ray JP, Laidlaw BJ, Zhang N, Gawande D, Staron MM, Craft J, Kaech SM. The transforming growth factor beta signaling pathway is critical for the formation of CD4 T follicular helper cells and isotype-switched antibody responses in the lung mucosa. *eLife*. 2015;4.
- Martinez-Sanchez ME, Huerta L, Alvarez-Buylla ER, Luján CV. Role of Cytokine Combinations on CD4+ T Cell Differentiation, Partial Polarization, and Plasticity: Continuous Network Modeling Approach. *Front Physiol*. 2018;9.
- Martinez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Infect Dis*. 2013;207(8):1253-1261.
- Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.
- Massague J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(10):616-630.
- Matsumiya M, Satti I, Chomka A, Harris SA, Stockdale L, Meyer J, Fletcher HA, McShane H. Gene expression and cytokine profile correlate with mycobacterial growth in a human BCG challenge model. *J Infect Dis*. 2015;211(9):1499-1509.
- Matthews K, Wilkinson KA, Kalsdorf B, Roberts T, Diacon A, Walzl G, Wolske J, Ntsekhe M, Syed F, Russell J, Mayosi BM, Dawson R, Dheda K, Wilkinson RJ, Hanekom WA, Scriba TJ. Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2011;91:587–593-587–593.
- Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, Cheever A, Kugler D, Hieny S, Caspar P, Núñez G, Schlueter D, Flavell RA, Sutterwala FS, Sher A. Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 $\beta$  Production Is Critical for Host Resistance to Mycobacterium tuberculosis and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. *J Immunol*. 2010;184(7):3326–3330-3326–3330.
- Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, Caspar P, Oland S, Gordon S, Sher A. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunity*. 2011;35(6):1023-1034.
- Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, Amaral EP, Barber DL, Gonzales J, Derrick SC, Shi R, Kumar NP, Wei W, Yuan X, Zhang G, Cai

- Y, Babu S, Catalfamo M, Salazar AM, Via LE, Barry CE, 3rd, Sher A. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*. 2014;511(7507):99-103.
- Mayer-Barber KD, Barber DL. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015:a018424-a018424.
  - McAleer JP, Kolls JK. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol Rev*. 2014;260(1):129-144.
  - McCartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor beta : a matter of life and death. *J Leukoc Biol*. 1994;55(3):401–409-401–409.
  - McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019;50(4):892-906.
  - McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3735–3739-3735–3739.
  - McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):87-103.
  - McShane H. Tuberculosis vaccines: beyond bacille Calmette-Guerin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366(1579):2782-2789.
  - Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1999;163(7):3920-3927.
  - Meghji J, Simpson H, Squire SB, Mortimer K. A Systematic Review of the Prevalence and Pattern of Imaging Defined Post-TB Lung Disease. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161176.
  - Melchionda F, Fry TJ, Milliron MJ, McKirdy MA, Tagaya Y, Mackall CL. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1177–1187-1177–1187.
  - Mendez-Samperio P, Hernandez-Garay M, Vazquez AN. Inhibition of *Mycobacterium bovis* BCG-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion in Human Cells by Transforming Growth Factor beta. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5(4):588–591-588–591.
  - Mendez-Samperio P, Vazquez A, Ayala H. Infection of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG induces production of CC-chemokines. *J Infect*. 2003;47(2):139-147.
  - Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(6):455-481.

- Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(1):15-21.
- Meraviglia S, Daker SE, Dieli F, Martini F, Martino A. gamma delta T Cells Cross-Link Innate and Adaptive Immunity in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:1–11-11–11.
- Mihret A. The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence.* 2012;3(7):654–659-654–659.
- Milburn HJ. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2001;7(3):133-141.
- Miller WT, Miller WT, Jr. Tuberculosis in the normal host: radiological findings. *Semin Roentgenol.* 1993;28(2):109-118.
- Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, Minty C, Casellas P, Loison G, Lupker J, Shire D, Ferrara P, Caput D. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature.* 1993;362(6417):248–250-248–250.
- Mishra BB, Rathinam VAK, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Sasseti CM. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 beta. *Nat Immunol.* 2012;14(1):52–60-52–60.
- Mishra A, Surolia A. Mycobacterium tuberculosis: Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host. *IUBMB Life.* 2018;70(9):917-925.
- Mishra A, Singh VK, Actor JK, Hunter RL, Jagannath C, Subbian S, Khan A. GM-CSF Dependent Differential Control of Mycobacterium tuberculosis Infection in Human and Mouse Macrophages: Is Macrophage Source of GM-CSF Critical to Tuberculosis Immunity? *Front Immunol.* 2020;11.
- Miyake Y, Toyonaga K, Mori D, Kakuta S, Hoshino Y, Oyamada A, Yamada H, Ono K-i, Suyama M, Iwakura Y, Yoshikai Y, Yamasaki S. C-type Lectin MCL Is an FcR gamma-Coupled Receptor that Mediates the Adjuvanticity of Mycobacterial Cord Factor. *Immunity.* 2013;38(5):1050–1062-1050–1062.
- Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-273, Table of Contents.
- Mogue T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Exp Med.* 2001;193(3):271-280.
- Mohammed KA, Nasreen N, Ward MJ, Mubarak KK, Rodriguez-Panadero F, Antony VB. Mycobacterium-mediated chemokine expression in pleural mesothelial cells: role of C-C chemokines in tuberculous pleurisy. *J Infect Dis.* 1998;178(5):1450-1456.

- Monin L, Griffiths KL, Slight S, Lin Y, Rangel-Moreno J, Khader SA. Immune requirements for protective Th17 recall responses to Mycobacterium tuberculosis challenge. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):1099-1109.
- Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA, Freeman GJ, Kuchroo VK. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature.* 2002;415(6871):536-541.
- Monteiro-Maia R, Correa PR, da Silva Sousa-Vasconcelos P, de Pinho RT, Mendonça-Lima L. Gain of function in Mycobacterium bovis BCG Moreau due to loss of a transcriptional repressor. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(11).
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11(1):165-190.
- Moorlag S, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(12):1473-1478.
- Moreno C, Taverne J, Mehlert A, Bate CA, Brealey RJ, Meager A, Rook GA, Playfair JH. Lipoarabinomannan from Mycobacterium tuberculosis induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1989;76(2):240-245.
- Moreno S, Blázquez R, Novoa A, Carpena I, Menasalvas A, Ramírez C, Guerrero C. The Effect of BCG Vaccination on Tuberculin Reactivity and the Booster Effect Among Hospital Employees. *Arch Intern Med.* 2001;161(14):1760-1760.
- Moreno JR, Garcia IE, de la Luz Garcia Hernandez M, Leon DA, Marquez R, Pando RH. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 2002;106(2):257–266-257–266.
- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(5):a021873-a021873.
- Morra ME, Kien ND, Elmaraezy A, Abdelaziz OAM, Elsayed AL, Halhouli O, Montasr AM, Vu TL, Ho C, Foly AS, Phi AP, Abdullah WM, Mikhail M, Milne E, Hirayama K, Huy NT. Early vaccination protects against childhood leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):15986.
- Morris MC, Surendran N. Neonatal Vaccination: Challenges and Intervention Strategies. *Neonatology.* 2016;109(3):161-169.
- Mortaz E, Adcock IM, Tabarsi P, Masjedi MR, Mansouri D, Velayati AA, Casanova JL, Barnes PJ. Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. *J Clin Immunol.* 2015;35(1):1-10.



- Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Nair SK, Thomas EK, Morse MA, Lyerly HK. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. *Blood*. 2000;96(10):3499-3504.
- Murdaca G, Greco M, Tonacci A, Negrini S, Borro M, Puppo F, Gangemi S. IL-33/IL-31 Axis in Immune-Mediated and Allergic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5856-5856.
- Muthukkumar S, Goldstein J, Stein KE. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. *J Immunol*. 2000;165(9):4803-13.
- Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*. 1986;319(6052):415-418.
- Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development. *Int Immunol*. 2011;23(11):661-668.
- Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood*. 2009;113(16):3821-3830.
- Namakula R, de Bree LCJ, Tvedt THA, Netea MG, Cose S, Hanevik K. Monocytes from neonates and adults have a similar capacity to adapt their cytokine production after previous exposure to BCG and  $\beta$ -glucan. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229287-e0229287.
- Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Exp Med*. 2011;208(11):2251–2262-2251–2262.
- Naqvi KF, Endsley JJ. Myeloid C-Type Lectin Receptors in Tuberculosis and HIV Immunity: Insights Into Co-infection? *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10.
- Narasimhan P, Wood J, Macintyre CR, Mathai D. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med*. 2013;2013:828939.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1193-1226.
- Nassif PW, Rosa AP, Gurgel AC, Campanerut PA, Fillus Neto J, Cardoso RF. Cutaneous tuberculosis with nonreactive PPD skin test: a diagnostic challenge. *An Bras Dermatol*. 2015;90(1):128-130.
- Nemmer JM, Kuchner M, Datsi A, Oláh P, Julia V, Raap U, Homey B. Interleukin-31 Signaling Bridges the Gap Between Immune Cells, the Nervous System and Epithelial Tissues. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:639097.

- Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):aaf1098.
- Nguipdop-Djomo P, Haldal E, Rodrigues LC, Abubakar I, Mangtani P. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: a retrospective population-based cohort study. *Lancet*. 2016;16(2):219–226-219–226.
- Nicas M, Nazaroff WW, Hubbard A. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. *J Occup Environ Hyg*. 2005;2(3):143-154.
- Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 2016;60(3):275-301.
- Niki T, Fujita K, Rosen H, Hirashima M, Masaki T, Hattori T, Hoshino K. Plasma Galectin-9 Concentrations in Normal and Diseased Condition. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(5):1856-1868.
- Nore KG, Jorgensen MJ, Dyrhol-Riise AM, Jennum S, Tonby K. Elevated Levels of Anti-Inflammatory Eicosanoids and Monocyte Heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease. *Front Immunol*. 2020;11:579849.
- North RJ. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 1998;113(1):55-58.
- Novikov A, Cardone M, Thompson R, Shenderov K, Kirschman KD, Mayer-Barber KD, Myers TG, Rabin RL, Trinchieri G, Sher A, Feng CG. Mycobacterium tuberculosis Triggers Host Type I IFN Signaling To Regulate IL-1 $\beta$  Production in Human Macrophages. *J Immunol*. 2011;187(5):2540–2547-2540–2547.
- Nurwidya F, Handayani D, Burhan E, Yunus F. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam Med J*. 2018;54(1):1-9.
- O'Donnell MA, Luo Y, Chen X, Szilvasi A, Hunter SE, Clinton SK. Role of IL-12 in the induction and potentiation of IFN- $\gamma$  in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*. 1999;163(8):4246-4252.
- O'Kane CM, Boyle JJ, Horncastle DE, Elkington PT, Friedland JS. Monocyte-Dependent Fibroblast CXCL8 Secretion Occurs in Tuberculosis and Limits Survival of Mycobacteria within Macrophages. *J Immunol*. 2007;178(6):3767–3776-3767–3776.
- O'Leary S, O'Sullivan MP, Keane J. IL-10 Blocks Phagosome Maturation in Mycobacterium tuberculosis–Infected Human Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(1):172–180-172–180.
- O'Neill LAJ, Netea MG. BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):335–337-335–337.

- O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1995;76 Suppl 1:1-46.
- Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. Development of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis.* 1999;79(4):243-250.
- Ogwang S, Mubiri P, Bark CM, Joloba ML, Boom WH, Johnson JL. Incubation time of Mycobacterium tuberculosis complex sputum cultures in BACTEC MGIT 960: 4weeks of negative culture is enough for physicians to consider alternative diagnoses. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83(2):162–164-162–164.
- Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature.* 1995;378(6552):88–91-88–91.
- Olaru ID, Heyckendorf J, Grossmann S, Lange C. Time to culture positivity and sputum smear microscopy during tuberculosis therapy. *PLoS One.* 2014;9(8):e106075.
- Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* 1985;230(4726):630-632.
- Ong CW, Elkington PT, Friedland JS. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(1):9-18.
- Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117(4):1162-1172.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M-r, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y-J, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity.* 2000;13(5):715–725-715–725.
- Orme IM. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2014;94(1):8-14.
- Osei ET, Brandsma CA, Timens W, Heijink IH, Hackett TL. Current perspectives on the role of interleukin-1 signalling in the pathogenesis of asthma and COPD. *Eur Respir J.* 2020;55(2):1900563.
- Ota MOC, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M, Newport MJ, Aaby P, Whittle H, Lambert P-H, McAdam KPWJ, Siegrist C-A, Marchant A. Influence of Mycobacteriumbovis Bacillus Calmette-Guérin on Antibody and Cytokine Responses to Human Neonatal Vaccination. *J Immunol.* 2002;168(2):919–925-919–925.

- Ottenhoff TH, Dass RH, Yang N, Zhang MM, Wong HE, Sahiratmadja E, Khor CC, Alisjahbana B, van Crevel R, Marzuki S, Seielstad M, van de Vosse E, Hibberd ML. Genome-wide expression profiling identifies type 1 interferon response pathways in active tuberculosis. *PLoS One*. 2012;7(9):e45839.
- Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR, Cua DJ, Goldschmidt M, Hunter CA, Kastelein RA, Artis D. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2006;203(4):843-849.
- Ozceker D, Bulut M, Ozbay AC, Dilek F, Koser M, Tamay Z, Guler N. Assessment of IL-31 levels and disease severity in children with atopic dermatitis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018;46(4):322-325.
- Pahari S, Kaur G, Aqdas M, Negi S, Chatterjee D, Bashir H, Singh S, Agrewala JN. Bolstering Immunity through Pattern Recognition Receptors: A Unique Approach to Control Tuberculosis. *Front Immunol*. 2017;8.
- Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008;149(3):177-184.
- Palendira U, Kamath AT, Feng CG, Martin E, Chaplin PJ, Triccas JA, Britton WJ. Coexpression of interleukin-12 chains by a self-splicing vector increases the protective cellular immune response of DNA and Mycobacterium bovis BCG vaccines against Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 2002;70(4):1949-1956.
- Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine*. 2008;42(3):277-288.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell A-M, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12Rbeta1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *J Immunol*. 2002;168(11):5699-5708.
- Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol*. 2006;119(3):229-240.
- Parry CM. Sputum smear negative pulmonary tuberculosis. *Trop Doct*. 1993;23(4):145-146.
- Pasipanodya JG, Miller TL, Vecino M, Munguia G, Garmon R, Bae S, Drewyer G, Weis SE. Pulmonary impairment after tuberculosis. *Chest*. 2007;131(6):1817-1824.

- Pastor-Fernandez G, Mariblanca IR, Navarro MN. Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. *Cells*. 2020;9(9):2044-2044.
- Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*. 1991;77(9):1859-1870.
- Pawlowski A, Jansson M, Skold M, Rottenberg ME, Kallenius G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002464.
- Pearl JE, Khader SA, Solache A, Gilmartin L, Ghilardi N, deSavauge F, Cooper AM. IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice. *J Immunol*. 2004;173(12):7490-7496.
- Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front Immunol*. 2017;8:84.
- Pellegrini M, Calzascia T, Elford AR, Shahinian A, Lin AE, Dissanayake D, Dhanji S, Nguyen LT, Gronski MA, Morre M, Assouline B, Lahl K, Sparwasser T, Ohashi PS, Mak TW. Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nat Med*. 2009;15(5):528-536.
- Penido C, de-Abreu AV, Bozza MT, Faria-Neto HCC, Bozza PcT. Role of Monocyte Chemotactic Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 on gamma delta T Lymphocyte Trafficking during Inflammation Induced by Lipopolysaccharide or Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin. *J Immunol*. 2003;171(12):6788–6794-6788–6794.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 1984;312(5996):724-729.
- Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. *Rev Saude Publica*. 2007;41(suppl 1):59–66-59–66.
- Perrigoue JG, Zaph C, Guild K, Du Y, Artis D. IL-31-IL-31R interactions limit the magnitude of Th2 cytokine-dependent immunity and inflammation following intestinal helminth infection. *J Immunol*. 2009;182(10):6088-6094.
- Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(7):529-536.
- Peters-Golden M, Henderson WR, Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med*. 2007;357(18):1841-1854.
- Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol*. 2012;7(1):353-384.
- Pineros AR, Campos LW, Fonseca DM, Bertolini TB, Gembre AF, Prado RQ, Alves-Filho JC, Ramos SG, Russo M, Bonato VL. M2 macrophages

or IL-33 treatment attenuate ongoing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci Rep.* 2017;7(1):41240.

