

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

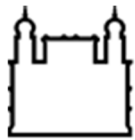
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**ESTUDO DOS MECANISMOS EXTRACELULARES
ASSOCIADOS À INDUÇÃO DE APOPTOSE MEDIADA PELA
VACINA BCG EM MONÓCITOS HUMANOS**

SANDRA ELIZABETE CARLOS RIBEIRO DE FARIA

Rio de Janeiro

Outubro de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

SANDRA ELIZABETE CARLOS RIBEIRO DE FARIA

Estudo Dos Mecanismos Extracelulares Associados à Indução De Apoptose
Mediada Pela Vacina BCG Em Monócitos Humanos

Dissertação apresentada ao Instituto

Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para

obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador (es): Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas
Prof. Dr(a). Roberta Olmo Pinheiro

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2022

Ficha Catalográfica

Faria, Sandra Elizabete Carlos Ribeiro de .

Estudos dos mecanimos extracelulares associados à indução de apoptose mediada pela vacina BCG em monócitos humanos / Sandra Elizabete Carlos Ribeiro de Faria. - Rio de Janeiro, 2022.

xvi,94f. f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

Orientador: Paulo Renato Zuquim Antas.

Co-orientadora: Roberta Olmo Pinheiro.

Bibliografia: f. 78-93

1. Vacina BCG. 2. Apoptose. 3. Via extrínseca. 4. Monócitos humanos. 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.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

SANDRA ELIZABETE CARLOS RIBEIRO DE FARIA

ESTUDO *IN VITRO* DOS MECANISMOS EXTRACELULARES NA INDUÇÃO DA APOPTOSE MEDIADA PELA VACINA BCG EM MONÓCITOS HUMANOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas

COORIENTADORA: Prof. Dr(a). Roberta Olmo Pinheiro

Aprovada em: 14/10/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr(a). Paula Mello de Luca - Presidente (IOC-Fiocruz)

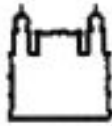
Prof. Dr(a). Márcia Berrêdo – (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr(a). Cristiana Santos de Macedo (CDTS-Fiocruz)

Prof. Dr(a) Dilzamar Veloso do Nascimento (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Luiz Carlos Albuquerque Pinto (UFCE)


Rio de Janeiro, 14 de Outubro de 2022



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Medicina Tropical de **Sandra Elizabete Carlos Ribeiro de Faria**, sob orientação do Dr. Paulo Renato Zuquim Antas e coorientada pela Dr^a. Roberta Olmo-Pinheiro. Ao décimo quarto dia do mês de outubro de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **"Estudo dos Mecanismos Extracelulares Associados à Indução de Apoptose Mediada pela Vacina BCG em Monócitos Humanos"**, no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Paula Mello De Luca – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Cristiana Santos de Macedo – CDTS/FIOCRUZ, Dr^a. Marcia de Berrêdo Pinho Moreira – IOC/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr^a. Dizamar Veloso do Nascimento - IOC/FIOCRUZ e Dr. Luiz Carlos Albuquerque Pinto - UFC/CE. Após arguir a candidata e considerando que a mesma 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 Medicina Tropical 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, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr^a. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 14 de outubro de 2022.


Dr^a. Paula Mello De Luca (Presidente da Banca):

Dr^a. Vanessa Salete de Paula (Coordenadora do Programa): 

ADRADECIMENTOS

A Deus, meu Aba Pai, que me abençoou com a oportunidade de cursar o mestrado em Medicina Tropical em uma instituição tão renomada. Pelos livramentos diários, pelo fôlego de vida, tão precioso nessa pandemia, que me manteve de pé e pelas pessoas maravilhosas que Ele me proporcionou conhecer.

Ao meu eterno amor, meu marido Caio, que compreendeu cada fase desta jornada acadêmica, que me amou e me incentivou a não desistir. Me fez rir em momentos difíceis e a não esquecer o alvo. Te amo.

Aos meus pais, principalmente minha mãe, por terem se doado e, muitas das vezes, aberto mão de seus sonhos e desejos pela minha vida e educação. Não seria nada sem a dona Angela.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Antas, pela oportunidade de me direcionar a uma linha de pesquisa tão linda quanto a com a vacina BCG.

A minha coorientadora, Dra. Roberta Olmo, por ter aberto o laboratório para mim e meus amigos nesses anos tão difíceis.

Ao LIC e ao LAHAN, pela estrutura física e corpo acadêmico maravilhosos.

A todos os membros da banca, pela disponibilidade de tempo e generosidade por terem aceitado ao meu convite, me ajudando a concluir este sonho.

À Fiocruz, por me oferecer estrutura e proteção nesse momento pandêmico.

Aos professores da pós graduação, que me ensinaram que lecionar vai além de ditar conteúdos. O mais importante é ser humano.

Ao Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, pela oportunidade de me inserir no meio científico, oferecendo condições para a realização de meus experimentos como aluna de iniciação científica.

Aos plataformas de Citometria de Fluxo de Análise Multiparamétrica e de Biologia Molecular do IOC, por toda ajuda técnica e científica.

Às instituições de fomento, visto que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao povo brasileiro que paga seus impostos, possibilitando a manutenção de órgãos públicos, como a Fiocruz.

Aos meus familiares, meu vizinho, mãe Lena, minha melhor amiga e irmã Sarah, minha tia Patrícia e meu tio Camilo, por me fazerem acreditar no impossível e por serem exemplos de vida para mim.

Aos meus amigos conquistados na Fiocruz, que fizeram essa caminhada mais leve, principalmente Andreon e Matheus, amo vocês amigos!

Aos meus amigos de jornada, em especial, Luana, amiga conquistada na UFRJ que se tornou indispensável na minha vida.

Aos meus irmãos em Cristo, que fazem parte deste corpo junto comigo, meus amados da IMO no Brito, que oraram e investiram na minha vida.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Sandra Elizabete Carlos Ribeiro de Faria

A tuberculose (TB) é a doença infectocontagiosa que mais mata no mundo, e possui como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*. A medida protetora mais eficaz contra a TB é a vacinação com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), o qual foi produzido a partir de uma cepa de *M. bovis* atenuada. Estudos demonstram que a vacina BCG confere proteção contra casos graves da TB. Porém, a mesma não confere uma proteção prolongada e eficaz em adultos. A eficácia da vacina BCG vem sendo associada a indução de apoptose extrínseca em monócitos/macrófagos, podendo ser uma das peças-chave entre as imunidades inata e adquirida. Os principais ativadores da via extrínseca são Fas/FasL, TNFR1/TNF e TRAILR1/TRAILR2/TRAIL. Além disso, estudos demonstraram que a IL-1 β pode estar envolvida na indução de piroptose. Contudo, a via da apoptose induzida pela vacina BCG em monócitos/macrófagos humanos ainda não foi elucidada. O presente estudo teve como objetivo identificar *in vitro* as vias de apoptose ativadas em monócitos humanos, e mediadas pelos fatores solúveis extrínsecos induzidos pela vacina BCG Moreau em PBMC e células de linhagem THP-1. A análise da expressão gênica evidenciou que FAS e Caspase-1 foram expressos em altos níveis ($p < 0,05$) em PBMC estimuladas com o BCG. Ademais, a inibição de TNF, Fas e TRAIL foi possível com anticorpos neutralizantes, e estes reduziram os percentuais de apoptose ($p \leq 0,05$) em PBMC estimuladas com o meio condicionado (MC) induzido pelo BCG. Curiosamente a inibição da IL-1 β mostrou resultados ainda mais significativos ($p < 0,001$) na redução da apoptose em PBMC. Porém, o mesmo não foi visto na linhagem THP-1. Dentre os fatores solúveis extrínsecos secretados pela linhagem THP-1 estimulada com o BCG, altos níveis de MCP-1/CCL-2 ($p < 0,05$) foram encontrados, e isto apontou o MCP-1/CCL-2 como um candidato potencial na indução de apoptose nesse modelo. Esses resultados sugerem que a vacina BCG Moreau foi capaz de induzir apoptose em monócitos humanos por mecanismos multifatoriais, os quais foram modulados de acordo com o modelo celular utilizado. Essas informações podem contribuir com os futuros estudos de melhora na eficácia da vacina BCG, e que tenham como alvo a indução de apoptose em monócitos humanos.

Palavras-chaves: Vacina BCG, Apoptose, TNF, FAS, TRAIL e IL-1 β .

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Sandra Elizabete Carlos Ribeiro de Faria

Tuberculosis (TB) is the deadliest infectious disease in the world, being *Mycobacterium tuberculosis* the etiological agent. The most effective protective measure against TB is the vaccination with Bacillus Calmette-Guérin (BCG), which originated from an attenuated *M. bovis* strain. Studies have shown that the BCG vaccine provides protection against severe TB cases. However, it does not provide prolonged and effective protection in adults. The efficacy of BCG vaccine has been associated with induction of extrinsic apoptosis in monocytes/macrophages and may be one of the main links between innate and acquired immunity. The key extrinsic activators are Fas/FasL, TNFR1/TNF and TRAILR1/TRAILR2/TRAIL. In addition, studies have shown that IL-1 β may be involved in the induction of pyroptosis. However, the pathway of BCG vaccine-induced apoptosis in human monocytes/macrophages has not yet been elucidated. The present study aimed to identify the apoptosis pathways activated *in vitro* in human monocytes that may be mediated by extrinsic soluble factors induced by the BCG Moreau vaccine in PBMC and THP-1 cell-line. The gene expression analysis showed that FAS and Caspase-1 were highly expressed ($p < 0,05$) in PBMC stimulated with BCG. Furthermore, inhibition of TNF, Fas and TRAIL was possible by using neutralizing antibodies, and these reduced the rate of apoptosis ($p \leq 0,05$) in PBMC stimulated with BCG-induced conditioning medium (MC). Moreover and curiously, the inhibition of IL-1 β showed even more significant results ($p < 0,001$) in reducing apoptosis in PBMC. However, the same was not true for the THP-1 cell-line. Amongst the extrinsic soluble factors secreted in by BCG-infected THP-1 cell line, highest MCP-1/CCL-2 levels ($p < 0,05$) were found, and pointed out MCP-1/CCL-2 to be a potential candidate for the induction of apoptosis in this model. These results suggest that the BCG Moreau vaccine was able to induce apoptosis in human monocytes by multifactorial mechanisms, which were modulated according to the cellular model used. This information may contribute to future studies of improvement in the efficacy of BCG vaccine, and which the target is the induction of apoptosis in human monocytes.

Keywords: BCG Moreau vaccine, Apoptosis, TNF, FAS, TRAIL and IL-1 β .

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Tuberculose	17
1.2 A Vacina BCG	30
1.3 Morte celular	38
1.4 Superfamília TNF	44
1.5 A Apoptose e a Vacina BCG	49
1.6 O meio condicionado e seus aspectos imunes	51
2 OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo Geral	52
2.2 Objetivos Específicos	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Obtenção das Amostras e Biossegurança	53
3.2 Aspectos Éticos	53
3.3 Obtenção de células primárias	53
3.4 Preparação do meio condicionado	54
3.5 Incubação de linhagem THP1, PBMC e MC com anticorpos de bloqueio	54
3.6 Obtenção de células de linhagem	54
3.7 Detecção do padrão de morte celular	54
3.8 Expressão gênica	55
3.9 Solubilização da vacina BCG Moreau	56
3.10 Dosagem de mediadores solúveis	57
3.11 Análise estatística	58
4 RESULTADOS	60
4.1 A vacina BCG induz a apoptose em células de linhagem THP-1	60
4.2 Os fatores solúveis induzidos pela vacina BCG no meio condicionado induzem apoptose em linhagem THP-1 em repouso	61
4.3 A vacina BCG induz a expressão gênica de Fas e caspase-1	61
4.4 As vias clássicas de apoptose extrínseca não são as responsáveis pela apoptose induzida pela vacina BCG Moreau em células de linhagem THP-1.	62
4.5 O bloqueio com os anticorpos neutralizantes de forma isolada reduz os percentuais de apoptose em PBMC autólogas em repouso induzidos pelos fatores extrínsecos presentes no MC controle positivo	63

4.6 O bloqueio em conjunto e simultâneo com os anticorpos neutralizantes reduz parcialmente os percentuais de apoptose induzidos pelos fatores extrínsecos presentes no MC controle positivo	64
4.7 O bloqueio com os anticorpos neutralizantes reduzem de forma significativa os percentuais de necrose induzidos pela vacina BCG em células THP-1 e PBMC	65
4.8 A vacina BCG induz níveis elevados de MCP-1 em células de linhagem THP-1	65
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	76
7 PERSPECTIVAS	77
8 REFERÊNCIAS	78
ANEXO 1	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura do Mtb. Fonte: Koch & Mizhahi, 2018.	18
Figura 2: Estrutura da parede celular do Mtb e os principais alvos na estratégia farmacológica contra o Mtb: AM: Ácidos Micólicos; AG: Arabinogalactanos; PG: Peptideoglicanos; MC: Membrana Celular. Imagem adaptada. Fonte: Shanib <i>et al.</i> ,2017.	19
Figura 3: Ciclo de infecção pelo Mtb. Imagem adaptada. Fonte: Koch & Mizhahi, 2018	20
Figura 4: Casos estimados de TB em 2020. Fonte: OMS, 2021.	22
Figura 5: Baciloscopia direta de escarro pelo método de Ziehl- Nelseen. Fonte: Ministério da Saúde, 2015.	26
Figura 6: Cultura de Mtb com crescimento em formato de migalhas de pão em meio Lowenstein-Jensen. Fonte: Heemskerk <i>et al.</i> ,2015.	28
Figura 7: Fotografia de aspectos históricos no museu do Instituto Pasteur de Lille, França. Fonte: Acervo particular do orientador.	32
Figura 8: Árvore genealógica da vacina BCG.Imagem adaptada. Fonte: Brosch <i>et al.</i> ,2007.	35
Figura 9: Resposta imune em indivíduos vacinados com BCG. Imagem adaptada. Fonte: Covián, <i>et al.</i> ,2019.	39
Figura 10: Linha do tempo do descobrimento de diferentes tipos de morte celular. Imagem adaptada. Fonte: Tang <i>et al.</i> ,2019	40
Figura 11: Vias extrínseca e intrínseca de apoptose. Imagem adaptada. Fonte: Divangahi, Behar e Remond, 2013.	44
Figura 12: Níveis de TNF (A) e IL-1 β (B) obtidos de PBMCs e células de cordão umbilical infectadas com a vacina BCG Moreau por 24h e 48h. Imagem adaptada de Simas <i>et al.</i> , 2011.	50
Figura 13: Fluxograma dos experimentos de cultura	56
Figura 14: Estratégia de regiões utilizadas nas PBMC.	57
Figura 15: Apoptose na linhagem THP-1 infectada com a vacina BCG Moreau por48h	60
Figura 16: Apoptose na linhagem THP-1 incubada com o meio condicionado proveniente de PBMCs infectadas com a vacina BCG Moreau por 48h..	61
Figura 17: Expressão gênica de candidatos apoptóticos induzidos em PBMCs infectadas pela vacina BCG Moreau por 16h..	62
Figura 18: Percentuais de apoptose na linhagem THP-1 incubada com o meio condicionado controle positivo mais os anticorpos neutralizantes..	63

Figura 19: Percentuais de apoptose em PBMC incubadas com o meio condicionado controle positivo mais os anticorpos neutralizantes.	64
Figura 20: Percentuais de apoptose em PBMC obtidas de indivíduos sadios incubadas com o meio condicionado controle positivo mais os 4 anticorpos neutralizantes por 72h.	64
Figura 21: Percentuais de necrose em células de linhagem THP-1 (A) e PBMC (B) incubadas com o MC controle positivo (BCG) + os anticorpos neutralizantes	65
Figura 22: Níveis de citocinas induzidas pela vacina BCG Moreau em células de linhagem THP-1	66
Figura 23: Modelo de inibição e apoptose em monócitos humanos estimulados com MC de PBMC infectadas com a vacina BCG, através do bloqueio com os anticorpos neutralizantes.	75
Figura Suplementar 1 : Percentuais de apoptose em células de linhagem THP-1 incubadas com o meio condicionado controle positivo (BCG) + os anticorpos neutralizantes.	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Mecanismos de ação dos principais medicamentos anti-TB. Tabela criada a partir das informações obtidas pelo Ministério da Saúde, 2019.....	29
Tabela 2: Anticorpos neutralizantes utilizados.....	55
Tabela 3: Alvos genéticos selecionados.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana (do inglês " <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ")
APAF-1	Fator de ativação 1 da protease apoptótica (do inglês " <i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i> ")
ATP	Adenosina Trifosfato
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
BID	Agonista de Morte do Domínio de Interação BH3 (do inglês " <i>BH3 Interacting-Domain Death Agonist</i> ")
CCL	Ligante de Quimiocina de Motivo CC (do inglês " <i>C-C Motif Chemokine Ligand</i> ")
C-FLIP	Proteína inibidora de FLICE (do inglês " <i>FLICE-Like Inhibitory Protein</i> ")
CD	Conglomerado de diferenciação
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFP-10	Proteína do Filtrado de Cultura 10 Kda (do Inglês " <i>Culture Filtrate Protein-10 Kda</i> ")
COVID-19	Doença do Novo Coronavírus – 19 (do inglês " <i>Coronavirus Disease-19</i> ")
CXCL	Ligante de Quimiocina de Motivo CXC (do inglês " <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i> ")
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês " <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i> ")
DC	Célula Dendrítica (do Inglês " <i>Dendritic Cell</i> ")
DFC	Dose Fixa Combinada
DISC	Complexo de Sinalização de Indução de Morte (do inglês " <i>Death-Inducing Signalling Complex</i> ")
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês " <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ")
DR	Receptor de Morte (do inglês " <i>Death Receptor</i> ")
EP2	Receptor de Prostaglandina E2 (do inglês " <i>Prostaglandin E2 Receptor 2</i> ")
ESAT-6	Alvo antigênico secretado precocemente 6 kDa (do inglês " <i>Early Secreted Antigenic Target 6 Kda</i> ")

FADD	Domínio de morte associado a Fas (do inglês " <i>Fas-Associated Death Domain</i> ")
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (do inglês " <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Fator</i> ")
HBGF	Fator de Crescimento de Ligação a Heparina (do inglês " <i>Heparin Binding Growth Factor</i> ")
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês " <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ")
HMGB1	Proteína Caixa 1 do Grupo de Alta Mobilidade (do inglês " <i>High Mobility Group Box 1 Protein</i> ")
IAP1/2	Proteínas Inibidoras de Apoptose 1/2 (do inglês " <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins 1/2</i> ")
IFN- γ	Interferon-Gama
IgG	Imunoglobulina G
IGRA	Teste de liberação de Interferon-Gama (do inglês " <i>Interferon-Gamma Release Assay</i> ")
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (do inglês " <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> ")
MCR	Morte Celular Regulada
MHC-II	Complexo de Histocompatibilidade – II (do inglês " <i>Major Histocompatibility Complex - II</i> ")
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAAT	Teste de amplificação de ácidos nucleicos (do inglês " <i>Nucleic Acid Amplification Test</i> ")
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NLRP3	Domínio Pirina da Família NLR Contendo 3 (do inglês " <i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i> ")
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês " <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> ")
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês " <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> ")

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês " <i>Polymerase Chain Reaction</i> ")
PGE2	Prostaglandina E2
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	Derivado Proteico Purificado (do inglês " <i>Purified Protein Derivative</i> ")
PRR	Receptores Reconhecedores de Padrões (do inglês " <i>Pattern Recognition Receptor</i> ")
RD	Região de diferença (do inglês " <i>Region of Difference</i> ")
RIP	Serina/treonina quinase de interação com o receptor (do inglês " <i>Receptor-Interacting Serine/Threonine Kinase</i> ")
RIPK	Proteína Quinase de Interação com o Receptor (do inglês " <i>Receptor-Interacting Protein Kinase</i> ")
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês " <i>Reactive Oxygen Species</i> ")
SFASL	Ligante de Fas Solúvel (do inglês " <i>Soluble Fas Ligand</i> ")
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês " <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ")
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TLR	Receptor do Tipo <i>Toll</i> (do inglês " <i>Toll-Like Receptor</i> ")
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês " <i>Tumor necrosis factor</i> ")
TNFR	Receptor do TNF (do Inglês " <i>TNF Receptor</i> ")
TRADD	Proteína de Domínio de Morte Associada a TNFR1 (do inglês " <i>TNFR1-Associated Death Domain Protein</i> ")
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF (do inglês " <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> ")

1 INTRODUÇÃO

Esta dissertação teve como meta principal a identificação *in vitro* das vias de apoptose ativadas em monócitos humanos, mediadas pelos fatores solúveis extrínsecos induzidos pela vacina BCG Moreau. Esta abordagem pode ajudar na concepção de novas intervenções profiláticas, bem como terapêuticas, seguras contra a tuberculose (TB). Desde 2007, o grupo do Dr. Paulo Antas atua no Laboratório de Imunologia Clínica do IOC/FIOCRUZ se dedicando a estudar a resposta imune celular frente a TB em amostras clínicas humanas obtidas, principalmente, de indivíduos da região metropolitana do Rio de Janeiro. Este último é um dos estados que apresentou as maiores taxas de incidência de TB em 2019, sendo esta de 66,3 casos/100 mil habitantes (SES-RJ, 2019). Logo, torna-se interessante uma revisão de alguns aspectos da literatura científica relacionados aos objetivos do presente trabalho.

1.1 Tuberculose

A TB é uma doença infectocontagiosa que possui como principal agente etiológico a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Estima-se que o progenitor comum de Mtb tenha surgido por volta de 15.000 anos atrás (Barberis *et al.*, 2017), estando no continente americano há pelo menos três mil anos (Souza, 2011). Antes da pandemia da doença causada pelo novo coronavírus-19 (COVID-19), a TB liderava como a principal causa de morte por um único agente infeccioso, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos e menos assistidos socialmente (OMS, 2021). Em 2020, cerca de 9,9 milhões de pessoas desenvolveram a TB, sendo relatados 1,3 milhões de óbitos entre os indivíduos HIV-negativos e 214.000 entre os indivíduos HIV-positivos (OMS, 2021). Essas estimativas mostraram um ligeiro aumento quando comparado aos dados obtidos em 2019 (1,2 milhões de óbitos entre HIV-negativos e 209.000 entre HIV-positivos) (OMS, 2021). Segundo a OMS, isso reflete o impacto da pandemia de COVID-19 nas notificações dos casos de TB, pois influenciou negativamente no diagnóstico e tratamento (OMS, 2021). Em 2020, foram registrados no Brasil 66.819 novos casos de TB, com coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100 mil habitantes, (Ministério da Saúde, 2021).

1.1.1 Agente etiológico

O bacilo Mtb foi isolado e identificado pela primeira vez pelo médico e microbiologista alemão Heinrich Hermann Robert Koch (por isso o Mtb também é chamado de Bacilo de Koch), em 1882 (Koch, 1882). O Mtb (Figura 1) faz parte da ordem Actinomycetales e família Mycobacteriaceae, é aeróbio obrigatório, não forma esporos e possui forma de bacilo reto ou curvo, com proporções de 0,2 a 0,7 micrômetros de largura por 1,0 a 10,0 micrômetros de comprimento (Koch, 1882; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009).

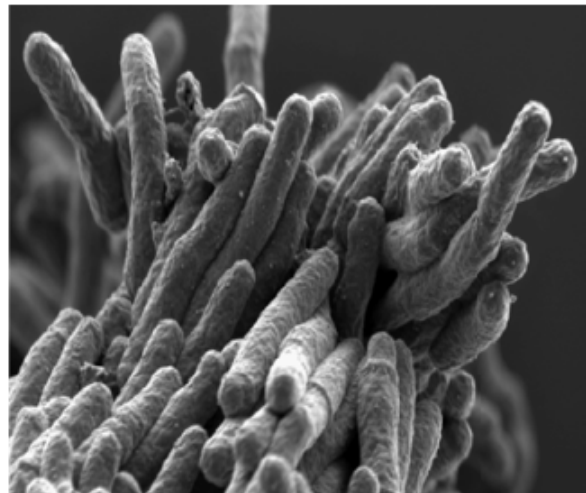


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura do Mtb. Fonte: Koch & Mizhahi, 2018.

A parede celular (Figura 2) possui característica hidrofóbica, sendo rica em lipídios complexos, como ceras (ácido micólico) e glicolipídeos (Shanib *et al.*, 2017). Isso confere resistência à água e a estresses, como o ressecamento. Logo, Mtb é resistente a muitos desinfetantes e colorações comuns na rotina de laboratório, o que corresponde à característica álcool-ácido resistente do bacilo (Ziehl, 1882; Tortora, Funke e Case, 2017). Devido a composição bioquímica da parede celular e o caráter aeróbio, o crescimento de Mtb é lento, podendo levar até 8 semanas para crescer em cultura (Koch, 1882; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009; Malhotra, Okon e Clark-Curtiss, 2012).

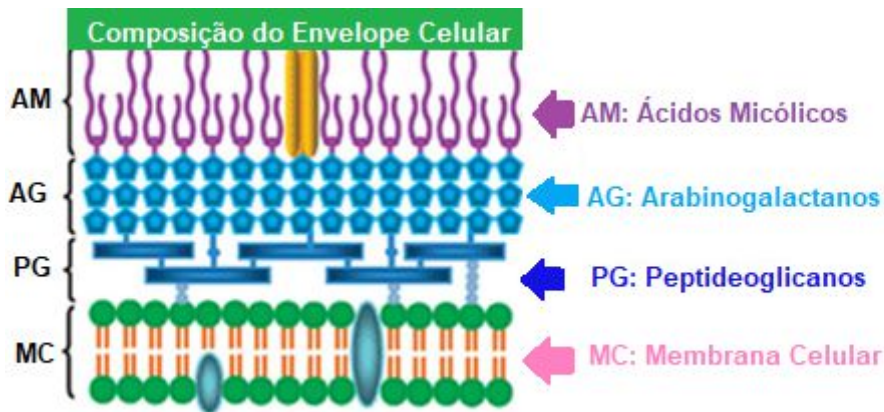


Figura 2: Estrutura da parede celular do Mtb e os principais alvos na estratégia farmacológica contra o Mtb: AM: Ácidos Micólicos; AG: Arabinogalactanos; PG: Peptideoglicanos; MC: Membrana Celular. Imagem adaptada. Fonte: adaptado de Shanib *et al.*,2017.

A parede celular do Mtb também está envolvida na virulência do bacilo, visto que a mesma interfere no processo de digestão por fagócitos, possibilitando que Mtb seja um patógeno intracelular facultativo, podendo se multiplicar dentro das células hospedeiras (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009; Shanib *et al.*,2017; Dulberger, Rubin & Boutte, 2020). Devido a isso, muitas estratégias farmacológicas utilizadas contra a TB visam a inibição da síntese de ácidos micólicos, arabinogalactanos, entre outros componentes da parede celular (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009; Shanib *et al.*,2017; Dulberger, Rubin & Boutte, 2020).

1.1.2 Fisiopatogenia

O Mtb é transmitido através da inalação de gotículas contendo o bacilo, liberadas por indivíduos infectados (Churchyard *et al.*, 2017). Inicialmente, o Mtb enfrenta as barreiras físicas do hospedeiro, como os pelos nasais, o epitélio e o muco produzido pela mucosa do aparelho respiratório (Churchyard *et al.*, 2017; Scriba *et al.*,2017). Essas barreiras são consideradas as primeiras linhas de defesa inata do organismo, onde grande parte dos bacilos ficam retidos nessas barreiras físicas (Scriba *et al.*,2017). Porém, alguns bacilos conseguem chegar aos alvéolos pulmonares (Figura 3). Nos pulmões, os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs - do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*) do Mtb são identificados por Receptores Reconhecedores de Padrões (PRR -do inglês *Pattern Recognition Receptors*) e fagocitados pelos macrófagos

alveolares (Russel, 2007; Sia & Rengaranjan, 2019). Assim, o Mtb se multiplica no fagossomo dos macrófagos residentes, impedindo que ocorra a formação do fagolisossomo (Pai *et al.*, 2016; Lyon & Rossman, 2017). Isso ocorre pois há a alteração de uma proteína envolvida na formação de vesículas e fusão de membranas (Rab GTPase) e exclusão da bomba de prótons ATPase, gerando uma alcalinização do meio intracelular, e proporcionando um ambiente favorável à replicação do bacilo (Sia & Rengaranjan, 2019).

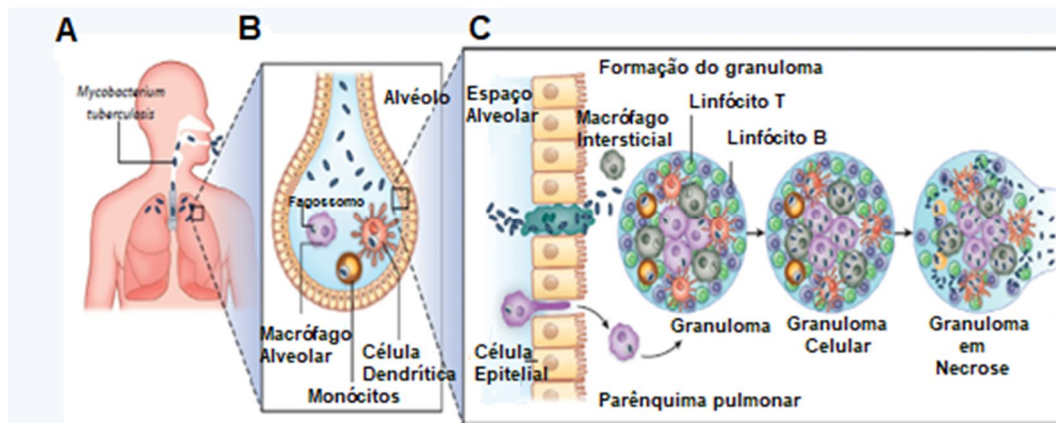


Figura 3: Ciclo de infecção pelo Mtb. A: Entrada de bacilos no alvéolo pulmonar através da via respiratória. B: Fagocitose por macrófagos alveolares e células dendríticas. C: Recrutamento de células imunes e formação do granuloma para contenção dos bacilos. Reinfecções e depressão do sistema imune podem desencadear a necrose dos granulomas e a reativação dos bacilos. Imagem adaptada. Fonte: adaptado de Koch & Mizhahi, 2018

Os macrófagos alveolares infectados desenvolvem uma resposta pró-inflamatória intensa, principalmente com produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF), IL1- α , IL1- β e IL18, e quimiocinas, como MCP-1 (ou CCL2) e CXCL10 (IP-10) (Liu & Cai, 2018; Ferluga *et al.*, 2020). Dessa maneira, o organismo tenta conter o crescimento do bacilo, através do recrutamento de mais células imunes, através das quimiocinas e a ativação autócrina e parácrina por TNF dos macrófagos infectados, levando as células infectadas ao processo de morte celular programada ou apoptose (Russel, 2007; Liu & Cai, 2018; Ferluga *et al.*, 2020). Os neutrófilos recrutados têm importante função no recrutamento celular, através da produção de quimiocinas, como MCP-1, CXCL10, CXCL9, CCL5, CCL3 e CCL4, recrutando mais monócitos e linfócitos, como as células *natural-killers* (NK), linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfócitos B (Scriba *et al.*, 2017). Os monócitos que chegam à região alveolar são ativados, diferenciando-se em

macrófagos, que continuam a produção de TNF (Russel, 2007; Liu & Cai, 2018; Ferluga *et al.*,2020). Os linfócitos recrutados produzem o Interferon Gama (IFN- γ), que auxilia no processo de ativação de macrófagos e na apoptose (Scriba *et al.*,2017).

A formação de granulomas, também chamados de tubérculos com caseificação central, se dá pelo infiltrado de leucócitos nas áreas de inflamação, principalmente pelos macrófagos, as células de Langerhans e células epitelióides (Marakalala *et al.*,2016; Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016). Na TB primária, há a formação do nódulo de Ghon, onde nos pacientes imunocompetentes, este regride e calcifica (Marakalala *et al.*,2016; Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016). Porém, em pacientes imunocomprometidos, o nódulo pode progredir e se disseminar (Marakalala *et al.*,2016; Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016). A reinfecção ou reativação é caracterizada como TB secundária, e ocorre em cada 5 a 10% dos casos (Suarez *et al.*,2019). Nessa situação, ocorre uma reação de hipersensibilidade tardia ou tipo IV, geralmente em pacientes imunocomprometidos, devido à sobrevivência do Mtb dentro dos granulomas, que em resposta a algum estresse é reativado (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016).

O Mtb também pode desencadear um processo de morte celular não programada ou necrose (Wang & Jacobs, 2013). Nesta, há dano tecidual e extravasamento do conteúdo intracelular (Huang, Nazarova e Russel, 2019). Logo, a reativação do granuloma, reinicia o processo necrótico no tecido, pela resposta inflamatória reacendida, o que facilita a proliferação dos bacilos devido à aeração ocasionada pela necrose tecidual e aumento de formação de granulomas (Marakalala *et al.*,2016; Suarez *et al.*,2019). Mediante a isso, apesar de se acreditar que o granuloma é uma forma de contenção do bacilo que impede uma disseminação extrapulmonar, o mesmo também pode ser visto como um nicho para futuras reativações, frente a situações de estresse (Sia e Rengarajan, 2019). Na tentativa de controlar a inflamação e consequente dano tecidual devido a infecção por Mtb, os macrófagos infectados produzem PGE₂, fornecendo proteção contra necrose, via EP2 (Allard, Panariti e Martin, 2018). Através desse mecanismo, há inibição de IFN- γ , e indução de apoptose. A PGE₂ regula negativamente a expressão do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC) II nas células apresentadoras de antígeno, o que implica na redução da ativação de respostas inflamatórias (Allard, Panariti e Martin, 2018).