- Plotkin SA, Gilbert PB. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. *Clin Infect Dis.* 2012;54(11):1615-1617.
- Pokkali S, Das SD, R L. Expression of CXC and CC type of chemokines and its receptors in tuberculous and non-tuberculous effusions. *Cytokine.* 2008;41(3):307-314.
- Polese B, Gridelet V, Araklioti E, Martens H, dHauterive SP, Geenen V. The Endocrine Milieu and CD4 T-Lymphocyte Polarization during Pregnancy. *Front Endocrinol.* 2014;5.
- Pollara G, Turner CT, Rosenheim J, Chandran A, Bell LCK, Khan A, Patel A, Peralta LF, Folino A, Akarca A, Venturini C, Baker T, Ecker S, Ricciardolo FLM, Marafioti T, Ugarte-Gil C, Moore DAJ, Chain BM, Tomlinson GS, Noursadeghi M. Exaggerated IL-17A activity in human in vivo recall responses discriminates active tuberculosis from latent infection and cured disease. *Sci Transl Med.* 2021;13(592):eabg7673-eabg7673.
- Poloso NJ, Urquhart P, Nicolaou A, Wang J, Woodward DF. PGE2 differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage (EP2/EP4). *Mol Immunol.* 2013;54(3-4):284-295.
- Polycarpou A, Holland MJ, Karageorgiou I, Eddaoudi A, Walker SL, Willcocks S, Lockwood DN. *Mycobacterium leprae* Activates Toll-Like Receptor-4 Signaling and Expression on Macrophages Depending on Previous Bacillus Calmette-Guerin Vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:72.
- Ponte C, Peres L, Marinho S, Lima J, Siqueira M, Pedro T, De Luca P, Cascabulho C, Castello-Branco LR, Antas PR. In vitro T-cell profile induced by BCG Moreau in healthy Brazilian volunteers. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(2):450-457.
- Ponte C, Hacker M, Moraes M, Castello-Branco L, Silva F, Antas P. The patterns of in vitro cell-death and inflammatory cytokines induced by distinct BCG vaccine strains are differentially induced in human mononuclear cells. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(1):28-35.
- Pourakbari B, Sadeghi RH, Mahmoudi S, Parvaneh N, Valian SK, Mamishi S. Evaluation of interleukin-12 receptor beta1 and interferon gamma receptor 1 deficiency in patients with disseminated BCG infection. *Allergol Immunopathol.* 2019;47(1):38–42-38–42.
- Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Loh R, Holt PG. Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants. *Clin Exp Allergy.* 1998;28 Suppl 5:39-44; discussion 50-31.

- Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol.* 2014;5:180.
- Qama D, Choi W-I, Kwon KY. Immune responses in the lungs of patients with tuberculous pleural effusion without pulmonary tuberculosis. *BMC Immunol.* 2012;13(1).
- Qiu Y, Chen J, Liao H, Zhang Y, Wang H, Li S, Luo Y, Fang D, Li G, Zhou B, Shen L, Chen CY, Huang D, Cai J, Cao K, Jiang L, Zeng G, Chen ZW. Tim-3-Expressing CD4+ and CD8+ T Cells in Human Tuberculosis (TB) Exhibit Polarized Effector Memory Phenotypes and Stronger Anti-TB Effector Functions. *PLoS Pathogens.* 2012;8(11):e1002984-e1002984.
- Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun.* 2001;69(9):5661-5670.
- Rabahi MF, da Silva Júnior JLR, Ferreira ACG, Tannus-Silva DGS, Conde MB. Tuberculosis treatment. *J Bras Pneumol.* 2017;43(6):472–486-472–486.
- Radhakrishnan RK, Thandi RS, Tripathi D, Paidipally P, McAllister MK, Mulik S, Samten B, Vankayalapati R. BCG vaccination reduces the mortality of Mycobacterium tuberculosis-infected type 2 diabetes mellitus mice. *JCI Insight.* 2020;5(5).
- Rael EL, Lockey RF. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *World Allergy Organ J.* 2011;4(3):54-64.
- Rai PK, Chodiseti SB, Nadeem S, Maurya SK, Gowthaman U, Zeng W, Janmeja AK, Jackson DC, Agrewala JN. A novel therapeutic strategy of lipidated promiscuous peptide against Mycobacterium tuberculosis by eliciting Th1 and Th17 immunity of host. *Sci Rep.* 2016;6(1):23917.
- Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):352-366.
- Ramos JM, Robledano C, Masia M, Belda S, Padilla S, Rodriguez JC, Gutierrez F. Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: a comparison of QuantiFERON-TB Gold In Tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. *BMC Infect Dis.* 2012;12(1):169.
- Ravimohan S, Kornfeld H, Weissman D, Bisson GP. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. *Eur Respir Rev.* 2018;27(147):170077-170077.
- Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal Immunol.* 2011;4(3):261-270.
- Redondo AC, Ceccon ME, Silveira-Lessa AL, Quinello C, Palmeira P, Carvalho WB, Carneiro-Sampaio M. TLR-2 and TLR-4 expression in monocytes of newborns with late-onset sepsis. *J Pediatr (Rio J).* 2014;90(5):472-478.

- Reece ST, Kaufmann SHE. Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(1):63–70-63–70.
- Reechaipichitkul W, Phetsuriyawong A, Chaimanee P, Ananta P. Diagnostic Test of Sputum Genexpert Mtb/Rif for Smear Negative Pulmonary Tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2016;47(3):457-466.
- Reid DM, Gow NA, Brown GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):30-37.
- Reiling N, Ehlers S, Holscher C. MyDths and un-TOLled truths: sensor, instructive and effector immunity to tuberculosis. *Immunol Lett.* 2008;116(1):15-23.
- Renneson J, Dutta B, Goriely S, Danis B, Lecomte S, Laes JF, Tabi Z, Goldman M, Marchant A. IL-12 and type I IFN response of neonatal myeloid DC to human CMV infection. *Eur J Immunol.* 2009;39(10):2789-99.
- Repasy T, Lee J, Marino S, Martinez N, Kirschner DE, Hendricks G, Baker S, Wilson AA, Kotton DN, Kornfeld H. Intracellular bacillary burden reflects a burst size for Mycobacterium tuberculosis in vivo. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):e1003190.
- Rethi B, Fluor C, Atlas A, Krzyzowska M, Mowafi F, Grützmeier S, Milito AD, Bellocco R, Falk KI, Rajnavölgyi É, Chiodi F. Loss of IL-7R $\alpha$  is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. *AIDS.* 2005;19(18):2077–2086-2077–2086.
- Reynolds J, Moyes RB, Breakwell DP. Differential staining of bacteria: acid fast stain. *Curr Protoc Microbiol.* 2009;Appendix 3(1):Appendix 3H.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):986-1000.
- Richardus R, van Hooij A, van den Eeden SJF, Wilson L, Alam K, Richardus JH, Geluk A. BCG and Adverse Events in the Context of Leprosy. *Front Immunol.* 2018;9.
- Ritz N, Dutta B, Donath S, Casalaz D, Connell TG, Tebruegge M, Robins-Browne R, Hanekom WA, Britton WJ, Curtis N. The influence of bacille Calmette-Guerin vaccine strain on the immune response against tuberculosis: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(2):213-222.
- Ritz N, Mui M, Balloch A, Curtis N. Non-specific effect of Bacille Calmette-Guerin vaccine on the immune response to routine immunisations. *Vaccine.* 2013;31(30):3098-3103.
- Ritz N, Casalaz D, Donath S, Tebruegge M, Dutta B, Connell TG, Robins-Browne R, Britton WJ, Hanekom WA, Curtis N. Comparable CD4 and CD8 T cell responses and cytokine release after at-birth and delayed BCG



- immunisation in infants born in Australia. *Vaccine*. 2016;34(35):4132-4139.
- Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). *Growth Factors*. 1993;8(1):1-9.
  - Robinson RT. T Cell Production of GM-CSF Protects the Host during Experimental Tuberculosis. *mBio*. 2017;8(6).
  - Roderfeld M, Graf J, Giese B, Salguero-Palacios R, Tschuschner A, Müller-Newen G, Roeb E. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol Chem*. 2007;388(11).
  - Rodero MP, Poupel L, Loyher PL, Hamon P, Licata F, Pessel C, Hume DA, Combadiere C, Boissonnas A. Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *Elife*. 2015;4:e07847.
  - Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*. 2005;22(4):507-517.
  - Romagnani S. T Cell Subpopulations. *History of Allergy: S. KARGER AG; Chem Immunol Allergy*. Epub May 2014:155–164-155–164.
  - Romano M, Dsouza S, Adnet P, Laali R, Jurion F, Palfliet K, Huygen K. Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. *Vaccine*. 2006;24(16):3353–3364-3353–3364.
  - Rook GA, Hernandez-Pando R, Dheda K, Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol*. 2004;25(9):483-488.
  - Rook GA. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med*. 2007;7(3):327-337.
  - Rothchild AC, Jayaraman P, Nunes-Alves C, Behar SM. iNKT cell production of GM-CSF controls *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2014;10(1):e1003805.
  - Rothchild AC, Stowell B, Goyal G, Nunes-Alves C, Yang Q, Papavinasundaram K, Sasseti CM, Dranoff G, Chen X, Lee J, Behar SM. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production by T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *mBio*. 2017;8(5).
  - Rothfuchs AG, Bafica A, Feng CG, Egen JG, Williams DL, Brown GD, Sher A. Dectin-1 Interaction with *Mycobacterium tuberculosis* Leads to Enhanced IL-12p40 Production by Splenic Dendritic Cells. *J Immunol*. 2007;179(6):3463–3471-3463–3471.

- Rousseau MC, El-Zein M, Conus F, Legault L, Parent ME. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Vaccination in Infancy and Risk of Childhood Diabetes. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2016;30(2):141-148.
- Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, Snell L, Mangtani P, Adetifa I, Lalvani A, Abubakar I. Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2014;349:g4643.
- Ryndak MB, Laal S. Mycobacterium tuberculosis Primary Infection and Dissemination: A Critical Role for Alveolar Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:299.
- Saadatian-Elahi M, Aaby P, Shann F, Netea MG, Levy O, Louis J, Picot V, Greenberg M, Warren W. Heterologous vaccine effects. *Vaccine.* 2016;34(34):3923-3930.
- Saba TM. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. *Arch Intern Med.* 1970;126(6):1031-1052.
- Sada-Ovalle I, Ocaña-Guzman R, Pérez-Patrigión S, Chávez-Galán L, Sierra-Madero J, Torre-Bouscoulet L, Addo MM. Tim-3 blocking rescue macrophage and T cell function against Mycobacterium tuberculosis infection in HIV+ patients. *J Int AIDS Soc.* 2015;18(1):20078-20078.
- Saenz SA, Siracusa MC, Perrigoue JG, Spencer SP, Jr JFU, Tocker JE, Budelsky AL, Kleinschek MA, Kastelein RA, Kambayashi T, Bhandoola A, Artis D. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes TH2 cytokine responses. *Nature.* 2010;464(7293):1362–1366-1362–1366.
- Saha P, Sharma P, Singh B, Verma C. Role of CXCR3+CCR5+ Th1 cells in pulmonary tuberculosis patients: At pathogenic site. *Biomed Biotechnol Res.* 2019;3(2):80-80.
- Sahin F, Yildiz P. Mediastinal tuberculous lymphadenitis presenting as a mediastinal mass with Dysphagia: a case report. *Iran J Radiol.* 2011;8:107–111-107–111.
- Said B, Charlie L, Getachew E, Wanjiru CL, Abebe M, Manyazewal T. Molecular bacterial load assay versus culture for monitoring treatment response in adults with tuberculosis. *SAGE Open Med.* 2021;9:20503121211033470.
- Sakhno LV, Tikhonova MA, Ostanin AA, Nikonov SD, Zhdanov OA, Chernykh ER. [Interleukin-2 in the correction of T-cell anergy in patients with pulmonary tuberculosis]. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2006(1):48-52.
- Samantha V, Bernadeta D, Max R. Vaccination. Published online at OurWorldInData.org. Disponible em: 'https://ourworldindata.org/vaccination'. 2013.

- Samra Z, Kaufman L, Bechor J, Bahar J. Comparative study of three culture systems for optimal recovery of mycobacteria from different clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19(10):750-754.
- Samstein M, Schreiber HA, Leiner IM, Sušac B, Glickman MS, Pamer EG. Essential yet limited role for CCR2+ inflammatory monocytes during Mycobacterium tuberculosis-specific T cell priming. *eLife*. 2013;2.
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987;237(4819):1171-1176.
- Sangsayunh P, Chuchothawon C. Genotype MTBDR plus (Hain) test in suspected MDR-TB patients. *J Med Assoc Thai*. 2014;97(10):1028-1032.
- Saraav I, Singh S, Pandey K, Sharma M, Sharma S. Mycobacterium tuberculosis MymA is a TLR2 agonist that activate macrophages and a T H 1 response. *Tuberculosis*. 2017;106:16–24-16–24.
- Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-181.
- Sasindran SJ, Torrelles JB. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Front Microbiol*. 2011;2.
- Sasson SC, Zaunders JJ, Zanetti G, King EM, Merlin KM, Smith DE, Stanley KK, Cooper DA, Kelleher AD. Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2006;193(4):505-514.
- Sastre B, del Pozo V. Role of PGE2 in asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:645383.
- Sato K, Tomioka H, Shimizu T, Gonda T, Ota F, Sano C. Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines. *J Infect Dis*. 2002;185(8):1139-1147.
- Saukkonen JJ, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H.  $\beta$ -Chemokines Are Induced by Mycobacterium tuberculosis and Inhibit Its Growth. *Infect Immun*. 2002;70(4):1684–1693-1684–1693.
- Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(2):103-111.
- Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, Flynn JL. Depletion of Cd4+ T Cells Causes Reactivation of Murine Persistent Tuberculosis despite Continued Expression of Interferon gamma and Nitric Oxide Synthase 2. *J Exp Med*. 2000;192(3):347–358-347–358.
- Schäfer G, Jacobs M, Wilkinson RJ, Brown GD. Non-Opsonic Recognition of lessgreaterMycobacterium tuberculosisless/igreater by Phagocytes. *Journal of Inate Immun*. 2008;1(3):231–243-231–243.

- Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SHE. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med.* 2003;9(8):1039–1046.
- Schauf V, Rom WN, Smith KA, Sampaio EP, Meyn PA, Tramontana JM, Cohn ZA, Kaplan G. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients. *J Infect Dis.* 1993;168(4):1056-1059.
- Schlesinger LS, Kaufman TM, Iyer S, Hull SR, Marchiando LK. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol.* 1996;157(10):4568-4575.
- Schneider BE, Korbel D, Hagens K, Koch M, Raupach B, Enders J, Kaufmann SH, Mittrucker HW, Schaible UE. A role for IL-18 in protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* 2010;40(2):396-405.
- Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(1):4-43.
- Schreibelt G, Klinkenberg LJJ, Cruz LJ, Tacke PJ, Tel J, Kreutz M, Adema GJ, Brown GD, Figdor CG, de Vries IJM. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood.* 2012;119(10):2284–2292.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-189.
- Schultz C, Temming P, Bucsky P, Gopel W, Strunk T, Hartel C. Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol.* 2004;135(1):130-136.
- Seddon JA, Paton J, Nademi Z, Keane D, Williams B, Williams A, Welch SB, Liebeschütz S, Riddell A, Bernatoniene J, Patel S, Martinez-Alier N, McMaster P, Kampmann B. The impact of BCG vaccination on tuberculin skin test responses in children is age dependent: evidence to be considered when screening children for tuberculosis infection. *Thorax.* 2016;71(10):932–939.
- Segueni N, Tritto E, Bourigault M-L, Rose S, Erard F, Bert ML, Jacobs M, Padova FD, Stiehl DP, Moulin P, Brees D, Chibout S-D, Ryffel B, Kammüller M, Quesniaux VF. Controlled *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice under treatment with anti-IL-17A or IL-17F antibodies, in contrast to TNF $\alpha$  neutralization. *Sci Rep.* 2016;6(1).
- Segueni N, Jacobs M, Ryffel B. Innate type 1 immune response, but not IL-17 cells control tuberculosis infection. *Biomed J.* 2021;44(2):165–171.