1.1.3 Epidemiologia

Segundo dados fornecidos pela OMS, o número de casos de TB vem diminuindo bem lentamente a uma taxa de 1-6% ao ano (Furin, Cox e Pai, 2019; OMS, 2021). Acredita-se que cerca de 1/4 da população mundial esteja infectada com Mtb (Figura 4). Além disso, estudos mostram que indivíduos imunocomprometidos, principalmente os HIV-positivos, e pacientes em condições financeiras e sociais precárias, são os mais afetados (Ministério da Saúde, 2021; OMS, 2021).

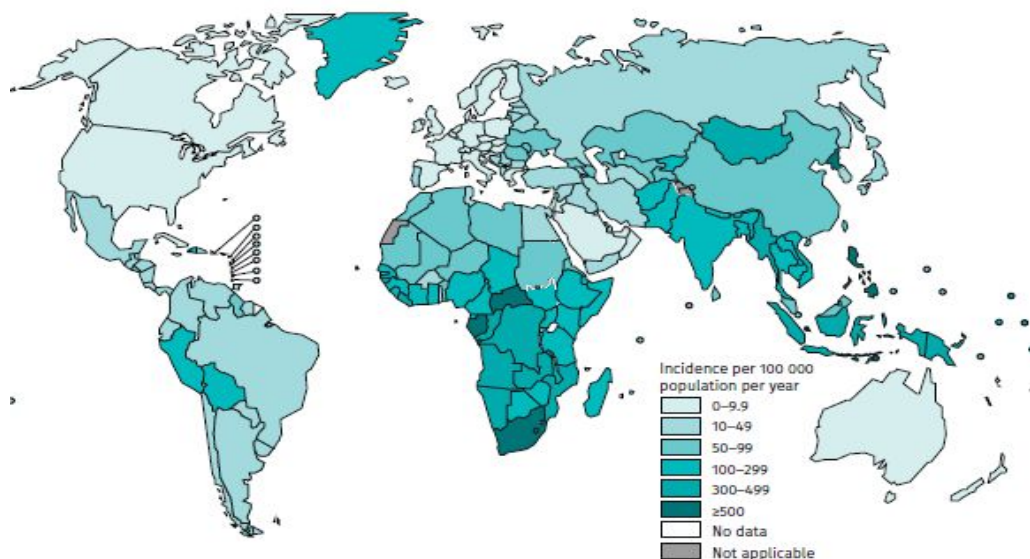


Figura 4: Casos estimados de TB em 2020. Fonte: OMS, 2021.

Em 2020, as regiões com o maior número de casos de TB no mundo foram o Sul-Leste Asiático (43%), a África (25%) e o Pacífico Oeste (18%), as quais possuem cerca de dois terços da população mundial (OMS, 2021). Nas Américas, os casos de TB corresponderam a 3% do número global (OMS, 2021). No Brasil, foram diagnosticados 73.864 casos novos de TB, correspondendo a um coeficiente de incidência de 35 casos/100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2021). A resistência aos medicamentos contra TB é um dos fatores associados a essa realidade, sendo considerado um problema de saúde pública (OMS, 2021). Acredita-se que quase meio milhão de pessoas desenvolveram

resistência à rifampicina (R), uma das principais drogas utilizadas no tratamento contra a TB (OMS, 2021).

O plano de combate a TB feito pela OMS tem como alvo a extinção da TB no mundo (OMS, 2021). Em cada país, deverá ser elaborado um plano de acordo com a situação epidemiológica e o sistema operacional contra a TB (OMS, 2021). Até 2035, a expectativa é de que a incidência seja reduzida em até 90%, e o número de mortes, em até 95%, tendo como parâmetros os dados de 2015 (OMS, 2021). Mediante a isso, três pilares fundamentais nesse combate são necessários: (1) a intensificação da profilaxia contra a TB e do cuidado ao paciente; (2) uma política direcionada e sistemas de apoio eficientes; e (3) a intensificação da pesquisa e inovação (Ministério da Saúde, 2017; Ministério da Saúde, 2021).

No Brasil, os pilares estabelecidos pela OMS são respeitados, tentando ser enquadrados no Sistema Único de Saúde (SUS) e suportados pelo governo brasileiro. No pilar de prevenção e do cuidado ao paciente, o Ministério da Saúde utiliza como estratégia a alta manutenção e homogeneidade da cobertura da vacina BCG (Ministério da Saúde, 2017). Isso é de suma importância para que se tenha não apenas a prevenção da doença em um indivíduo, mas uma proteção a nível populacional, uma vez que os índices de infecção e transmissão diminuem quando há uma cobertura vacinal eficiente (Sato, 2018).

1.1.4 Clínica

A TB pode se apresentar de diferentes formas clínicas, sendo a forma pulmonar (79-87%) a mais recorrente em pacientes imunocompetentes (Lyon & Rossman, 2017). Normalmente, a manifestação clínica da TB ocorre entre 3 a 6 semanas após a exposição ao bacilo, devido à sua lenta replicação (Lyon & Rossman, 2017). Os aspectos clínicos clássicos da TB pulmonar incluem tosse crônica, com produção ou não de expectoração, astenia, inapetência, hemoptise, anemia, febre e suores noturnos persistentes, podendo durar mais que 14 dias (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016). O paciente também pode se queixar de dor torácica, devido a possível inflamação da pleura associada (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016). Em pacientes imunocomprometidos, o nódulo de Ghon pode progredir e se disseminar, devido à sobrevivência do Mtb dentro dos

granulomas (Fogel, 2015; Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016; Lyon & Rossman, 2017). Em resposta a algum estresse, o bacilo é reativado, caracterizando a TB pulmonar secundária (Lyon & Rossman, 2017). Esta última é prevalente em adultos (em 60% a 80% dos casos) e pode ocorrer muitos anos após a exposição ao Mtb, devido a algum estresse imunológico, sendo mais recorrente em homens (Lyon & Rossman, 2017). Neste caso, pode-se dizer que a TB se encontrava na sua forma latente (LTBI), tornando-se TB ativa com a replicação de Mtb (Cordona, 2016).

Por outro lado, a TB extrapulmonar ocorre quando a doença afeta qualquer local diferente dos pulmões (Dourado & Vikram, 2005; Sharma, Mohan e Kohli, 2021). A mesma pode se manifestar após muitos anos de exposição ao Mtb, apresentando sintomas sistêmicos e específicos atrelados ao órgão lesionado (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016; Shaw & Koegelenberg, 2021). A TB extrapulmonar ocorre em 10 a 42% dos pacientes adultos, porém varia de acordo com as características étnicas, raciais, idade e genéticas, sendo mais comum em mulheres (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016; Shaw & Koegelenberg, 2021). A TB pleural é a forma extrapulmonar mais comum, sendo associada em até 90% na coinfeção por HIV (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016; Shaw & Koegelenberg, 2021). A TB pleural é recorrente nos jovens, mas em países com baixa incidência da doença, podem ser relatados casos em idades mais avançadas (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016; Shaw & Koegelenberg, 2021). Dentre as manifestações clínicas incluem-se febre alta, dor torácica e falta de ar, devido ao derrame pleural (Loddenkemper, Lipman e Zumla, 2016; Shaw & Koegelenberg, 2021).

1.1.5 Diagnóstico

Em linhas gerais, o diagnóstico da TB se baseia, em um primeiro momento, na identificação dos sintomas clínicos, comparando-os com os achados em exames/testes laboratoriais. Aqui, os métodos mais utilizados são a baciloscopia, a cultura e o Gene Xpert MTB/RIF, um teste rápido do tipo NAAT (do inglês *Nucleic acid amplification test*) (Lyon & Rossman, 2017). Porém, há necessidade de distinguir os quadros de TB ativa, daquele de LTBI, o que implica

na escolha dos métodos utilizados e na vigilância epidemiológica (Ministério da Saúde, 2019).

1.1.5.1 Clínica

O principal diagnóstico da TB é realizado a partir das observações dos sinais, sintomas e manifestações radiológicas que o paciente apresente (Ministério da Saúde, 2019). Além disso, informações sócio-epidemiológicas são levadas em conta na investigação da doença. Durante o diagnóstico clínico, a TB pulmonar pode ser confirmada pela Telerradiografia de Tórax (raio-X) e/ou Tomografia Computadorizada de Tórax (Ministério da Saúde, 2019). Na forma primária da TB, o raio-X pode evidenciar lesões periféricas, e aumento de gânglios paratraqueais e hilares. Na maior parte dos pacientes, as lesões regredem e o que se evidencia mais tarde é um nódulo pequeno calcificado. Em crianças e imunocomprometidos, as lesões podem ser mais extensas. Nos casos mais graves, e na forma secundária ou na reativação, podem ser observadas cavitações por necrose tecidual, coalescência de lesões, com pneumonia. Podem ocorrer complicações como fibrose, infecção secundária por outros germes, assim como sangramento por acometimento de vasos da parede das cavitações (Bombarda *et al.*, 2001).

1.1.5.2 Baciloscopia

Como o Mtb é classificado como BAAR, o mesmo pode ser visualizado no microscópio óptico após a coloração de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun (Figura 5), através da fucsina presente no corante (Ministério da Saúde, 2017). As amostras clínicas mais utilizadas são escarro ou lavado brônquio-alveolar (BAL) dos pacientes com suspeita de TB ativa (Ministério de Saúde, 2019). Porém, esta metodologia não difere o Mtb de outras bactérias BAAR-positivas (Ministério da Saúde, 2019). Este método apresenta uma baixa sensibilidade e requer grande quantidade de bacilos (5.000 a 10.000 bacilos/mL de amostra) (Ministério da Saúde, 2008).

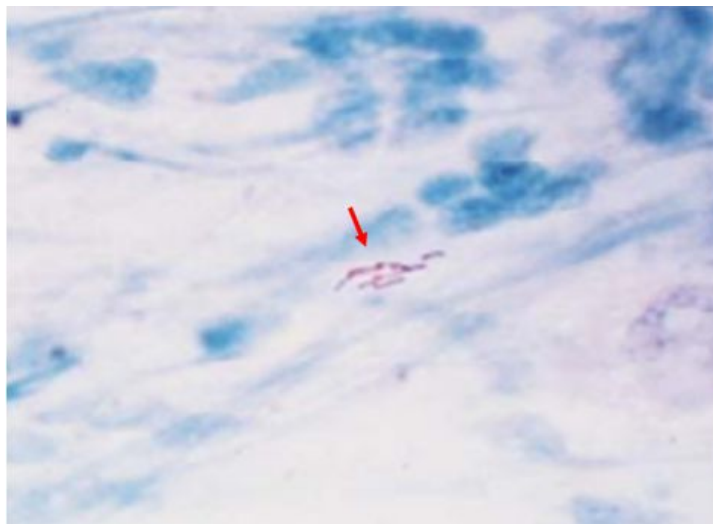


Figura 5: Baciloscopia direta de escarro pelo método de Ziehl- Nelseen. Bacilos álcool ácido resistentes corados pela fucsina (seta vermelha). Fonte: Ministério da Saúde, 2015.

1.1.5.3 Reação tuberculínica

O PPD (do inglês *Purified protein derivative*) é conhecido também como prova tuberculínica, sendo um derivado purificado de fração protéica antigênica do bacilo, além de ter sido idealizado pelo próprio Robert Koch (Luca & Mihaescu, 2013). No Brasil, o PPD utilizado é o lote Rt 23, produzido pelo *Statens Serum Institut*, na Dinamarca (Ministério da Saúde, 2019). A prova tuberculínica é uma reação de hipersensibilidade tardia ou tipo IV intradérmica, que permite saber, em no máximo 72 horas, se o indivíduo teve ou não contato com o bacilo (Ministério da Saúde, 2019). Porém, o PPD não detecta a TB ativa, apenas a LTBI (Ministério da Saúde, 2014). O PPD apresenta baixa especificidade em populações vacinadas com BCG, o que leva a resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas (Ministério da Saúde, 2019).

1.1.5.4 NAATs (do inglês *Nucleic acid amplification tests*)

Os NAATs são testes novos utilizados para o diagnóstico molecular e rápido do complexo *M. tuberculosis* em amostras respiratórias (De Lima et al., 2017). Os testes são do formato PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), sendo o mais utilizado e já implementado no SUS desde 2013, o Gene Xpert MTB/RIF (Pinto et al., 2017). O mesmo possui sensibilidade de 98% e especificidade 68% no subgrupo com esfregaço de escarro BAAR-positivo, e

sensibilidade de 72% e especificidade de 93% no subgrupo esfregaço de escarro BAAR-negativo (Kabir *et al.*, 2021). Ademais, o Gene Xpert MTB/RIF também identifica se há resistência do Mtb a R, o que agiliza o tratamento (Lyon & Rossman, 2017). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Center for Disease Control and Prevention*) dos EUA, sugere que pelo menos uma amostra respiratória seja utilizada no teste molecular no caso de pacientes com TB ativa e baciloscopia negativa (CDC, 2013). Vale ressaltar que apenas um resultado NAAT negativo não é capaz de fechar o diagnóstico de TB pulmonar, sendo necessário a avaliação dos demais testes de diagnósticos, junto à clínica do paciente (Lyon & Rossman, 2017).

1.1.5.5 Cultura

O procedimento de cultura é o método padrão-ouro no diagnóstico de TB ativa (Ministério da Saúde, 2019). O mesmo é feito com amostras clínicas de escarro ou BAL, sendo realizado em 5 etapas: (1) o pré-tratamento das amostras clínicas; (2) fluidificação e descontaminação; (3) semeadura em meio de cultura Lowenstein-Jensen; (4) incubação, e (5) leitura (Ministério da Saúde, 2008). O meio pode ser preparado em tubos ou frascos, e ficar por até oito semanas em refrigeração, tendo em sua composição, o corante verde de malaquita a 2% para que não se tenha crescimento de microrganismos oportunistas (Ministério da Saúde, 2008). A leitura pode ser feita a olho nu. Porém, o tempo de crescimento é lento, podendo variar entre 2 a 8 semanas (Ministério da Saúde, 2019). Logo, esse método é utilizado para fechar o diagnóstico de TB ativa (Ministério da Saúde, 2019). Porém, o paciente recebe o tratamento contra a TB, mediante os resultados dos demais testes realizados (Ministério da Saúde, 2019). O crescimento da cultura de Mtb tem o formato de migalhas de pão ou de couve-flor, acromógena e branco-acinzentada ou amarelo-acastanhada (Figura 6), e são secas (Simeão *et al.*, 2009; Ministério da Saúde, 2019).

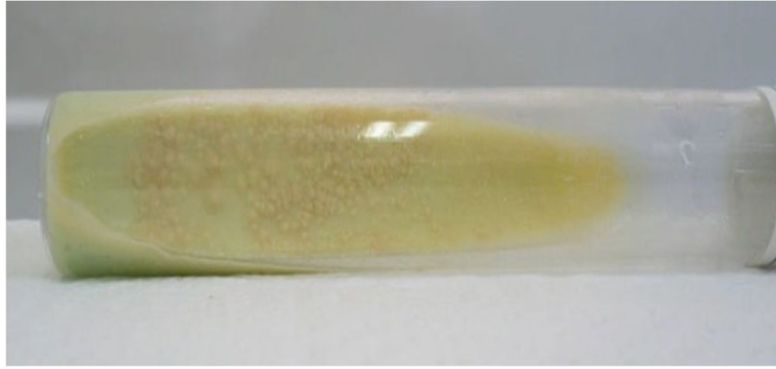


Figura 6: Cultura de Mtb com crescimento em formato de migalhas de pão em meio Lowenstein-Jensen. Fonte: Heemskerk *et al.*, 2015.

1.1.5.6 IGRA (do inglês *Interferon-gamma release assay*)

O IGRA possui fundamento parecido com os testes de ELISA e ELISpot, pois o mesmo detecta IFN- γ secretado por linfócitos T estimulados com antígenos específicos de Mtb (Xu *et al.*, 2018). Assim como o PPD, contudo mais específico, o IGRA não detecta a TB ativa, apenas a LTBI (Xu *et al.*, 2018). O método é amplamente utilizado em países desenvolvidos, requer apenas uma amostra de sangue do paciente, sendo mais vantajoso que o PPD, visto que não há necessidade do retorno do paciente ao hospital para o diagnóstico, e apresenta maior especificidade, podendo ser utilizado para investigação de LTBI (Ministério da Saúde, 2019).

1.1.6 Tratamento

Na sua grande maioria, as estratégias terapêuticas utilizadas contra a TB atuam no sistema enzimático do Mtb ou no bloqueio da síntese de algum metabólito essencial para o crescimento do bacilo (Ministério da Saúde, 2019). Mediante a isso, o esquema terapêutico contra a TB precisa ser regular, com doses adequadas e tratamento sem interrupções, para evitar a seleção de cepas de Mtb resistentes, o que pode ser chamado de resistência adquirida (Ministério da Saúde, 2019).