- Sehgal PB, May LT, Tamm I, Vilcek J. Human beta 2 interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science*. 1987;235(4790):731-732.
- Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal*. 2017;15(1):23.
- Seiscento M, Conde MB, Dalcolmo MMP. Tuberculose pleural. *J Bras Pneumol*. 2006;32(suppl 4):S174–S181-S174–S181.
- Sen D, Jones SM, Oswald EM, Pinkard H, Corbin K, Krummel MF. Tracking the Spatial and Functional Gradient of Monocyte-To-Macrophage Differentiation in Inflamed Lung. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165064.
- Seong S-S, Choi C-B, Woo J-H, Bae KW, Joung C-L, Uhm W-S, Kim T-H, Jun J-B, Yoo D-H, Lee J-T, Bae S-C. Incidence of tuberculosis in Korean patients with rheumatoid arthritis (RA): effects of RA itself and of tumor necrosis factor blockers. *J Rheumatol*. 2007;34:706–711-706–711.
- Shafiani S, Dinh C, Ertelt JM, Moguche AO, Siddiqui I, Smigiel KS, Sharma P, Campbell DJ, Way SS, Urdahl KB. Pathogen-specific Treg cells expand early during mycobacterium tuberculosis infection but are later eliminated in response to Interleukin-12. *Immunity*. 2013;38(6):1261-1270.
- Shamaa OR, Mitra S, Gavrillin MA, Wewers MD. Monocyte Caspase-1 Is Released in a Stable, Active High Molecular Weight Complex Distinct from the Unstable Cell Lysate-Activated Caspase-1. *PLOS ONE*. 2015;10(11):e0142203-e0142203.
- Shann F. Substantial benefits from finding the most effective BCG strain. *Lancet Respir Med*. 2016;4(7):e35-e35.
- Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):116-126.
- Shaw TC, Thomas LH, Friedland JS. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by human monocytic cells. *Cytokine*. 2000;12(5):483-486.
- She YX, Yu QY, Tang XX. Role of interleukins in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Cell Death Discov*. 2021;7(1):52.
- Sheen P, O'Kane CM, Chaudhary K, Tovar M, Santillan C, Sosa J, Caviedes L, Gilman RH, Stamp G, Friedland JS. High MMP-9 activity characterises pleural tuberculosis correlating with granuloma formation. *Eur Respir J*. 2009;33(1):134-141.
- Shen Y. Adaptive Immune Response of Vgamma 2Vdelta 2+ T Cells During Mycobacterial Infections. *Science*. 2002;295(5563):2255–2258-2255–2258.
- Shen H, Huang H, Wang J, Ye S, Li W, Wang K, Zhang G, Wang P. Neonatal vaccination with Bacillus Calmette-Guerin elicits long-term protection in mouse-allergic responses. *Allergy*. 2008;63(5):555-563.

- Shen H, Chen ZW. The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in *M. tuberculosis* infection. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(3):216-225.
- Sher A, Flynn JL. Sterilizing immunity: New opportunities for rational TB vaccine design. *J Exp Med*. 2021;218(7).
- Shi R, Sugawar I. Pathophysiology of Tuberculosis, Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management, Bassam H. Mahboub and Mayank G. Vats, IntechOpen; 2013.
- Shi XY, Yi FS, Qiao X, Pei XB, Dong SF. Diagnostic accuracy of interleukin-33 for tuberculous pleural effusion: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(31):e26755.
- Shiloh MU. Mechanisms of mycobacterial transmission: how does *Mycobacterium tuberculosis* enter and escape from the human host. *Future Microbiol*. 2016;11(12):1503–1506-1503–1506.
- Sia JK, Bizzell E, Madan-Lala R, Rengarajan J. Engaging the CD40-CD40L pathway augments T-helper cell responses and improves control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS Pathog*. 2017;13(8):e1006530.
- Siawaya JFD, Roberts T, Babb C, Black G, Golakai HJ, Stanley K, Bapela NB, Hoal E, Parida S, van Helden P, Walzl G. An Evaluation of Commercial Fluorescent Bead-Based Luminex Cytokine Assays. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2535-e2535.
- Siawaya JFD, Beyers N, van Helden P, Walzl G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(1):69–77-69–77.
- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Health Care Infection Control Practices Advisory C. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control*. 2007;35(10 Suppl 2):S65-164.
- Silva DR, Muñoz-Torrico M, Duarte R, Galvão T, Bonini EH, Arbex FF, Arbex MA, Augusto VM, Rabahi MF, de Queiroz Mello FC. Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs. *J Bras Pneumol*. 2018;44(2):145–152-145–152.
- Silva A, Ponte C, Antas PRZ. What a difference a strain makes! *Int J Tuberc Lung Dis*. 2019;23(7):874.
- Silva S, Santos-Silva A, da Costa JMC, Vale N. Potent cationic antimicrobial peptides against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019a;19:132-135.
- Simas CJ, Silva DP, Ponte CG, Castello-Branco LR, Antas PR. Patterns of in vitro cell-death, metaloproteinase-9 and pro-inflammatory cytokines in human monocytes induced by the BCG vaccine, Moreau strain. *Vaccine*. 2011;29(38):6446-6450.

- Singh V, Gowthaman U, Jain S, Parihar P, Banskar S, Gupta P, Gupta UD, Agrewala JN. Coadministration of interleukins 7 and 15 with bacille Calmette-Guérin mounts enduring T cell memory response against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2010;202(3):480-9.
- Siqueira RC, Oréface F. The potential of the IGRA (Interferon Gamma Release Assay) test for the diagnosis of ocular tuberculosis . Review and comparative analysis with the tuberculosis skin test. *Rev Bras Oftalmol*. 2019;78(3).
- Skoura E, Zumla A, Bomanji J. Imaging in tuberculosis. *Int J Infect Dis*. 2015;32:87-93.
- Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 1988;240(4856):1169-1176.
- Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, van Soolingen D, Hewinson RG, Smith JM. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol*. 2006;239(2):220-225.
- Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(7):537-544.
- Smith SG, Kleinnijenhuis J, Netea MG, Dockrell HM. Whole Blood Profiling of *Bacillus Calmette-Guérin*-Induced Trained Innate Immunity in Infants Identifies Epidermal Growth Factor, IL-6, Platelet-Derived Growth Factor-AB/BB, and Natural Killer Cell Activation. *Front Immunol*. 2017;8:644.
- Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, Harbacheuski R, Murray RA, Gelderbloem SJ, Hawkridge A, Hussey GD, Maecker H, Kaplan G, Hanekom WA. *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. *J Immunol*. 2008;180(5):3569-3577.
- Sodenkamp J, Waetzig GH, Scheller J, Seegert D, Grötzinger J, Rose-John S, Ehlers S, Hölscher C. Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. *Immunobiology*. 2012;217(10):996–1004-1996–1004.
- Sorigi CA, Soares EM, Rosada RS, Bitencourt CS, Zoccal KF, Pereira PAT, Fontanari C, Brandão Ir, Masson AP, Ramos SG, Silva CL, Frantz FG, Faccioli LH. Eicosanoid pathway on host resistance and inflammation during *Mycobacterium tuberculosis* infection is comprised by LTB4 reduction but not PGE2 increment. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(3):165574-165574.
- Sotgiu G, Migliori GB. Long-term protectiveness of BCG. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):140-142.
- Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(5):379-395.
- Sporn MB, Roberts AB. Autocrine secretion--10 years later. *Ann Intern Med*. 1992;117(5):408-414.