No Brasil e de forma geral, o tratamento contra TB é dividido em duas fases: a intensiva e a de manutenção (Ministério da Saúde, 2019). No tratamento de adultos e adolescentes na fase intensiva, são utilizados quatro fármacos, sendo eles R, isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E), em doses fixas

combinadas, por dois meses. Isto é mais conhecido como esquema RHZE (Ministério da Saúde, 2019). Após isso, entra a fase de manutenção, que é feita com a administração de RH por quatro meses. As dosagens são elaboradas conforme o peso do paciente (Ministério da Saúde, 2019). Já no tratamento de crianças, a fase intensiva é feita com a administração de RHZ, e a fase de manutenção, com RH (Ministério da Saúde, 2019). Essa diferença entre o esquema terapêutico para adultos e crianças se dá pela menor resistência à isoniazida em crianças, que normalmente são paucibacilares, e ao risco de alteração visuais pelo uso de etambutol (Rabahi *et al.*, 2017). O tratamento pode durar até seis meses, e a alta fica a critério médico, mediante ao acompanhamento da clínica e da negatização da baciloscopia dos pacientes (Ministério da Saúde, 2019). Vale ressaltar que em casos mais graves, como na TB extrapulmonar, outros medicamentos de segunda geração podem ser aplicados, assim como o prolongamento do tratamento (Ministério da Saúde, 2019). Estes fármacos anti-TB de primeira linha e mais tradicionais possuem mecanismos de ação diferentes (Tabela 1).

Tabela 1: Mecanismos de ação dos principais medicamentos anti-TB. Modificado a partir das informações obtidas pelo Ministério da Saúde, 2019.

Fármaco	Atividade	Mecanismo de ação
Rifampicina	Bactericida	Inibição da síntese do DNA bacteriano
Isoniazida	Bactericida	Inibição da biossíntese do ácido micólico
Pirazinamida	Esterelizante	Não possui alvo celular específico, interrompe a produção de energia da membrana celular do bacilo e atua na acidificação do citoplasma dos macrófagos
Etambutol	Bacteriostático	Inibição da síntese da parede celular

1.2 A Vacina BCG

A vacina BCG é um imunizante secular que contém um patógeno vivo atenuado, originado de uma cepa selvagem de *M. bovis* (Flores-Valdez, 2021). Atualmente, esta é a única vacina licenciada e utilizada mundialmente no combate à TB (OMS, 2021). A vacina BCG é preconizada no calendário de vacinação infantil do Programa Nacional de Imunização (Ministério da Saúde, 2014). Esta corresponde ao imunógeno mais amplamente disseminado e aplicado no mundo, com mais de 100 milhões de crianças vacinadas a cada ano, apresentando uma boa relação custo-eficácia no processo de prevenção das formas disseminadas e graves da TB neste grupo de indivíduos (Flores-Valdez, 2021).

1.2.1 Histórico

Após a descoberta da TB, o Dr. Koch tentou isolar o Mtb em filtrados estéreis de culturas *in vitro*, para depois desenvolver o PPD (Luca & Mihaescu, 2013). Infelizmente, não foram obtidos resultados positivos de proteção usando o PPD como imunógeno na população, pois agravou-se a resposta inflamatória em pacientes com a TB ativa, o que foi chamado de Fenômeno de Koch (Luca & Mihaescu, 2013). Estudos continuaram a ser feitos, em busca de uma vacina que tivesse eficácia, sem agravar a patologia encontrada em pacientes com TB ativa (Osborn, 1983; Luca & Mihaescu, 2013).

Em 1902, o médico veterinário Edmond Isidore Etienne Nocard isolou uma cepa virulenta de *M. bovis* de tubérculos bacilares de uma vaca com mastite tuberculosa, o que possibilitou os também franceses Léon Charles Albert Calmette e Jean-Marie Camille Guérin, a utilizarem este *M. bovis* selvagem em suas pesquisas incipientes de vacinas contra a TB (Osborn, 1983). Em 1908, estes dois cientistas começaram o processo de atenuação deste *M. bovis*, através de sucessivas passagens seriadas em meio de bile de carne bovina glicerinado, o que promovia uma melhor aglutinação e replicação entre a cultura de bacilos (Figura 7). As passagens eram feitas de forma periódica, de três em três semanas, o que permitia a gradual perda de virulência do *M. bovis* (Osborn, 1983). Esse processo foi de suma importância, pois o *M. bovis* pode causar uma

zoonose ocupacional, mesmo não sendo um agente etiológico de TB comum em humanos (Saldaña *et al.*,2019). Recentemente, estudos mostraram que o contato humano com bovinos doentes e seus laticínios, sem o devido processo de pasteurização, podem promover a TB por *M. bovis* em indivíduos imunocompetentes (Saldaña *et al.*,2019).

Em 1913, Calmette e Guérin estavam prontos para iniciar o ensaio de vacinação em bovinos e várias espécies de macacos (Calmette, 1931). Porém, isso foi postergado devido ao início da Primeira Guerra Mundial (Calmette, 1931). Apenas em 1919, após 230 passagens nos 13 anos que se passaram, que ambos conseguiram testar seu produto em animais, e os mesmos não desenvolveram a TB progressiva (Calmette, 1931). Os cientistas assumiram que os bacilos cultivados mantiveram sua capacidade antigênica, e que não apresentavam riscos de infecção em humanos (Calmette, 1931). Então, batizaram a cepa de Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Em 1921, aconteceu a primeira vacinação pelo Dr. Weil-Hale no Hospital Charité em Paris: Um recém-nato foi imunizado com 6mg de BCG, por via oral (Luca & Mihaescu, 2013). A sua mãe havia morrido de TB, e após a vacinação, o bebê não desenvolveu a doença (Luca & Mihaescu, 2013). Entre 1924 e 1928, cerca de 114.000 crianças foram vacinadas e não tiveram complicações graves (Luca & Mihaescu, 2013). Isso se refletiu na queda brusca da taxa de mortalidade de bebês expostos a TB, comprovando que o método de vacinação com BCG era eficiente e seguro (Luca & Mihaescu, 2013).



Figura 7: Fotografia de aspectos históricos no museu do Instituto Pasteur de Lille, França. Camille Guérin nos quadros central e direito.. Fonte: Acervo particular do orientador.

Na década de 1930, um trágico mal-entendido aconteceu em Lubeck, na Alemanha, que afetou a confiança na vacina BCG (Luca & Mihaescu, 2013). A mesma estratégia de vacinação com a BCG cedida pelo Instituto Pasteur em recém-nascidos foi protocolada, porém, a preparação para a administração por via oral acontecia no laboratório de TB local. Depois de um pouco mais de um mês, muitas crianças desenvolveram a TB ativa, e em cerca de 250 vacinados, 73 morreram pela contaminação cruzada com uma cepa de Mtb (Luca & Mihaescu, 2013). Até o desfecho ter sido investigado e compreendido, Calmette e Guérin foram vítimas de críticas. Calmette morreu em 1933, triste e desanimado após este incidente na Alemanha. Apenas quando o relatório do inquérito alemão foi liberado, concluiu-se que a causa das mortes não era a

vacinação com BCG, eximindo ambos da responsabilidade (Luca & Mihaescu, 2013).

No Brasil, a vacina BCG chegou pelas mãos do médico uruguaio Julio Elvio Moreau, a partir da distribuição mundial feita pelo Instituto Pasteur de Paris (Benévolo-De-Andrade *et al.* 2005). Em 1925, esta cepa foi entregue ao pesquisador baiano Arlindo Raimundo de Assis, no Rio de Janeiro (Benévolo-De-Andrade *et al.* 2005). Com isso, a mesma foi batizada de BCG Moreau RDJ. Já em 2012, a vacina BCG Moreau foi aprovada pela OMS como uma das cepas de referência mundial, junto a Dinamarquesa, a Japonesa e a Russa, a qual vinha sendo produzida pela Fundação Atauípho de Paiva (FAP), sendo considerada uma das cepas de BCG mais imunogênicas no mundo, e possuindo o menor índice de reações adversas (Dagg *et al.*, 2014). Apesar de raras, as reações adversas podem estar atreladas às diferentes cepas da vacina BCG e suas modificações, a carga bacilar viável no lote, os procedimentos de vias de administração, e principalmente, à condição imunológica do indivíduo (Ferkvand *et al.*, 2020). Sobre as reações adversas locais, pode-se incluir abscesso subcutâneo, queloides e lesões cutâneas (Ferkvand *et al.*, 2020). Em casos mais graves, quadros de osteíte e osteomielite podem ser associados a doença por BCG, a chamada BCGite, que pode evoluir para BCGose (1,56- 4,29 de casos em 1 milhão de vacinados), esta última se trata da infecção disseminada, que pode ser letal (Kourime *et al.*, 2016). Por se tratar de uma vacina atenuada, a BCG não deve ser administrada em pacientes imunocomprometidos, pois os mesmos são mais suscetíveis aos efeitos adversos supracitados (Ferkvand *et al.*, 2020).

1.2.2 Variedade genética

Apesar da vacina BCG ser o único imunógeno com eficácia comprovada contra a TB severa em crianças, existem variáveis que influenciam nessa eficácia contra a doença pulmonar em adultos (Moliva *et al.*, 2017). Dentre elas, estão os fatores ambientais, operacionais, demográficos e genéticos, atrelados tanto com a manufatura da vacina no processo de subcultivos do lote semente até o envase, quanto à população local (Moliva *et al.*, 2017). Como exemplo, a

exposição prévia a micobactérias ambientais (NTM) comprometem a proteção conferida pelo BCG (Moliva *et al.*, 2017). Ademais, a distribuição das cepas filhas pelo globo, e consecutivas passagens seriadas com diferentes metodologias, podem influenciar na eficácia da vacina BCG (Moliva *et al.*, 2017).

Após 1921, o Instituto Pasteur de Paris distribuiu a cepa *M. bovis* BCG Pasteur original para os demais países (Osborn, 1983). A sua recomendação de cultivo seria no meio biliar glicerinado original (Osborn, 1983). Porém, cada laboratório configurou os métodos de cultivo conforme as suas necessidades. A critério de exemplificação, as vacinas BCG Japonesa e BCG Dinamarquesa se enquadram nessas adaptações: A cepa Japonesa permanece utilizando o meio biliar glicerinado, porém na forma liofilizada, e a BCG Dinamarquesa adotou o meio de Sauton, também na forma liofilizada (Osborn, 1983). Essas diferenças no cultivo implicam em alterações genéticas e genotípicas, e conseqüentemente, na eficácia da vacina BCG (Zhang *et al.*, 2013). Estudos já mostraram que a BCG Japonesa é mais eficaz do que a BCG Dinamarquesa (Zhang *et al.*, 2013). Outro exemplo são as alterações genéticas atribuídas a uma mesma cepa de BCG em diferentes países, uma questão demográfica (Zhang *et al.*, 2013). Isso já foi visto em um estudo comparativo com a BCG Moreau utilizada no Brasil, e esta cepa também utilizada na Polônia, evidenciando variações genéticas mínimas entre as cepas, mas correlacionando possivelmente as diferentes condições de cultivo e demográficas de cada localidade (Zhang *et al.*, 2013).

A partir de estudos genômicos comparativos entre as cepas da vacina BCG foi possível identificar regiões de diferença (RD, do inglês *Region of difference*), as quais possuem deleções, inserções e polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), de acordo com a cepa de estudo (Zhang *et al.*, 2013). Devido ao processo de atenuação, houve uma primeira deleção da RD-1 na vacina BCG (Zhang *et al.*, 2013). Importaneamente, a RD-1 codifica proteínas imunodominantes que fazem parte do sistema de secreção ESX-1, como ESAT-6 e CPF-10 (Krishnan *et al.*, 2010). No entanto, a RD-1 é preservada em *Mtb*, sendo responsável por gerar transcritos para estas duas proteínas, as quais possuem epítomos de reconhecimento para linfócitos T e B (Krishnan *et al.*, 2010). Esses epítomos são importantes para o reconhecimento antigênico dos linfócitos e desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa contra o *Mtb* (Pym *et al.*, 2003). Acredita-se

que a vacina BCG mais imunogênica seria a BCG Japonesa, pois a mesma possui maior número de epítomos conservados (Brosh *et al.*,2007; Zhang *et al.*, 2013). As vacinas BCG podem ser classificadas em cepas iniciais (Japonesa, Norueguesa, Sueca, Russa e Moreau) e as demais cepas tardias (Brosh *et al.*,2007). Essa classificação genealógica foi possível devido ao número de passagens e semelhanças com a cepa BCG Pasteur original, perdida nos bombardeios nazistas na França, sendo as iniciais as cepas mais conservadas (Brosh *et al.*,2007; Zhang *et al.*, 2013) (Figura 8).

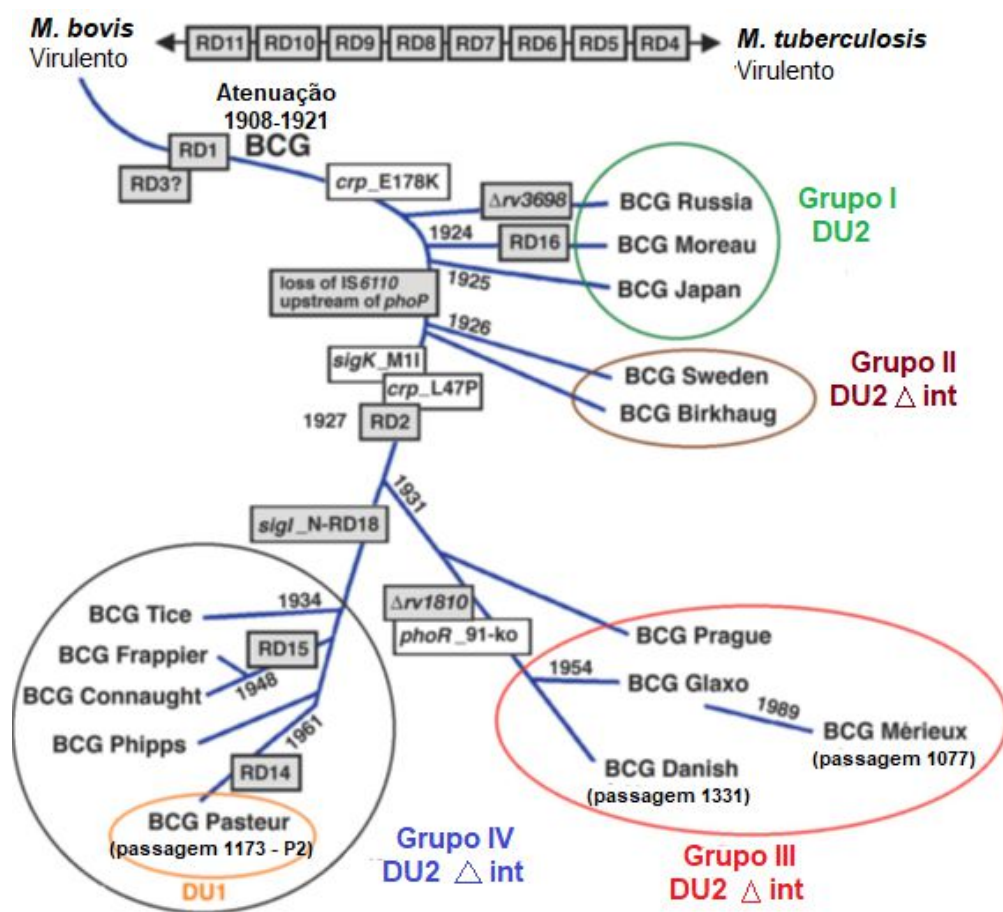


Figura 8: Árvore genealógica da vacina BCG. O esquema denota os marcadores genéticos, as regiões de deleções (RD) e a distribuição das vacinas em quatro grupos, de acordo com as regiões conservadas. A vacina BCG Moreau se enquadra no Grupo I, por possuir maior similaridade com a cepa BCG Pasteur original. Imagem adaptada. Fonte: Brosch *et al.*,2007.

1.2.3 Imunidade heteróloga

A vacina BCG possui grande importância no contexto de saúde pública, não apenas pela imunidade parcial conferida contra a TB pulmonar, mas também pela imunidade total contra ambas TB miliar e meníngea (Covián *et al.*, 2019).

Os monócitos de indivíduos sadios vacinados com BCG, produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, quando estes são estimulados *ex vivo* com outros patógenos não-relacionados (Covián *et al.*, 2019). Esse perfil de citocinas inflamatórias vem acompanhado pela alteração a longo prazo no fenótipo das células imunes inatas (Arts *et al.*,2018). Há uma reprogramação transcricional, epigenética e metabólica nas células mieloides primadas, acreditando-se que exista uma indução de memória imune inata, e que provavelmente, essas células reprogramadas residam na medula óssea (Arts *et al.*,2018). Esse mecanismo é denominado imunidade treinada, e o mesmo confere a capacidade da vacina BCG de induzir uma proteção agonística inespecífica contra outras doenças e infecções (Fristchi, Curtis e Ritz, 2020).

Ensaio clínico randomizados, evidenciaram que a taxa de mortalidade infantil causada por sepse, febre e infecções respiratórias, foi reduzida em crianças vacinadas com BCG ao nascer (Moorlag *et al.*, 2018). Assim, um estudo comparativo em Guiné-Bissau com 772 crianças menores de cinco anos, aquelas não vacinadas com BCG tinham maior probabilidade de terem infecções respiratórias, as quais são as principais causas de morte neste grupo, comparadas com as crianças imunizadas (Fristchi, Curtis e Ritz, 2020). Este ensaio clínico reforçou a noção de que a vacina BCG também possui efeitos cruzados ou inespecíficos significativos contra as NTM (Fristchi, Curtis e Ritz, 2020). Essa característica foi chamada de imunidade heteróloga (Cirovic *et al.*, 2020). Já estudos *in vivo* mostraram que a vacina BCG pode apresentar proteção inespecífica também para doenças virais, como influenza (Leentjens *et al.*,2015) e herpes simplex (Anderson, Ushijima e Larson, 1974). Em outro estudo, foi visto que os indivíduos que foram imunizados com a vacina BCG apresentaram menores cargas virais para o vírus amarelo, quando comparados ao grupo placebo (Moorlag *et al.*, 2019). Recentemente, mediante a pandemia de COVID-19, foi questionada a possibilidade da vacinação com BCG promover uma proteção heteróloga contra o Sars-Cov-2, ou mesmo amenizar a sintomatologia dos casos graves da COVID-19 (O'Neill LAJ, Netea MG, 2020; Sharma, 2021; Armirlak *et al.*,2021). Assim, o estudo clínico BRACE com profissionais de saúde revacinados ou não com a vacina BCG na Austrália, Reino Unido, Espanha,

Holanda e Brasil foi realizado, para verificar se há uma resposta imune protetora e inespecífica contra o Sars-Cov-2 (Pittet *et al.*,2021; Messina *et al.*,2022). Com isso, resultados *in vitro* mostraram que a vacina BCG foi capaz de reduzir a produção de IL-6, TNF e IL-10, estas associadas ao quadro grave de COVID-19 (Pittet *et al.*,2021; Messina *et al.*,2022). Ademais, a vacina BCG também induziu um fenótipo de memória efetora nos linfócitos T CD4 e T CD8 em resposta ao Sars-Cov-2 (Messina *et al.*, 2022).

A vacina BCG também tem se mostrado importante no tratamento de doenças não infecciosas, como o câncer de bexiga e o melanoma, o que pode estar atrelado a capacidade deste imunógeno em ativar a via de sinalização da caspase 8 (iniciadora) da apoptose extrínseca em células tumorais, após a ativação do receptor do tipo *toll* (TLR) 7 (Han, Gu e Li, 2020). Ademais, estudos já demonstraram que a vacina BCG pode conferir proteção contra doenças autoimunes, como asma alérgica (El-Zein *et al.*, 2017), diabetes do tipo I (Doupis *et al.*, 2021) e esclerose múltipla (Nakken *et al.*, 2022), apesar de não se saber ao certo por quais mecanismos isso aconteceria (Kowalewicz-Kulbat & Loch, 2017).

1.2.4 Resposta imune frente a vacina BCG

De forma simplificada, a resposta imune frente a vacinação com BCG se inicia no local de inoculação deste imunógeno, normalmente pela via intradérmica em recém-natos (Covián *et al.*,2019). Observa-se ativação de uma resposta imune inata, mediada por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DC) residentes, os quais reconhecem o BCG através de PRRs, incluindo TLR 2/4 (Covián *et al.*,2019). Os macrófagos e as DCs fagocitam os bacilos e produzem citocinas inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IL-6, ativando mais células imunes (Covián *et al.*,2019). Os bacilos são degradados por mecanismos intracelulares, e seus antígenos são processados e transportados junto aos MHC I e II para a membrana plasmática das células apresentadoras de antígeno (Covián *et al.*,2019). O início desta resposta imune adaptativa se dá justamente pela ativação das DCs, as quais adquirem capacidade migratória, caracterizada por um aumento de moléculas coestimulatórias, como CD80, CD40, CD83 e CD86 (Moliva, Turner e Torreles, 2017). Por via linfática, as DCs chegam aos

órgãos linfóides secundários e lá, as mesmas apresentam os antígenos e ativam as células imunes específicas (Moliva, Turner e Torreles, 2017). Os linfócitos T CD4 e T CD8 são assim ativados e migram para o sítio de inoculação do imunógeno, produzindo IFN- γ , e ativando mais macrófagos (Figura 9). O IFN- γ também participa da ativação de linfócitos B e a sua consequente maturação em plasmócitos (Moliva, Turner e Torreles, 2017). No intervalo de 4 a 8 semanas após a vacinação com BCG, há um aumento de produção de anticorpos IgG e de linfócitos B de memória de longa duração (Moliva, Turner e Torreles, 2017). Essas IgG podem opsonizar o BCG e o Mtb, favorecendo a fagocitose e inibição do crescimento bacteriano (Moliva, Turner e Torreles, 2017).

1.3 Morte celular

1.3.1 “*Memento Mori*, lembre-se que você também vai morrer”

No contexto de organismos multicelulares, seria correto afirmar que há uma necessidade em manter a homeostase entre o número de células recém-criadas *versus* o número de células danificadas que necessitam ser removidas (D'Arcy, 2019). O equilíbrio entre esses dois mecanismos é importante, visto que a exposição a danos e o constante desenvolvimento do organismo, tornam mandatório a intensa reposição celular (Keer *et al.*, 1972; D'Arcy, 2019). Em 1842, esse entendimento foi historicamente iniciado pelo cientista, filósofo, popularizador da ciência e político alemão August Christoph Karl Vogt, ao observar células de sapos morrendo (Green, 2019). Apesar da morte por necrose (do grego, “*matar*”) já ter sido descrita desde o século XIX (Green, 2019), a morte celular passou a ser mais bem compreendida apenas em 1972, quando os patologistas John Foxton Ross Kerr, Andrew David Hamilton Wyllie e Alastair Robert Currie cunharam o termo apoptose (do grego, “*folhas caindo*”) como uma forma de morte celular programada, com características diferentes das células necróticas (Kerr *et al.*, 1972). Mediante a isso, a morte celular pode ocorrer de forma acidental, sendo um processo não controlado, como acontece em resposta a uma lesão ou algum estresse oxidativo, ou de forma regulada ou programada, a qual envolve ativação de cascatas de sinalização e mecanismos efetores, devidamente alinhavados (Tang *et al.*, 2019).

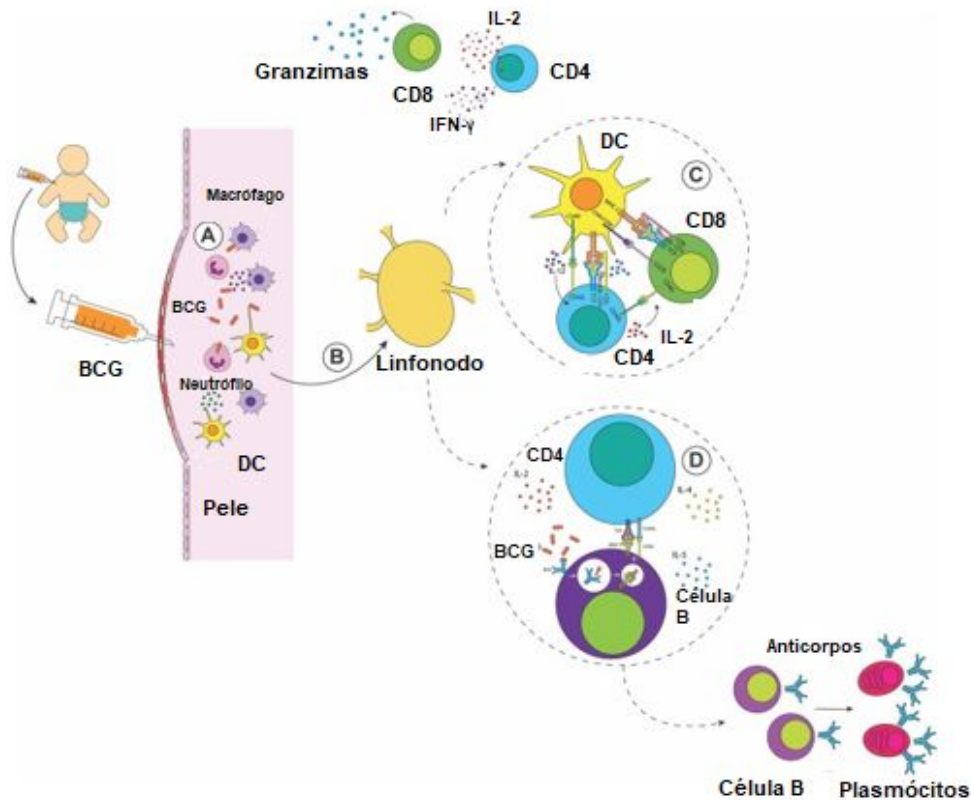


Figura 9: Resposta imune em indivíduos vacinados com BCG. A vacina BCG é administrada em recém-natos pela via intradérmica. (A) O BCG é reconhecido pelas células imunes inatas locais, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs). (B) Após o reconhecimento, as DCs da pele ativadas migram para os linfonodos para ativar células imunes específicas (C) Dessa forma, há ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ específicos e com perfil Th1, secretando quantidades elevadas de IL-2, TNF, IFN- γ e granzimas (D) Nos linfonodos, há ativação de linfócitos B, geração de células de memória e plasmócitos, que permitem a produção de anticorpos antígeno-específicos em resposta à presença de antígenos do BCG. Após sua ativação, as células T e B de memória residem nos linfonodos. Imagem adaptada. Fonte: adaptado de Covián, *et al.*, 2019.

Inicialmente, os padrões para a diferenciação de células necróticas *versus* células apoptóticas, eram predominantemente morfológicos (Kerr *et al.*, 1972; Schweichel & Merker, 1973; Tang *et al.*, 2019). Em 1973, uma nova classificação de morte celular em três grandes grupos foi determinada, baseada em tecidos embrionários de ratos, frente a indução de morte com substâncias embriotóxicas, sendo eles: (i) tipo I, caracterizado pela condensação do núcleo e citoplasma (picnose), bolhas na membrana, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA (cariorrexe); (ii) tipo II, caracterizada pelo envolvimento da autofagia, com formação de autofagossomos e consequente vacuolização; e (iii) tipo III, referindo-se a perda da integridade da membrana e inchaço celular, ou em outras palavras, a necrose, que inicialmente acreditava-se acontecer exclusivamente de forma não controlada (Schweichel & Merker, 1973; Tang *et*

al.,2019). Com o advento dos marcadores bioquímicos de apoptose na década de 1980, foi possível abranger os conhecimentos sobre os tipos de morte celular propostos (Green, 2019).

Ao longo dos anos, estudos têm mostrado que existem diversos tipos de morte celular programada, e diferente do que se acreditava onde apenas a apoptose era comandada dessa forma, hoje sabe-se que existem diversos mecanismos não apoptóticos programados (Figura 10). Dentre esses, incluem-se a necroptose, a piroptose e a ferroptose, os quais estão cada vez mais bem descritos em várias patologias humanas (Tang *et al.*, 2019; Green, 2019; Legrand *et al.*, 2019). Apesar de descrevermos cada tipo de morte celular como se atuassem de forma independente e isolada, em uma célula que possui diversas cascatas de sinalização de morte, a comunicação entre as vias se torna essencial (Legrand *et al.*,2019). Logo, a compreensão de cada tipo de morte celular e como se comunicam, podem revelar novos alvos terapêuticos em diversas doenças (Tang *et al.*,2019).

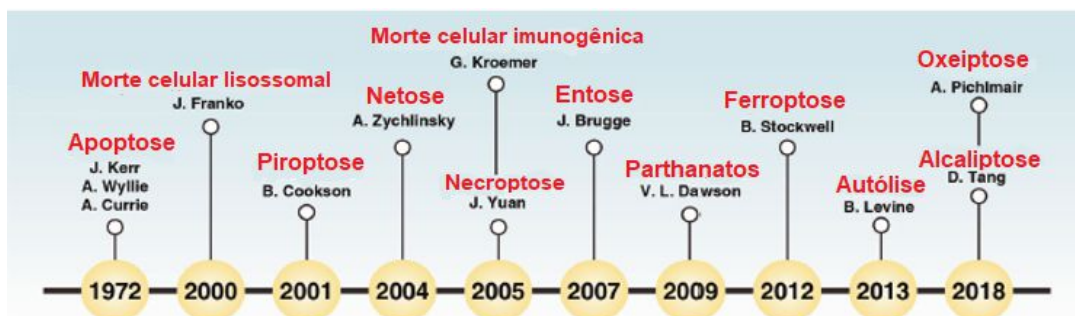


Figura 10: Linha do tempo do descobrimento de diferentes tipos de morte celular. Imagem adaptada. Fonte: adaptado de Tang *et al.*,2019.

No contexto imunológico, a morte celular pode ser imunogênica, tolerogênica ou silenciosa (Ryan, Sullivan e Keane, 2011). De forma clássica e por definição, a morte celular imunogênica é um mecanismo protetor, em um primeiro momento inato, contra infecções por patógenos, através da interação entre os PRRs das células hospedeiras e os PAMPs dos patógenos (Legrand, et al.,2019). Mediante a isso, há a produção de sinais de alerta do hospedeiro, mediados por citocinas, que levam as células infectadas à morte programada (Legrand, et al.,2019). Porém, de acordo com a qualidade de interação entre célula hospedeira/patógeno, a morte celular induzida pode ser não imunogênica,

como é o caso da necrose (Legrand, et al.,2019). Posteriormente, as células que morrem emitem sinais de alerta, do tipo “encontre-me e coma-me”, para atrair fagócitos, além de produzir Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs - do inglês *Damage-associated molecular patterns*). Importaneamente, a ativação de uma resposta imune inata através da morte celular imunogênica, regula ativamente a resposta imune adaptativa (Yatin, Cullen e Albert, 2017). De fato, o tipo de morte induzido nas células hospedeiras frente a infecções, molda a resposta do sistema imune no combate e na formação de uma imunidade protetora (Ryan, Sullivan e Keane, 2011).

1.3.2 Morte Celular por Extravasamento

A necrose é um tipo de morte celular alternativo não controlado, caracterizado pela indução abrupta de dano na membrana plasmática, assim como hipoxia e inflamação, e conseqüentemente, ao dano tecidual (D'Arcy MS, 2019). As células necróticas apresentam inchaço de mitocôndrias e de retículo endoplasmático, e dano irreparável de membrana plasmática (Nikoletopoulou *et al.*,2013; D'Arcy MS, 2019). Liberam proteínas que notificam dano nuclear e reparo fibroso, como a proteína não-histona e presente no núcleo HMGB1, bem como HDGF que possui atividade mitogênica sobre fibroblastos, o que estimula uma resposta inflamatória (Nikoletopoulou *et al.*,2013). Ademais, as mitocôndrias das células necróticas liberam ATP, o que impulsiona a ativação do inflamassoma NLRP3, e a liberação da proteína citosólica indutora de ativação de inflamassoma, ambos resultando na liberação de IL-1 β , sem ativação de caspase-1 (Nikoletopoulou *et al.*,2013).

Estudos já têm mostrado a necroptose como uma forma de necrose altamente regulada, que foge do conceito de morte celular acidental (Nikoletopoulou *et al.*,2013; D'Arcy MS, 2019). Logo, a necroptose ocorre em situações em que a apoptose é deficiente, sendo ativada por RIP1 (do inglês *receptor-interacting serine/threonine kinase 1*) e RIP3 (do inglês *receptor-interacting serine/threonine kinase 3*) (D'Arcy, 2019; Liu *et al.*,2019). Tanto a apoptose quanto a necroptose são reguladas pelas vias de caspase e ubiquitinação (Liu *et al.*,2019). O receptor de morte (DR) mais envolvido na

necroptose é o TNFR1, porém receptores de TRAIL e Fas também podem desencadear esse tipo de morte celular (D'Arcy, 2019; Liu *et al.*, 2019).

No contexto de infecções, estudos mostram que micobactérias virulentas induzem morte celular por necrose com maior frequência, do que cepas atenuadas (Danelishvili *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Isso pode ser observado na patogênese de Mtb, o qual consegue manipular a forma e o tempo de morte da célula hospedeira, através da inibição da apoptose e de estimulação da necrose (Keane, Remold e Kornfeld, 2000; Arnett *et al.*, 2018). Porém, estudos em murinos mostraram que o Mtb possui manobras reguladas para induzir morte nas células hospedeiras, de forma a iniciar estímulos apoptóticos, e terminar em uma possível necroptose (Butler *et al.*, 2017). Em contrapartida, em um estudo transversal com pacientes com TB ativa, foi possível detectar somente níveis menores de apoptose pela menor expressão de FADD e lesões teciduais associadas, sem detecção da RIP3, o que não sugeriria necroptose para os autores (Yanti *et al.*, 2020). Estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos murinos, mostraram que a necrose associada à infecção por Mtb está correlacionada à desregulação da peroxidação lipídica, e consecutivo acúmulo de ferro livre, o qual é sugestivo de ferroptose, outra morte celular programada que leva a lise de membrana plasmática (Amaral *et al.* 2019).