- Springett VH, Sutherland I. A re-examination of the variations in the efficacy of BCG vaccination against tuberculosis in clinical trials. *Tuber Lung Dis.* 1994;75(3):227-233.
- Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol.* 2001;167(8):4137-4140.
- Stead WW, Kerby GR, Schlueter DP, Jordahl CW. The clinical spectrum of primary tuberculosis in adults. Confusion with reinfection in the pathogenesis of chronic tuberculosis. *Ann Intern Med.* 1968;68(4):731-745.
- Stenson W, Aranda C, Bevelacqua FA. Transbronchial biopsy culture in pulmonary tuberculosis. *Chest.* 1983;83(6):883-884.
- Stevceva L, Moniuszko M, Ferrari MG. Utilizing IL-12, IL-15 and IL-7 as Mucosal Vaccine Adjuvants. *Lett Drug Des Discov.* 2006;3(8):586–592-586–592.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006;7(9):937-945.
- Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, Hunter CA. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1363-1371.
- Subbian S, Tsenova L, Yang G, O'Brien P, Parsons S, Peixoto B, Taylor L, Fallows D, Kaplan G. Chronic pulmonary cavitary tuberculosis in rabbits: a failed host immune response. *Open Biol.* 2011;1(4):110016.
- Subbian S, Singh P, Kolloli A, Nemes E, Scriba T, Hanekom WA, Kaplan G. BCG Vaccination of Infants Confers Mycobacterium tuberculosis Strain-Specific Immune Responses by Leukocytes. *ACS Infect Dis.* 2020;6(12):3141-3146.
- Subramonian A, Severn M. Rapid Testing for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis and Rifampicin Resistance: A Review of Cost-Effectiveness. 2021.
- Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, Mizuno S, Takeda K, Akira S. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect Immun.* 1999;67(5):2585-2589.
- Sugawara I, Yamada H, Mizuno S, Takeda K, Akira S. Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice. *Microbiol Immunol.* 2003;47(11):841-847.



- Sugitharini V, Pavani K, Prema A, Berla Thangam E. TLR-mediated inflammatory response to neonatal pathogens and co-infection in neonatal immune cells. *Cytokine*. 2014;69(2):211-217.
- Sun R, Yang X, Sun EL, Han RF. TLR4 expression of human PBMC treated by BCG and its role of immune activation. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. *Cell Mol Immunol*. 2011;27(9):945-948.
- Sun Q, Wei W, Sha W. Potential Role for Mycobacterium tuberculosis Specific IL-2 and IFN- $\gamma$  Responses in Discriminating between Latent Infection and Active Disease after Long-Term Stimulation. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0166501-e0166501.
- Sundararajan S, Babu S, Das SD. Comparison of localized versus systemic levels of Matrix metalloproteinases (MMPs), its tissue inhibitors (TIMPs) and cytokines in tuberculous and non-tuberculous pleuritis patients. *Hum Immunol*. 2012;73(10):985-991.
- Sundararajan S, Muniyan R. Latent tuberculosis: interaction of virulence factors in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Biol Rep*. 2021;48(8):6181-6196.
- Surcel HM, Troye-Blomberg M, Paulie S, Andersson G, Moreno C, Pasvol G, Ivanyi J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology*. 1994;81(2):171-176.
- Surenaud M, Manier C, Richert L, Thiebaut R, Levy Y, Hue S, Lacabaratz C. Optimization and evaluation of Luminex performance with supernatants of antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *BMC Immunol*. 2016;17(1):44.
- Sutton CE, Mielke LA, Mills KHG. IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol*. 2012;42(9):2221–2231-2221–2231.
- Suzukawa M, Akashi S, Nagai H, Nagase H, Nakamura H, Matsui H, Hebisawa A, Ohta K. Combined Analysis of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-1RA and MCP-1 in QFT Supernatant Is Useful for Distinguishing Active Tuberculosis from Latent Infection. *PLOS ONE*. 2016;11(4):e0152483-e0152483.
- Swain SL. T-Cell Subsets: Who does the polarizing? *Curr Biol*. 1995;5(8):849–851-849–851.
- Swain SL. Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. *J Exp Med*. 2001;194(3):F11-14.
- Szpakowski P, Biet F, Locht C, Paszkiewicz M, Rudnicka W, Druszczyńska M, Allain F, Fol M, Pestel J, Kowalewicz-Kulbat M. Dendritic Cell Activity Driven by Recombinant Mycobacterium bovis BCG Producing Human IL-18, in Healthy BCG Vaccinated Adults. *J Immunol Research*. 2015;2015:1–13-11–13.
- Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011;87(8):463-485.

- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
- Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review. *J Adv Res*. 2018;11:33-41.
- Tamada Y, Kanda S, Yoshidome A, Hayashi I, Miyake M, Nishiyama T. Diagnosis of active tuberculosis using MPB64, a specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol*. 2012;56(11):740–747-740–747.
- Tameris M, Hokey DA, Nduba V, Sacarlal J, Laher F, Kiringa G, Gondo K, Lazarus EM, Gray GE, Nachman S, Mahomed H, Downing K, Abel B, Scriba TJ, McClain JB, Pau MG, Hendriks J, Dheenadhayalan V, Ishmukhamedov S, Luabeya AK, Geldenhuys H, Shepherd B, Blatner G, Cardenas V, Walker R, Hanekom WA, Sadoff J, Douoguih M, Barker L, Hatherill M. A double-blind, randomised, placebo-controlled, dose-finding trial of the novel tuberculosis vaccine AERAS-402, an adenovirus-vectored fusion protein, in healthy, BCG-vaccinated infants. *Vaccine*. 2015;33(25):2944-2954.
- Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, Surh CD. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8732–8737-8732–8737.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295.
- Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN- $\gamma$  receptors. *Allergy*. 1999;54(12):1233-1251.
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SYC. The  $\beta$ -Glucan Receptor, Dectin-1, Is Predominantly Expressed on the Surface of Cells of the Monocyte/Macrophage and Neutrophil Lineages. *J Immunol*. 2002;169(7):3876–3882-3876–3882.
- Taylor JL, Hattle JM, Dreitz SA, Troudt JM, Izzo LS, Basaraba RJ, Orme IM, Matrisian LM, Izzo AA. Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2006;74(11):6135-6144.
- Taylor AW. Review of the activation of TGF- $\beta$  in immunity. *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):29-33.
- Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100 Suppl 1(suppl 1):137-144.
- Thompson A, Orr SJ. Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. *Cytokine*. 2018;111:398-407.

- Thøstesen LM, Kjaergaard J, Pihl GT, Birk NM, Nissen TN, Aaby P, Jensen AKG, Olesen AW, Stensballe LG, Jeppesen DL, Benn CS, Kofoed PE. Neonatal BCG vaccination and atopic dermatitis before 13 months of age: A randomized clinical trial. *Allergy*. 2017;73(2):498–504-498–504.
- Tian X, Tian X, Huo R, Chang Q, Zheng G, Du Y, Chen Y, Niu B. Bacillus Calmette-Guerin alleviates airway inflammation and remodeling by preventing TGF- $\beta$  1 induced epithelial-mesenchymal transition. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(8):1758–1764-1758–1764.
- Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PLoS One*. 2011;6(4):e17601.
- Tobin DM, Vary JC, Jr., Ray JP, Walsh GS, Dunstan SJ, Bang ND, Hagge DA, Khadge S, King MC, Hawn TR, Moens CB, Ramakrishnan L. The *Ita4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans. *Cell*. 2010;140(5):717-730.
- Tobin DM, Ramakrishnan L. TB: the Yin and Yang of lipid mediators. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(4):641-645.
- Tomita Y, Watanabe E, Shimizu M, Negishi Y, Kondo Y, Takahashi H. Induction of tumor-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes from naïve human T cells by using Mycobacterium-derived mycolic acid and lipoarabinomannan-stimulated dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(10):1605–1619-1605–1619.
- Tong ZH, Shi HZ. Subpopulations of helper T lymphocytes in tuberculous pleurisy. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93(3):279-284.
- Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF- $\beta$  by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF- $\beta$  in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol*. 1995;154(1):465-473.
- Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(6):455-462.
- Torrado E, Robinson RT, Cooper AM. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol*. 2011;32(2):66-72.
- Torrelles JB, Schlesinger LS. Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90(2):84-93.
- Travar M, Petkovic M, Verhaz A. Type I, II, and III Interferons: Regulating Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(1):19-31.
- Triccas JA, Shklovskaya E, Spratt J, Ryan AA, Palendira U, Fazekas de St Groth B, Britton WJ. Effects of DNA- and Mycobacterium bovis BCG-based delivery of the Flt3 ligand on protective immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 2007;75(11):5368-5375.

- Trifiro S, Bourgault AM, Lebel F, Rene P. Ghost mycobacteria on Gram stain. *J Clin Microbiol.* 1990;28(1):146-147.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today.* 1993;14(7):335-338.
- Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 2005;23(1):975-1028.
- Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet.* 2006;367(9517):1173-1180.
- Tsafaras GP, Ntontsi P, Xanthou G. Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Front Pediatr.* 2020;8:5.
- Tsao TCY, Hong J, Huang C, Yang P, Liao SK, Chang KSS. Increased TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis.* 1999;79(5):279–285-279–285.
- Tsuchiya T, Chida K, Suda T, Schneeberger EE, Nakamura H. Dendritic cell involvement in pulmonary granuloma formation elicited by bacillus calmette-guerin in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(12):1640-1646.
- Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH. CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immunol.* 1995;154(4):1786-1796.
- Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, Mellman I. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science.* 2000;288(5465):522-527.
- Turner RD, Bothamley GH. Cough and the transmission of tuberculosis. *J Infect Dis.* 2015;211(9):1367-1372.
- Twomey JJ, Douglass CC, Sharkey O, Jr. The monocytopenia of aplastic anemia. *Blood.* 1973;41(2):187-195.
- Ufimtseva E, Ereemeeva N, Bayborodin S, Umpeleva T, Vakhrusheva D, Skorniyakov S. Mycobacterium tuberculosis with different virulence reside within intact phagosomes and inhibit phagolysosomal biogenesis in alveolar macrophages of patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 2019;114:77–90-77–90.
- Ugarte-Gil CA, Elkington P, Gilman RH, Coronel J, Tezera LB, Bernabe-Ortiz A, Gotuzzo E, Friedland JS, Moore DA. Induced sputum MMP-1, -3 & -8 concentrations during treatment of tuberculosis. *PLoS One.* 2013;8(4):e61333.

- Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*. 2007;178(6):3786-3796.
- Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14459-14463.
- Upadhyay S, Mittal E, Philips JA. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathog Dis*. 2018;76(4).
- Uribe-Querol E, Rosales C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunol*. 2017;8:1368.
- Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*. 2016;100(3):481-489.
- Vaitaitis GM, Wagner DH. Galectin-9 Controls CD40 Signaling through a Tim-3 Independent Mechanism and Redirects the Cytokine Profile of Pathogenic T Cells in Autoimmunity. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e38708-e38708.
- van de Veerdonk FL, Teirlinck AC, Kleinnijenhuis J, Kullberg BJ, van Crevel R, van der Meer JWM, Joosten LAB, Netea MG. *Mycobacterium tuberculosis* induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):227–232-227–232.
- van den Biggelaar AHJ, Prescott SL, Roponen M, Nadal-Sims MA, Devitt CJ, Phuanukoonnon S, Pomat W, Tulic MK, Lehmann D, Siba PM, Richmond PC, Holt PG. Neonatal innate cytokine responses to BCG controlling T-cell development vary between populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):544–550.e542-544–550.e542.
- van der Meer JW, Joosten LA, Riksen N, Netea MG. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol Immunol*. 2015;68(1):40-44.
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129(7):1287-1298.
- van Haren SD, Dowling DJ, Foppen W, Christensen D, Andersen P, Reed SG, Hershberg RM, Baden LR, Levy O. Age-Specific Adjuvant Synergy: Dual TLR7/8 and Mincle Activation of Human Newborn Dendritic Cells Enables Th1 Polarization. *J Immunol*. 2016;197(11):4413-4424.
- van Klingeren B, Dessens-Kroon M, van der Laan T, Kremer K, van Soolingen D. Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*

Complex by Use of a High-Throughput, Reproducible, Absolute Concentration Method. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2662–2668-2662–2668.

- VanderVen BC, Huang L, Rohde KH, Russell DG. The Minimal Unit of Infection: Mycobacterium tuberculosis in the Macrophage. *Microbiol Spectr.* 2016;4(6).
- Vankayalapati R, Barnes PF. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89 Suppl 1:S77-80.
- Vasiliev AM, Vasilenko RN, Kulikova NL, Andreev SM, Chikileva IO, Puchkova GY, Kosarev IV, Khodyakova AV, Khlebnikov VS, Ptitsyn LR, Shcherbakov GY, Uversky VN, DuBuske LM, Abramov VM. Structural and Functional Properties of IL-4-delta2, an Alternative Splice Variant of Human IL-4. *J Proteome Res.* 2003;2(3):273–281-273–281.
- Venkatasubramanian S, Cheekatla S, Paidipally P, Tripathi D, Welch E, Tvinnereim AR, Nurieva R, Vankayalapati R. IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol.* 2017;10(4):1031-1042.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4560-4565.
- Verway M, Bouttier M, Wang T-T, Carrier M, Calderon M, An B-S, Devemy E, McIntosh F, Divangahi M, Behr MA, White JH. Vitamin D Induces Interleukin-1 $\beta$  Expression: Paracrine Macrophage Epithelial Signaling Controls M. tuberculosis Infection. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003407-e1003407.
- Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of Mycobacterial Phagosome Maturation Is Caused by a Block in Vesicle Fusion between Stages Controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 1997;272(20):13326–13331-13326–13331.
- Vincent AT, Nyongesa S, Morneau I, Reed MB, Tocheva EI, Veyrier FJ. The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution?. *Front Microbiol.* 2018;9:2341.
- Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13(8):722-728.
- Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *The J Biol Chem.* 1991;266:7313–7316-7313–7316.
- Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, Davis JM, Rawls JF, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science.* 2010;327(5964):466-469.

- Vukmanovic-Stejjic M, Reed JR, Lacy KE, Rustin MHA, Akbar AN. Mantoux Test as a model for a secondary immune response in humans. *Immunol Lett.* 2006;107(2):93–101-193–101.
- Wagener M, Hoving JC, Ndlovu H, Marakalala MJ. Dectin-1-Syk-CARD9 Signaling Pathway in TB Immunity. *Front Immunol.* 2018;9:225.
- Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- $\beta$ . *Immunol Today.* 1989;10(8):258–261-258–261.
- Walker NF, Clark SO, Oni T, Andreu N, Tezera L, Singh S, Saraiva L, Pedersen B, Kelly DL, Tree JA, D'Armiento JM, Meintjes G, Mauri FA, Williams A, Wilkinson RJ, Friedland JS, Elkington PT. Doxycycline and HIV infection suppress tuberculosis-induced matrix metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(9):989-997.
- Wang Q, Liu J. Regulation and Immune Function of IL-27. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:191-211.
- Wangoo A, Sparer T, Brown IN, Snewin VA, Janssen R, Thole J, Cook HT, Shaw RJ, Young DB. Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. *J Immunol.* 2001;166(5):3432-3439.
- Ware CF. Tumor Necrosis Factors. In: *Encyclopedia of Cancer (Second Edition)*, Academic Press. 2002:475–489-475–489.
- Warren J, Bhattacharya MONDIRA, Dealmeida KF, Trakas KATHY, Peterson L. A Minimum 5.0 ml of Sputum Improves the Sensitivity of Acid-fast Smear for Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1559–1562-1559–1562.
- Wawrocki S, Druszczynska M, Kowalewicz-Kulbat M, Rudnicka W. Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. *Acta Biochim Pol.* 2016;63(1).
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* 1993;14(7):353-6.
- Wei-Xia XUAN, Zhang JIANCHU, Qiong ZHOU, Wei-Bing YANG, Li-Jun MA. IL-33 levels differentiate tuberculous pleurisy from malignant pleural effusions. *Oncol Lett.* 2014;8(1):449–453-449–453.
- Wei M, Yongjie Z, Zhuoyu Q, Biao Y, Xi J, Wei J, Tang B. Pneumonia caused by Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect.* 2020;22(6-7):278-284.
- Whiteside TL. Cytokines and cytokine measurements in a clinical laboratory. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994;1(3):257-260.
- Whittaker E, Goldblatt D, McIntyre P, Levy O. Neonatal Immunization: Rationale, Current State, and Future Prospects. *Front Immunol.* 2018;9:532.