1.3.3 Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada, que não envolve rompimento de membrana plasmática, e consequente extravasamento do material citoplasmático (Xu, Lai and Hua, 2019). A mesma é dependente da ativação de proteases, conhecidas como caspases, mediante aos estímulos indutores (Xu, Lai and Hua, 2019). A apoptose pode ser classificada em suas vias extrínseca e intrínseca (Xu, Lai and Hua, 2019) (Figura 11).

A apoptose extrínseca é mediada por DRs do tipo homotrímico localizados nas membranas plasmáticas (Albert *et al.*, 2007; Green, 2019; Tang, 2019). Os DRs são pertencentes à Superfamília dos Receptores de TNF, sendo os mais bem descritos: Fas (CD95), TNFR1 (CD120a) e os receptores de TRAIL (TRAILR1/DR4/CD261 e TRAILR2/DR5/CD262). Aqui, uma opção foi eleita para

exemplificar o desencadeamento da apoptose extrínseca mediada por Fas (Albert *et al.*,2007; Green, 2019; Tang, 2019), por ser mais didática: Após a interação do FasL (CD95L), um ligante cognato presente na membrana plasmática de linfócitos, e o seu receptor Fas (CD95) da célula alvo, a porção citosólica deste recruta a molécula adaptadora FADD (do inglês *Fas-associated death domain*). Por sua vez, FADD recruta pró-caspases 8 e 10 (iniciadoras), formando o complexo DISC (do inglês *Death-inducing signalling complex*). No interior de DISC, a aproximação das duas pró-caspases possibilita a sua ativação e clivagem. Agora, ambas clivam pró-caspases 3 e 7 (executoras), desencadeando uma cascata de clivagens consecutivas, finalmente resultando na apoptose. O processo de regulação dessa via conta com a participação de proteínas anti-apoptóticas, como C-FLIP (Albert *et al.*,2007; Green, 2019). A C-FLIP se assemelha estruturalmente com as pró-caspases iniciadoras (Albert *et al.*,2007; Green, 2019). Porém, esta não possui o domínio proteolítico, ou seja, sua ação seria por competição a FADD, impossibilitando a formação do DISC, e desencadeamento da apoptose (Albert *et al.*,2007; Green, 2019).

A apoptose intrínseca é conhecida também como via mitocondrial (Kile, 2009; Kashyap, Garg e Goel, 2021). Este mecanismo está relacionado ao estresse celular e à desregulação da integridade mitocondrial (Kile, 2009; Kashyap, Garg e Goel, 2021). Estímulos como injúria, degradação de DNA ou distúrbio de oxigênio, podem ativar essa via (Kile, 2009; Kashyap, Garg e Goel, 2021). A apoptose intrínseca possui o citocromo C como componente fundamental, pois ao ser liberado no citosol, o mesmo ativa a proteína adaptadora de ativação de pró-caspase (Apaf1), desencadeando a formação do apoptossomo (Kile, 2009; Kashyap, Garg e Goel, 2021). Mediante a isso, ocorre o recrutamento da pró-caspase 9 (iniciadora), ativando em cascata outras caspases e levando a célula à morte (Kile, 2009; Kashyap, Garg e Goel, 2021).

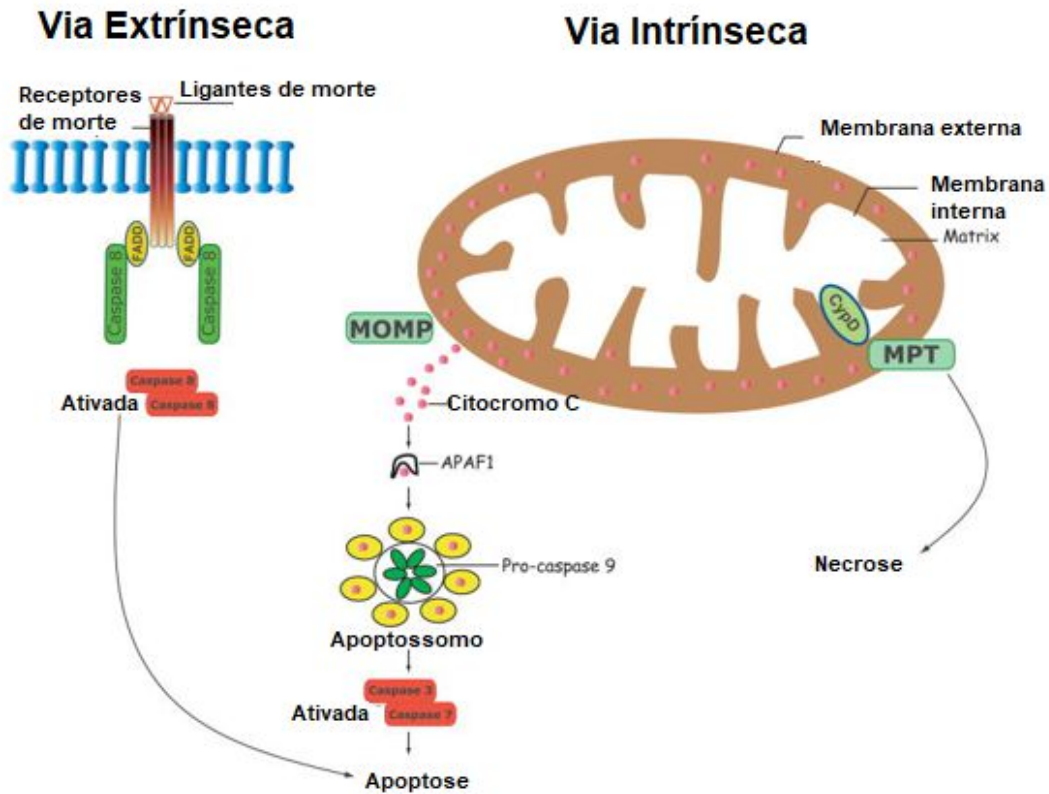


Figura 11: Vias extrínseca e intrínseca de apoptose. A apoptose pode ser ativada por mediadores extrínsecos (como TNF, FasL e TRAIL) e por mediadores intrínsecos (como o distúrbio mitocondrial e consequente liberação do citocromo C). A indução da via extrínseca culmina na ativação de caspase 8 e a apoptose. Já na via intrínseca, há formação do complexo apoptossomo, e ativação de caspases, principalmente a caspase 9, levando a célula a apoptose. Ambas as vias culminam na ativação das caspases 3 e 7 (efetoras) da apoptose. Imagem adaptada. Fonte: Divangahi, Behar e Remond, 2013.

A literatura demonstra que as vias extrínseca e intrínseca da apoptose se comunicam para a amplificação do sinal apoptótico, como a convergência da ativação da caspase 3 (Xu, Sui and Fan, 2019). A caspase 3 é uma das proteases mais relacionadas à apoptose, e desencadeia as características morfológicas e nucleares observadas, como a fragmentação do DNA e as bolhas na membrana (Al-Aamari *et al.*,2021).

1.4 Superfamília TNF

A Superfamília TNF é formada por ligantes e receptores de superfície celular cognatos, podendo desencadear sinais de sobrevivência, morte e diferenciação celular (Ware, 2011; Croft & Siegel, 201). Acredita-se que a Superfamília TNF é composta por 19 proteínas, que transduzem sinais a 29 receptores (Ware, 2011; Croft & Siegel, 201). Os ligantes são trímeros que possuem os domínios C-terminais conservados (cerca de 20-30% de homologia

entre os membros), o que possibilita o reconhecimento pelos receptores (Ware, 2011; Croft & Siegel, 201). Já os receptores possuem em comum os abundantes domínios de cisteína e pontes dissulfeto (Ware, 2011; Croft & Siegel, 201). Apesar da vasta composição de receptores, os melhores estudados são Fas (CD95), que possui como ligante cognato o FasL (CD95L); TNFR1 (CD120a), que possui como ligante cognato o TNF e, TRAILR1 (DR4/CD261) e TRAILR2 (DR5/CD262), que possuem como ligante cognato, o TRAIL (CD253) (Ware, 2011; Croft & Siegel, 2017).

1.4.1 FAS-FASL

O Fas (CD95) é uma glicoproteína transmembrana do tipo I de 40-50 kDa, composta por 319 aminoácidos, sendo expresso em diversos tipos celulares (Gallo & Legembre, 2017). Estudos moleculares mostraram que deleções entre os nucleotídeos 700 e 702, resultam na transcrição de mRNA da forma solúvel de Fas (sFas), sem a região de ancoragem transmembrana (Gallo & Legembre, 2017). Já o FasL (CD95L) é uma proteína transmembrana do tipo II, e possui um grande domínio citoplasmático, o que possibilita a homotrimerização com o seu receptor, sendo expresso principalmente em linfócitos T e células NK (Gallo & Legembre, 2017). O FasL também é encontrado na forma solúvel (sFasL), sendo visto como marcador importante na inflamação (Cui *et al.*, 2010; Guégan & Legembre, 2018).

A ação biológica mais bem descrita sobre a interação de Fas e FasL é a indução do recrutamento da proteína adaptadora FADD e das caspases iniciadoras, principalmente a caspase 8, formando o complexo DISC e sinalização apoptótica (Levain, Jean e Legembre, 2020) Porém, estudos demonstram que sFasL ao se ligar a Fas, ativa a via IAP1/2 dependente, o que desencadeia a produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6, IL-8, MCP-1 e GM-CSF, que estão envolvidas na quimiotaxia, fagocitose e no processo de eferocitose, o que é importante na interação entre as respostas imunes inata e adaptativa (Budak *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2010; Guégan & Legembre, 2018). Isso é possível, pois a ligação de sFasL ao seu receptor cognato, impossibilita o recrutamento de FADD e a formação do complexo DISC, devido a sua conformação protéica (sFasL é um homotrímetero, e o FasL é um multiagregado

de homotrímeros), o que resulta na ativação e na migração celular, sendo relacionado aos maiores riscos de câncer e de doenças autoimunes (Wallach-Dayán *et al.*,2021). No contexto infeccioso, sFasL pode atuar como um quimioatraente de polimorfonucleares ao sítio da infecção, induzindo a liberação de ROS e progressão da resposta inflamatória (Cheng *et al.*,1994; Kajikawa *et al.*,2021). Porém, sFasL não é um bom indutor de apoptose (Cheng *et al.*,1994), e isso está associado à região N-terminal de 26 aminoácidos, que é perdida na clivagem pelas metaloproteases (Kajikawa *et al.*,2021). Já sFas, é uma possível ferramenta para retardar a apoptose, pois possui a capacidade de se ligar ao FasL transmembranar, impedindo a ligação com o Fas e ativação da cascata apoptótica (Guégan & Legembre, 2018; Levoín, Jean & Legembre, 2020). Mediante à isso, ambas formas sFas e sFasL não desempenham os mesmos papéis apoptóticos que as formas Fas e FasL, o que implica na regulação imunológica e inflamatória (Guégan & Legembre, 2018; Levoín, Jean & Legembre, 2020).

1.4.2 TNF-TNFR1

O TNF é uma proteína transmembrana glicosilada, com aproximadamente 17 kDa, sendo produzido por macrófagos, células NK e linfócitos T (Okuda & Sakumoto, 2003). O TNF possui um importante papel pró-inflamatório (Okuda & Sakumoto, 2003). Porém, este também atua em outras funções biológicas, como diferenciação celular, remodelamento tecidual e coagulação (Okuda & Sakumoto, 2003). Em resumo, tudo irá depender do estímulo e da sinalização, visto que a desregulação de TNF pode acarretar em complicações patológicas (Okuda & Sakumoto, 2003).

O TNF é gerado a partir da clivagem do TNF transmembranar pela enzima TACE (Horiuchi *et al.*,2010). Acredita-se que tanto TNF transmembranar, quanto TNF, são capazes de desencadear ações inflamatórias (Horiuchi *et al.*,2010). A ligação do TNF com TNFR1, induz o recrutamento da proteína adaptadora TRADD e da quinase RIPK1, ocasionando uma mudança de conformação e formação do complexo 1 (Horiuchi *et al.*,2010). Este complexo é uma plataforma de sinalização que induz a transcrição de genes pró-sobrevivência (Horiuchi *et al.*,2010). O processo de montagem do complexo 1 é determinante para o

destino da célula, pois caso haja algum defeito na sua conformação, a mesma poderá seguir para a morte celular, que pode ser apoptótica ou necrótica (Horiuchi *et al.*,2010). Ademais, TNF transmembranar pode atuar como ligante e como “receptor” ao se ligar aos receptores cognatos, possibilitando a comunicação célula-célula, e a transdução de sinal, o que contribui para que o TNF transmembranar seja importante no contexto da inflamação local (Horiuchi *et al.*,2010).

1.4.3 TRAIL-TRAILR1/TRAILR2

Um outro eixo apoptótico é composto por TRAIL (CD253), uma proteína transmembrana do tipo II composta por 281 aminoácidos, com aproximadamente 32 kDa (Yuan *et al.*,2018). Inicialmente, o TRAIL é expresso na região transmembranar de vários tecidos humanos, tanto epiteliais, quanto em células do sistema imune, como células NK, monócitos e DCs (Yuan *et al.*,2018). Assim como o FasL, TRAIL pode ser liberado (Yuan *et al.*,2018). Porém, tanto TRAIL, quanto TRAIL transmembranar, são capazes de induzir ativação de seus receptores cognatos, como TRAILR1 (DR4/CD261), TRAILR2 (DR5/CD262), TRAILR3 (DcR1/CD263), TRAILR4 (DcR2/CD264) e osteoprotegrina (Yuan *et al.*,2018). Vale salientar que isto ocorre de forma diferente de FasL, apesar de ambos os ligantes terem os maiores níveis de homogeneidade entre os componentes da superfamília TNF (R Yuan *et al.*,2018). Os receptores mais estudados e comuns na ativação apoptótica por TRAIL são TRAILR1 e TRAILR2, os quais são proteínas transmembrana do tipo I, possuindo domínios citoplasmáticos ricos em cisteína (Yuan *et al.*,2018).

Mediante um determinado estímulo, TRAIL se liga a TRAILR1 e TRAILR2 para ativar o domínio de morte (Jiang *et al.*,2019). Nesse processo, há a formação de um homotrímero, recrutamento da proteína adaptadora FADD e formação do complexo DISC (Jiang *et al.*,2019). Logo, a caspase 8 é principalmente recrutada, e assim, ativa a cascata pró-apoptótica, inclusive aquelas das vias mitocondriais, através da conversão da clivagem e ativação da proteína BID, a qual é externada da membrana mitocondrial, inibindo as

proteínas reguladoras de apoptose para amplificação do sinal apoptótico (Jiang *et al.*,2019). Apesar das informações controversas na literatura, acredita-se que a formação do homotrímero e a sua endocitose pode ser decisivo na apoptose mediada por TRAIL (Jiang *et al.*,2019). A ativação de apoptose pelo eixo TRAIL/TRAILR1-TRAILR2 é mais bem relacionada as células tumorais (Jiang *et al.*,2019). Porém, estudos com linhagens monocíticas demonstraram que TRAIL e seus receptores podem ser expressos fora do contexto tumoral, o que possibilita os estudos sobre TRAIL e seus receptores na apoptose mediada por processos infecciosos (Jiang *et al.*,2019).

1.4.4 IL-1 β

A Família IL-1 é composta por 11 membros, a saber: IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-36Ra, IL-36 α , IL-37, IL-36 β , IL-36 γ , IL-38 e IL-33, sendo a IL-1 β a mais bem descrita (Yazdi & Ghoreski, 2017). A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória relevante em um contexto de imunidade inata (Yazdi & Ghoreski, 2017), embora estudos mais recentes têm mostrado também seu papel na imunidade adaptativa (Yazdi & Ghoreski, 2017). O processamento da IL-1 β se dá principalmente pela ativação de caspase 1 na via do inflamassoma, e a consequente clivagem da pró-IL-1 β inativa, que é a precursora da IL-1 β (Yazdi & Ghoreski, 2017).

Diversos tipos celulares clivam e secretam a IL-1 β , mediante estímulos como PAMPs e DAMPs, via TLR ou ativação de IL-1R pela IL-1 β madura (Gupta & Barthwal, 2018). Outros mecanismos recentemente descritos estão relacionados à liberação de IL-1 β pela via FasL/FADD/Caspase 8 (Weber, Wasiliew e Kracht, 2010; Lopez-Castejon & Brough, 2011). Ademais, mecanismos ligados a distúrbios mitocondriais, devido à produção de ROS e liberação do citocromo C no citosol, podem desencadear um processo apoptótico intrínseco, e consequente liberação de IL-1 β (Tschopp & Schroder, 2010). É importante dizer que, apesar desses últimos mecanismos citados poderem estimular a liberação de IL-1 β , normalmente há o suporte de outras vias (Tschopp & Schroder, 2010). As células monocíticas humanas conseguem ativar o inflamassoma através de sinais dependentes de TLR 4, e através do recrutamento de FADD e caspase 8 (Tschopp & Schroder, 2010). Estudos em

células murinas demonstraram que a caspase 8 é capaz de clivar as proteínas envolvidas em morte celular por piroptose, e estimular a liberação de IL-1 β (Tschopp & Schroder, 2010). Nem sempre a liberação de ROS afeta a formação e produção de IL-1 β , como aqueles ROS gerados a partir da via TNF (Tschopp & Schroder, 2010).

1.5 A Apoptose e a Vacina BCG

Sendo de grande interesse durante a infecção por TB e na resposta imune frente à vacina BCG, nosso grupo vem juntando evidências dos efeitos de citocinas inflamatórias sobre a morte celular, enquanto aborda diferentes aspectos da imunidade (Figura 12). Assim, estudos seminais e atuais utilizando a vacina BCG Moreau, já demonstraram *in vitro* um aumento de níveis de IL-1 β em células da linhagem celular da leucemia monocítica aguda humana THP1 (Monteiro-Maia *et al.*, 2018), PBMCs (da Silva *et al.*, 2021; Simas *et al.*, 2011) e também em cordão umbilical de recém-natos (Antas *et al.*, 2019). Entretanto, a IL-1 α não foi observada estar sendo induzida *in vitro* pela vacina BCG Moreau em estudos pregressos de nosso grupo (Ponte *et al.*, 2018; [Albuquerque, 2021](#)). Em outro estudo ainda não publicado, dentre todas as citocinas dosadas e estimuladas pela vacina BCG Moreau, as maiores amplitudes frente ao controle não estimulado foram vistas para IL-1 β (~70x) e TNF (~55x) (Albuquerque, 2021). Em consonância, este imunógeno foi capaz de induzir apoptose nesses modelos (Simas *et al.*, 2011; Souza-Vasconcelos *et al.*, 2015; Silva, Ponte e Antas, 2019). Ademais, a importância de citocinas inflamatórias em outros contextos já foi vista, como aquela na imunidade treinada induzida por BCG (Arts *et al.*, 2018). Apesar da IL-1 β ser mais relacionada à piroptose, o entendimento de que as vias de morte conversam ativamente entre si, está sendo cada vez mais aceito (Taabazuing, Okongo and Bachovchih, 2017; Donado *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que FasL pode induzir a ativação de IL-1 β em macrófagos e DCs (Donado *et al.*, 2020). Até o momento, ainda não se sabe se há um mecanismo de retroalimentação positivo dessa citocina na indução de apoptose (Donado *et al.*, 2020).

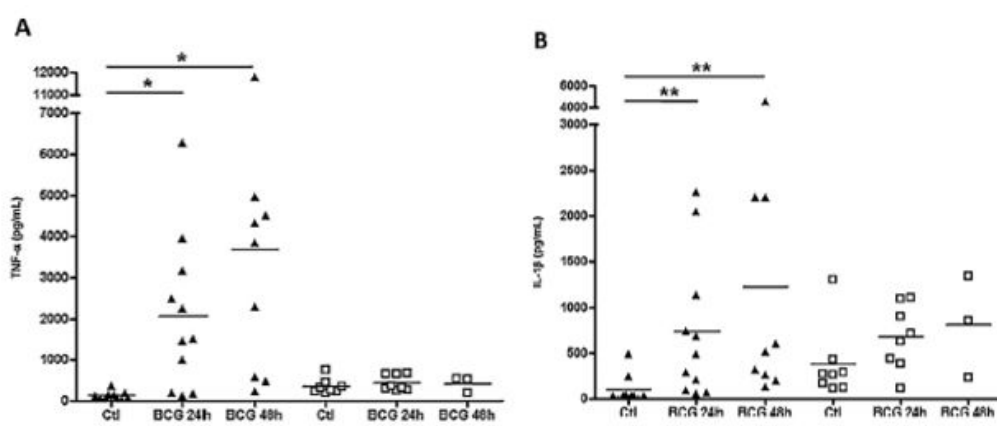


Figura 12: Níveis de TNF (A) e IL-1β (B) obtidos de PBMCs (▲) e células de cordão umbilical (□) infectadas com a vacina BCG Moreau por 24h e 48h. As PBMC estimuladas apresentaram níveis significativos dessas citocinas, em comparação ao controle não estimulado (Ctl), O mesmo não foi visto com as células de cordão. Imagem adaptada de Simas et al., 2011.

Estudos têm mostrado o potencial da vacina BCG em induzir apoptose em diferentes modelos celulares (Sanchez-Rodrigues *et al.*,2017; Ponte *et al.*,2018; Luo *et al.*,2020; Mata *et al.*,2021). Já foi visto que em linhagem de células alveolares humanas, a vacina BCG foi capaz de induzir apoptose pelo eixo Fas/FasL (Lai *et al.*, 2007). Porém, a indução de apoptose por BCG mediada pela via Fas/FasL é pouco explorada, o que torna necessário verificar se esse mecanismo tão tradicional e eficiente de apoptose, pode estar acontecendo em células humanas (Moliva, Turner e Torreles, 2017). Maiores níveis de TNF induzidos *in vitro* pela vacina BCG Moreau já foram anteriormente observados por nosso grupo somente em adultos saudáveis (Ponte *et al.*, 2018).

Já que TRAIL é expresso principalmente em neutrófilos, o mesmo tem sido mais bem descrito no contexto de apoptose em células tumorais (Liguori *et al.*,2016; Baskar *et al.*,20). Porém, monócitos e macrófagos também podem expressar seus cinco tipos de receptores, bem como serem suscetíveis à apoptose dependente de caspase por rhTRAIL (Liguori *et al.*,2016; Baskar *et al.*,2019). A literatura evidencia a importância e o aumento do TRAIL produzido por neutrófilos e induzido pela vacina BCG no tratamento de câncer de bexiga, e conseqüentemente, na apoptose das células tumorais (Liguori *et al.*,2016; Wang *et al.*,2019).

1.6 O meio condicionado e seus aspectos imunes

A literatura evidencia várias metodologias que utilizam o meio condicionado (MC) para avaliar os mediadores solúveis em diferentes modelos (Liu *et al.*, 2011; Jinesh, Chundururu e Kamat, 2012; Sánchez-Rodrigues *et al.*, 2017). Em 2003, Nagabhushabam e colaboradores mostraram que a ação do IFN- γ foi inibida em macrófagos infectados com *Toxoplasma gondi* incubados com MC de macrófagos infectados com Mtb. No contexto da vacina BCG, estudos já mostraram que os MCs provenientes tanto de PBMC, quanto de neutrófilos infectados com a vacina BCG da cepa Tice, possuem efeitos benéficos. Assim, em 2012, Jinesh e colaboradores mostraram que o MC de neutrófilos estimulados com esta cepa da vacina BCG, foi capaz de induzir apoptose em linhagem de bexiga Rt4v6, através da via TNF/TNFR1. Já outro estudo mostrou os efeitos benéficos frente ao carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, visto que as PBMC infectadas com a mesma cepa Tice do BCG, foram capazes de produzir IL-6, TNF e IFN- γ anti-tumorais, além de aumentar a citotoxicidade e apoptose nas células tumorais, com a expressão de caspase 3 e p53 (Sánchez-Rodrigues *et al.*, 2017). Em 2011, Liu e colaboradores mostraram que o sobrenadante de PBMC infectadas com a vacina BCG da cepa Dinamarquesa, também possui efeitos anti-tumorais, pois foi capaz de induzir expressão aumentada de proteínas associadas à ativação de linfócitos T, em linhagens de células alveolares humanas A549, de cólon HCT116 e de mama MCF7, o que foi correlacionado com o aumento de níveis de TNF e IFN- γ induzidos pelo BCG (Liu *et al.*, 2011). Esses achados corroboram que os fatores solúveis presentes no MC estimulado com várias cepas da vacina BCG são potenciais alvos terapêuticos. Mediante a isso, torna-se necessário verificar como os fatores solúveis induzidos pela vacina BCG da cepa Moreau, induzem apoptose no nosso modelo.

A hipótese desse estudo é que **fatores solúveis secretados por mononucleares infectados *in vitro* com a vacina BCG Moreau, possuem componentes essenciais indutores da apoptose nos monócitos humanos.**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar se os mediadores solúveis indutores de apoptose e produzidos *in vitro* durante a infecção de monócitos humanos com a vacina BCG Moreau podem contribuir para a morte celular.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar *in vitro* a expressão dos genes FAS (CD95), FADD, TRADD, e Caspase-1 associados a apoptose em células mononucleares humanas infectadas com a vacina BCG Moreau;
- 2) Determinar o papel de mediadores solúveis gerados *in vitro* por células mononucleares humanas infectadas com a vacina BCG Moreau na indução de apoptose;
- 3) Avaliar o efeito do meio condicionado, após neutralização de TNFR1, TRAIL, Fas (CD95) ou IL-1 β de forma isolada, na viabilidade de células mononucleares humanas em repouso;
- 4) Avaliar o efeito do meio condicionado, após neutralização de TNFR1, TRAIL, Fas (CD95) ou IL-1 β em conjunto, na viabilidade de células mononucleares humanas em repouso.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Amostras e Biossegurança

As amostras clínicas compostas de subprodutos do sangue venoso periférico na forma de 50mL de “*buffy-coat*” (bolsas de sangue total anticoagulado, contendo na maior parte leucócitos e plaquetas) de indivíduos adultos sadios via doações espontâneas e voluntárias, foram obtidas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (SH-HUCFF-UFRJ). As amostras foram utilizadas a partir da negatização dos testes sorológicos, feitos no próprio SH-HUCFF-UFRJ e transportadas em maletas isotérmicas sinalizadas até a Fiocruz, onde foram manipuladas nas cabines de segurança biológica em ambiente estéril, respeitando as normas de precauções na manipulação de material biológico. Quaisquer descartes daqueles materiais foram feitos de maneira apropriada, seguindo as mesmas normas.

3.2 Aspectos Éticos

Este projeto conta com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) FIOCRUZ/IOC, sob número CAAE: 35775014.0.0000.5248.

3.3 Obtenção de células primárias

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas após a centrifugação e sua separação por gradiente de densidade. Primeiramente, foi feita uma diluição 1:1 em tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente, foi feita uma nova diluição 1:1 em Ficoll Hystopaque (GE Healthcare, Suécia) para a separação por centrifugação a 900G por 30 minutos. Após, as PBMC foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI (Gibco Invitrogen Corporation 1640, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco Invitrogen Corporation, EUA), L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 100µg/mL (meio completo 10%). Uma alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Tripán 0,4% (1:1) (Bio WHITTAKER, EUA) em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis.

3.4 Obtenção de células de linhagem

As células de linhagem celular da leucemia monocítica aguda humana THP-1 foram obtidas do “*American Type Culture Collection*” (ATCC; Rockville, EUA). As culturas celulares foram mantidas em garrafas de cultura (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) através de repiques semanais contendo meio RPMI1640 suplementado com 10% SFB, L glutamina a 2 mM, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Gibco, CA, EUA) e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Shel Lab, OR, EUA).

3.5 Solubilização da vacina BCG Moreau

As ampolas do lote de referência da OMS não vacinais da cepa BCG Moreau RDJ (nos. 9056 e 20009, [4x10⁶] e [3,5x10⁶], respectivamente), foram doadas gentilmente pela FAP e solubilizadas na proporção de 1 ampola para 1 mL de PBS/solução salina. Posteriormente, a solução foi homogeneizada no vortex por 1 hora. A taxa de infecção (MOI) foi a proporção de 2:1.

3.6 Preparação do meio condicionado

As PBMC (1x10⁶ células/mL), foram divididas em dois tubos de cultura: Um tubo foi infectado com a vacina BCG Moreau (FAP, Brasil) doravante chamado de controle positivo, e o outro não, chamado de controle negativo. Ambos repousaram por 48 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, e este processo foi realizado conforme descrito por Simas *et al.*, 2011. Posteriormente, os sobrenadantes foram recolhidos e denominados MCs, os quais foram imediatamente filtrados (0.22 µm) e adicionados em tubos de cultura contendo a linhagem THP1 (5x10⁴/mL) ou PBMC autólogas. O processo de filtração foi realizado com o intuito de retirar as micobactérias e/ou restos de células. Dessa forma, o MC controle positivo foi composto apenas pelos fatores solúveis mediados pela infecção com a vacina BCG Moreau. Protocolo similar ao descrito por Nagabhushanam *et al.*, 2003.

3.7 Dosagem de mediadores solúveis

As reservas de MCs em excesso e armazenadas à -20°C foram descongeladas e utilizadas para as dosagens de IL-1β, IL-6 e MCP-1/CCL-2, através da técnica de ELISA e seguindo as normas do fabricante (R&D System,

EUA). A leitura e a avaliação da densidade óptica foi feita pelo programa Softmax (SoftMax®). Os limites de detecção foram 3,9-250 pg/mL; 3,1-300 pg/mL e 31,2-2.000 pg/mL, respectivamente.

3.8 Incubação de linhagem THP1, PBMC e MC com anticorpos de bloqueio

Cerca de 2 µL dos anticorpos **anti-hTNFR1** (500 ng/µL) e **anti-hFas** (1.000 ng/µL) foram colocados diretamente no precipitado de células, e incubados por 20 minutos no gelo. Em seguida, os MCs foram adicionados aos tubos de acordo com as variáveis de cada tubo. Cerca de 2 µL e 1 µL dos anticorpos **anti-hTRAIL** (500 ng/µL) e **anti-hIL-1β** (1.000 ng/µL), respectivamente, foram colocados nos tubos já contendo os MCs e as células, de acordo com as variáveis de cada tubo, e incubados por 20 minutos no gelo. As especificações de cada anticorpo se encontram detalhadas (Tabela 2).

Tabela 2: Anticorpos neutralizantes utilizados

Anticorpo	Fonte	Clone	Lote	Fabricante	Reconstituição
Anti-human IL-1β/IL-1F2 antibody	Anticorpo policlonal IgG de cabra		AM12	R&D System, EUA	1 mg/mL
Anti-human TNF R1/TNFRSF1A antibody	Anticorpo monoclonal IgG de camundongo	#16805	BHS08	R&D System, EUA	500 µg/mL
Human TRAIL/TNFSF10 antibody	Anticorpo monoclonal IgG de camundongo	#75411	MAB375	R&D System, EUA	0,5 mg/mL
Human FAS monoclonal antibody	Anticorpo monoclonal IgG de camundongo	#NYRhfAS	02050814	MyBioSource, EUA	1,0 mg/mL

As culturas permaneceram incubadas por um adicional de 72 horas (Figura 13)

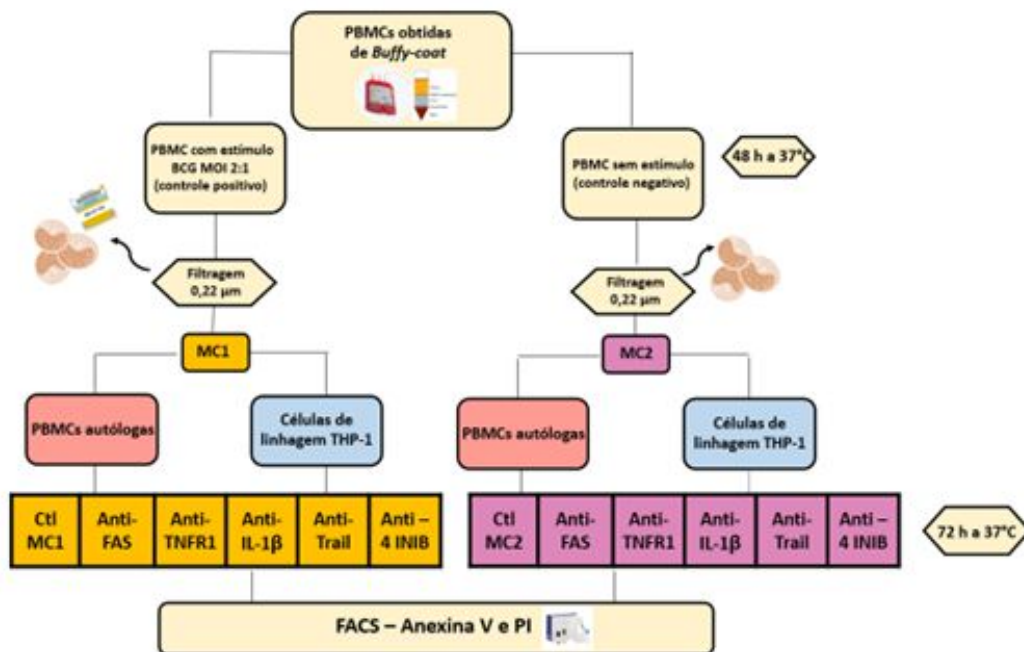


Figura 13: Fluxograma dos experimentos de cultura. MC1=MC controle positivo; MC2=MC controle negativo

3.9 Detecção do padrão de morte celular

A avaliação do padrão de morte celular foi realizada através da marcação com o kit de Anexina V-FITC (FL1) e PI (FL3) (Biosciences, EUA). A leitura foi feita por citometria de fluxo, no aparelho FACSCalibur e Cytoflex da Plataforma Multiusuário de Citometria de Fluxo do IOC/Fiocruz, e os dados foram analisados no programa FLOWJO (TreeStar®). Nas PBMC, uma exclusão da população dos linfócitos foi feita, com base nas propriedades de dispersão de luz (Figura 16). A estratégia de regiões para avaliação das células viáveis, em apoptose e em necrose foi feita, conforme descrito por Ponte *et al.*, 2018. Os dados foram expressos em porcentagem de células simples (apoptose) ou duplo positivas (necrose). Para os gráficos de dispersão, subtraímos os valores de cada dupla de variáveis, respectivamente:

MC controle positivo + anticorpo inibidor (-) MC controle negativo + anticorpo inibidor

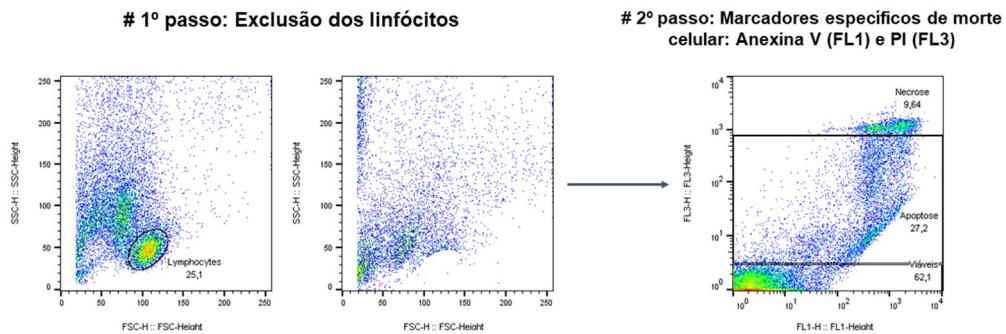


Figura 14: Estratégia de regiões utilizadas nas PBMC.