- Whittaker E, Nicol MP, Zar HJ, Tena-Coki NG, Kampmann B. Age-related waning of immune responses to BCG in healthy children supports the need for a booster dose of BCG in TB endemic countries. *Sci Rep.* 2018a;8(1):15309.
- WHO, World Health Organization. BCG vaccine: WHO position paper, February 2018 – Recommendations. *Vaccine.* 2018;36(24):3408–3410-3408–3410.
- WHO, World Health Organization. Operational handbook on tuberculosis (Module 1 – Prevention): Tuberculosis preventive treatment. Geneva, 2020
- WHO, World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Geneva. 2021.
- Wickremasinghe MI, Thomas LH, Friedland JS. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network. *J Immunol.* 1999;163(7):3936-3947.
- Wickremasinghe MI, Thomas LH, O'Kane CM, Uddin J, Friedland JS. Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell-specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27199-27210.
- Wicks IP, Roberts AW. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):37-48.
- Wieland CW, van der Windt GJ, Florquin S, McKenzie AN, van der Poll T. ST2 deficient mice display a normal host defense against pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2009;11(4):524-530.
- Wilkinson KA, Wilkinson RJ. Polyfunctional T cells in human tuberculosis. *Eur J Immunol.* 2010;40(8):2139-2142.
- Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur J Immunol.* 2009;39(1):26-35.
- Willment JA, Marshall ASJ, Reid DM, Williams DL, Wong SYC, Gordon S, Brown GD. The human B-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol.* 2005;35(5):1539–1547-1539–1547.
- Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med.* 2007;205(1):105–115-105–115.
- Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol.* 2008;127(3):385-393.



- Wong KW. The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. *Microbiol Spectr.* 2017;5(3).
- Woods GL, Washington JA. Mycobacteria Other than Mycobacterium tuberculosis: Review of Microbiologic and Clinical Aspects. *Clin Infect Dis.* 1987;9(2):275–294-275–294.
- Workneh MH, Bjune GA, Yimer SA. Prevalence and associated factors of tuberculosis and diabetes mellitus comorbidity: A systematic review. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175925.
- Wozniak TM, Ryan AA, Britton WJ. Interleukin-23 Restores Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection in IL-12p40-Deficient Mice and Is Not Required for the Development of IL-17-Secreting T Cell Responses. *J Immunol.* 2006;177(12):8684–8692-8684–8692.
- Wozniak TM, Ryan AA, Triccas JA, Britton WJ. Plasmid Interleukin-23 (IL-23), but Not Plasmid IL-27, Enhances the Protective Efficacy of a DNA Vaccine against Mycobacterium tuberculosis Infection. *Infect Immun.* 2006a;74(1):557–565-557–565.
- Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming Growth Factor- $\beta$  and the Immune Response: Implications for Anticancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18):5262–5270-5262–5270.
- Wu VY, Walz DA, McCoy LE. Purification and characterization of human and bovine platelet factor 4. *Prep Biochem.* 1977;7(6):479-493.
- Wu CY, Demeure C, Kiniwa M, Gately M, Delespesse G. IL-12 induces the production of IFN- $\gamma$  by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol.* 1993;151(4):1938-1949.
- Wu J, Wang S, Lu C, Shao L, Gao Y, Zhou Z, Huang H, Zhang Y, Zhang W. Multiple cytokine responses in discriminating between active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2017;102:68–75-68–75.
- Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN- $\gamma$  induction. *J Leukoc Biol.* 2000;68(6):897-902.
- Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(3):164-174.
- Xu L, Cui G, Jia H, Zhu Y, Ding Y, Chen J, Lu C, Ye P, Gao H, Li L, Ma W, Lyu J, Diao H. Decreased IL-17 during treatment of sputum smear-positive pulmonary tuberculosis due to increased regulatory T cells and IL-10. *J Transl Med.* 2016;14(1).
- Xu M, Dong C. IL-25 in allergic inflammation. *Immunol Rev.* 2017;278(1):185-191.

- Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.
- Yadav M, Schorey JS. The  $\beta$ -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006;108(9):3168–3175-3168–3175.
- Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest*. 2000;80(5):759-67
- Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2004;72(3):1223-1229.
- Yan H, Hale J, Jaffray J, Li J, Wang Y, Huang Y, An X, Hillyer C, Wang N, Kinet S, Taylor N, Mohandas N, Narla A, Blanc L. Developmental differences between neonatal and adult human erythropoiesis. *Am J Hematol*. 2018;93(4):494–503-494–503.
- Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, Hu GH, Hong SL, Bachert C. Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling. *Allergy*. 2012;67(10):1193-1202.
- Yang J, Qi F, Gu H, Zou J, Yang Y, Yuan Q, Yao Z. Neonatal BCG vaccination of mice improves neurogenesis and behavior in early life. *Brain Res Bull*. 2016;120:25-33.
- Yang H, Zhang H, Li Y, Xiang L, Liu J. BCG stimulation promotes dendritic cell proliferation and expression of VDR and CYP27B1 in vitamin D deficient mice. *Mol Med Rep*. 2019;20(6):5265-5271.
- Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E2–EP4 signaling promotes immune inflammation through TH1 cell differentiation and TH17 cell expansion. *Nat Med*. 2009;15(6):633–640-633–640.
- Yao S, Huang D, Chen CY, Halliday L, Zeng G, Wang RC, Chen ZW. Differentiation, distribution and gamma delta T cell-driven regulation of IL-22-producing T cells in tuberculosis. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000789.
- Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S. Prostaglandin E2 promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. *Nat Commun*. 2013;4(1).
- Yerkovich ST, Wikstrom ME, Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW, Holt PG. Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. *Pediatr Res*. 2007;62(5):547-552.
- Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-hora M, Akashi K, Yamasaki S.

- Dectin-2 Is a Direct Receptor for Mannose-Capped Lipoarabinomannan of Mycobacteria. *Immunity*. 2014;41(3):402–413-402–413.
- Yoon MY, Yoon SS. Disruption of the Gut Ecosystem by Antibiotics. *Yonsei Med J*. 2018;59(1):4-12.
  - Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in Immunity. *Adv Immunol*. 2001;57–110-157–110.
  - Yoshikawa A, Murakami H, Nagata S. Distinct signal transduction through the tyrosine-containing domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J*. 1995;14:5288-5296.
  - Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*. 2010;14(11):2592–2603-2592–2603.
  - Yuan Zha Y, Blank C, Gajewski TF. Negative Regulation of T-Cell Function by PD-1. *Critical Rev in Immunol*. 2004;24(4):229–238-229–238.
  - Yuk J-M, Jo E-K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014;3(2):155-155.
  - Zaslona Z, Serezani CH, Okunishi K, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 restrains macrophage maturation via E prostanoïd receptor 2/protein kinase A signaling. *Blood*. 2012;119(10):2358-2367.
  - Zenaro E, Donini M, Dusi S. Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. *J Leukoc Biol*. 2009;86(6):1393-1401.
  - Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *The J Clin Invest*. 1994;93:1733–1739-1733–1739.
  - Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37.
  - Zhang Y, Ma CJ, Wang JM, Ji XJ, Wu XY, Jia ZS, Moorman JP, Yao ZQ. Tim-3 negatively regulates IL-12 expression by monocytes in HCV infection. *PLoS One*. 2011;6(5):e19664.
  - Zhang Y, Ma CJ, Wang JM, Ji XJ, Wu XY, Moorman JP, Yao ZQ. Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14+ monocytes. *J Leukoc Biol*. 2011a;91(2):189–196-189–196.
  - Zhang J, Qian X, Ning H, Eickhoff CS, Hoft DF, Liu J. Transcriptional suppression of IL-27 production by Mycobacterium tuberculosis-activated p38 MAPK via inhibition of AP-1 binding. *J Immunol*. 2011b;186(10):5885-5895.
  - Zhang C, Yang M, Ericsson AC. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Front Immunol*. 2021;12:620510.

- Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-1569.
- Zini G. Abnormalities in leukocyte morphology and number. In: Elsevier, *Blood and Bone Marrow Pathology*; 2011:247–261-247–261.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-127.
- Zuniga J, Torres-Garcia D, Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:193923.