3.10 Expressão gênica

Os ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram realizados em uma detecção de sequência rápida pelo sistema ABI Prism 7500, utilizando ensaios de expressão gênica TaqMan (Applied Biosystems, EUA) para os alvos humanos, correspondentes à *FAS* (*CD95*), *FADD*, *TRADD* e *Caspase-1* (Applied Biosystems, EUA) (Tabela 3). Foram utilizadas células PBMC infectadas com a vacina BCG por 16 horas em um MOI 2:1. Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, seguindo um estudo similar descrito por Antas *et al.*, 2019, e os experimentos foram concretizados na plataforma de PCR em Tempo Real RPT-09A do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), situada no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC/FIOCRUZ.

Tabela 3: Alvos genéticos selecionados

Alvos genéticos	Função	Fabricante
<i>FAS</i>	Gene correspondente ao receptor FAS, envolvido na apoptose extrínseca.	Applied Biosystems, EUA
<i>FADD</i>	Gene correspondente a proteína adaptadora FADD, envolvida na ativação da cascata de apoptose extrínseca mediada pela ligação FAS/FASL	Applied Biosystems, EUA
<i>TRADD</i>	Gene correspondente a proteína adaptadora TRADD, envolvida na ativação da cascata de apoptose extrínseca mediada pela ligação TNFR/TNF,	Applied Biosystems, EUA
<i>CASPASE 1</i>	Gene correspondente a proteína caspase-1, envolvida na morte por piroptose	Applied Biosystems, EUA

3.11 Análise estatística

O pré-tratamento dos dados foi realizado em duas etapas. Inicialmente, o delta 1 nos dados de PBMC: subtração do controle negativo (PBMC apenas com meio de cultura), de todas as variáveis do experimento foi aplicado. Feito isso, foi realizado o delta 2, subtraindo os valores dos controles apenas neutralizantes (dados neutralizantes + BCG menos dados apenas neutralizantes). Dessa forma, os possíveis valores de morte celular inespecífica e que possam ter sido causados pelos neutralizantes foram isolados. A apoptose mediada pelo controle positivo BCG foi considerada como 100%, e a redução da apoptose mediada pelos anticorpos neutralizantes foi analisada conforme o valor do controle positivo BCG (100) – valor da mediana de cada inibidor. Para análise da atuação conjunta dos neutralizantes, os dados receberam o tratamento apenas de delta 1. Para testar a normalidade dos dados, os Testes de Shapiro – Wilk (p -valor $<0,05$) e o Normal QQPlot foram feitos, os quais evidenciaram que os dados eram normais. O teste de associação entre as variáveis escolhido foi o paramétrico One-Way ANOVA. Os p valor $<0,05$ foram considerados significantes. Para análise da variável 4 neutralizantes (em conjunto) em relação ao controle positivo BCG, o teste paramétrico T Student (p valor $<0,05$) foi empregado. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa Graph Pad Prisma versão 8.4.3. Por questões técnicas, a análise estatística final da apoptose nas amostras de PBMC foi feita utilizando dados de nove indivíduos, e da necrose, 13 indivíduos. Nas amostras de linhagem THP-1 foram utilizados

dados de 10 indivíduos. Para análise dos dados da expressão gênica, uma forma individualizada entre o controle não estimulado e o gene de interesse foi feita, sendo realizado o Teste T Student (p valor $<0,05$). Novamente, dados de 10 indivíduos foram utilizados. Para a análise dos dados de ELISA, o teste não paramétrico Mann-Whitney foi empregado (p valor $<0,05$). Aqui, dados de quatro indivíduos foram utilizados.

4 RESULTADOS

4.1 A vacina BCG induz a apoptose em células de linhagem THP-1

Trabalhos anteriores do nosso grupo já mostraram que a vacina BCG foi capaz de induzir apoptose em monócitos humanos primários em 48 horas, e que diferentes cepas induzem diferentes percentuais de apoptose na linhagem THP-1 (Simas *et al.*, 2011; Ponte *et al.*, 2018; Silva, Ponte e Antas, 2019). Logo, em um primeiro momento e para confirmar aqueles dados prévios, a infecção da linhagem THP-1 com a vacina BCG Moreau foi realizada. Por ser uma linhagem, as células THP-1 conseguem permanecer em cultura por mais tempo, quando comparadas a células primárias, e preservam grande parte das suas características originais, o que proporciona maior facilidade na sua manipulação e padronização das etapas dos experimentos propostos (Chanput, Mes e Wichers, 2014). Após 48 horas de infecção, a morte celular foi avaliada. Foi possível observar e corroborar que a vacina BCG Moreau induziu percentuais aumentados e significantes de apoptose ($p < 0,01$) em relação ao controle não estimulado (NS) (Figura 15).

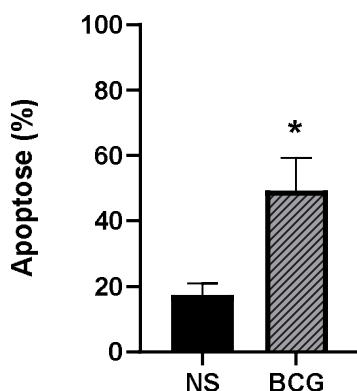


Figura 15: Apoptose na linhagem THP-1 infectada com a vacina BCG Moreau por 48h. Percentuais de apoptose em linhagem THP-1 infectada (BCG) ou não (NS) com a vacina BCG Moreau. Os resultados estão expressos em média e erro padrão. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi empregado $*p < 0,01$. $n = 4$

4.2 Os fatores solúveis induzidos pela vacina BCG no meio condicionado induzem apoptose em linhagem THP-1 em repouso

Em um segundo momento, os MC foram gerados a partir de PBMC infectadas com a vacina BCG Moreau por 48 horas. Após a geração dos MC, a linhagem THP-1 foi incubada para verificar se os mesmos poderiam induzir a morte celular nessas células. Assim como na infecção direta com a vacina BCG Moreau, os MC proveniente das culturas de PBMC infectadas (controle positivo), foi capaz de induzir apoptose na linhagem THP-1 ($p < 0,0001$) (Figura 16).

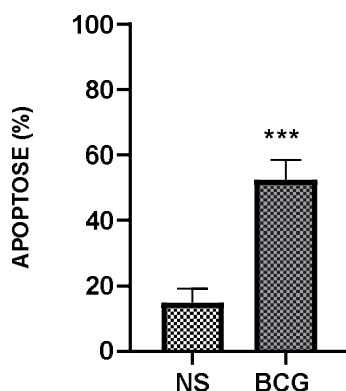


Figura 16: Apoptose na linhagem THP-1 incubada com o meio condicionado proveniente de PBMCs infectadas com a vacina BCG Moreau por 48h. Percentuais de apoptose em linhagem THP-1 incubada com o MC controle positivo (BCG) ou não (NS). Os resultados estão expressos em média e erro padrão. O teste paramétrico T Student foi empregado *** $p < 0,0001$. $n = 10$.

4.3 A vacina BCG induz a expressão gênica de Fas e caspase-1

O terceiro passo foi avaliar quais seriam os possíveis fatores solúveis a induzir morte celular nas PBMC pela vacina BCG Moreau. Para isso, uma análise da expressão gênica de *FAS (CD95)*, *FADD*, *TRADD* e *Caspase-1* nas PBMC infectadas com a vacina BCG Moreau por 16 horas foi feita. As análises demonstraram um aumento significativo dos genes que codificam Fas, um alvo potencialmente contido no MC e envolvido na apoptose extrínseca ($p < 0,05$), e caspase-1 ($p < 0,05$), esta envolvida na ativação de inflamassoma e liberação de $IL-1\beta$ (Figura 17). Por outro lado, não foram encontrados aumentos expressivos de transcritos para ambos FADD e TRADD.

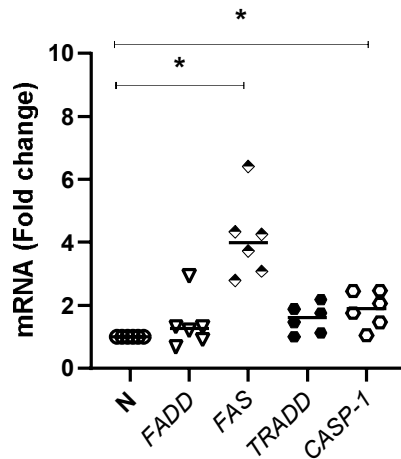


Figura 17: Expressão gênica de candidatos apoptóticos induzidos em PBMCs infectadas pela vacina BCG Moreau por 16h. Baseline (N: não estimulado) (círculo); FADD (triângulo para baixo); Fas (diamante); TRADD (hexagono fechado); Caspase-1 (quadrado). O Teste T Student foi empregado * $p < 0,05$. $n = 10$.

4.4 As vias clássicas de apoptose extrínseca não são as responsáveis pela apoptose induzida pela vacina BCG Moreau em células de linhagem THP-1.

A partir dos resultados da expressão gênica e de dados anteriores obtidos pelo nosso grupo sobre os níveis de TNF e IL-1 β (Simas *et al.*, 2011; Antas *et al.*, 2019), neutralizamos os receptores (Fas e/ou TNFR1) ou os ligantes presentes nos MCs (TRAIL e/ou IL-1 β), com anticorpos de bloqueio para avaliar a participação desses fatores solúveis na apoptose induzida pela vacina BCG Moreau. Verificamos então se a neutralização de alguma molécula associada com a via extrínseca, teria o potencial de contribuir com os percentuais de apoptose em culturas estimuladas com o MC controle positivo. Porém, valores significativos na redução da apoptose em linhagem THP-1 incubada com o MC controle positivo + anticorpos neutralizantes não foram encontrados, estes em relação ao respectivo MC controle negativo + anticorpos neutralizantes (Figura 18).

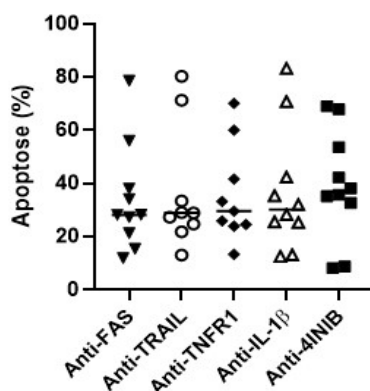


Figura 18: Percentuais de apoptose na linhagem THP-1 incubada com o meio condicionado controle positivo mais os anticorpos neutralizantes. Percentuais de apoptose em células de linhagem THP-1 incubadas com o MC controle positivo (BCG) + anticorpos neutralizantes. Linha tracejada indica os percentuais de apoptose em células de linhagem THP-1 incubadas com o respectivo MC controle negativo + anticorpos neutralizantes. Os resultados estão expressos em mediana. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi empregado, com um pós-teste de Dunn. n= 10.

4.5 O bloqueio com os anticorpos neutralizantes de forma isolada reduz os percentuais de apoptose em PBMC autólogas em repouso induzidos pelos fatores extrínsecos presentes no MC controle positivo

O mesmo ensaio de inibição foi feito em PBMC autólogas incubadas com o MC controle positivo (BCG) ou MC controle negativo (NS). No modelo de PBMC, foi possível observar que o anticorpo anti-Fas inibiu 64,1% de apoptose ($p \leq 0,05$) comparado ao MC controle positivo. O anticorpo anti-TRAIL, que se liga ao TRAIL solúvel impedindo a sua ligação com os receptores DR4 e DR5, inibiu 76,3% de apoptose ($p \leq 0,01$), quando comparado ao MC controle positivo (Figura 19). O anticorpo anti-TNFR1, que tem função antagonista ao TNF, inibiu 74,3% de apoptose ($p \leq 0,01$) comparado ao MC controle positivo (Figura 19). Já o anticorpo anti-IL-1 β , que se liga a IL-1 β impedindo a sua ligação com o IL-1R, inibiu 70,5% de apoptose ($p < 0,001$), comparado ao MC controle positivo BCG (Figura 19).

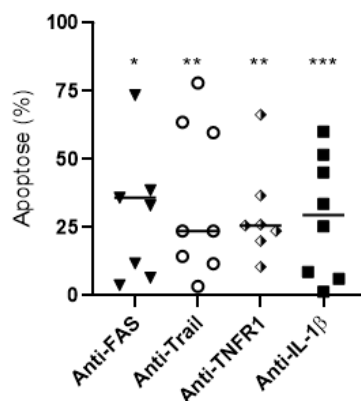


Figura 19: Percentuais de apoptose em PBMC incubadas com o meio condicionado controle positivo mais os anticorpos neutralizantes. Percentuais de apoptose em PBMC incubadas com o MC controle positivo + os anticorpos neutralizantes. A taxa de apoptose foi apresentada em porcentagem, considerando o MC controle positivo como 100%. Sendo o anti-FAS (triângulo invertido) * $p < 0,05$; anti-TRAIL (círculo aberto) ** $p < 0,001$; anti-TNFR1 (diamante) ** $p < 0,005$; e Anti-IL-1 β (quadrado) *** $p < 0,001$. Os resultados estão expressos em mediana. O teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns foram empregados $n = 9$.

4.6 O bloqueio em conjunto e simultâneo com os anticorpos neutralizantes reduz parcialmente os percentuais de apoptose induzidos pelos fatores extrínsecos presentes no MC controle positivo

A fim de verificar se o bloqueio em conjunto com os anticorpos neutralizantes agiria em sinergia e de forma simultânea com as vias de apoptose estimuladas pelos fatores solúveis, consequentemente reduzindo ainda mais os percentuais de apoptose, os mesmos foram novamente utilizados para uma posterior análise por citometria de fluxo. Assim, a inibição conjunta apresentou uma redução parcial, mas significativa (* $p < 0,05$), de 40% na apoptose, quando comparada ao MC controle positivo (Figura 21).

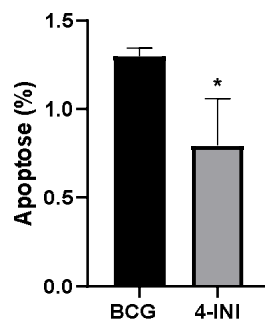


Figura 20: Percentuais de apoptose em PBMC obtidas de indivíduos saudáveis incubadas com o meio condicionado controle positivo mais os 4 anticorpos neutralizantes por 72h. Percentuais de apoptose em PBMC incubadas com o MC controle positivo (BCG) + os quatro anticorpos neutralizantes. Os dados de PBMC foram tratados com transformação logarítmica.

Os resultados estão expressos em média e erro padrão. O Teste T Student não pareado foi empregado * $p < 0,01$. $n = 9$.

4.7 O bloqueio com os anticorpos neutralizantes reduzem de forma significativa os percentuais de necrose induzidos pela vacina BCG em células THP-1 e PBMC

O mesmo ensaio de inibição foi utilizado para avaliar os percentuais de necrose em células THP-1 e células PBMC autólogas incubadas com o MC controle positivo (BCG) ou MC controle negativo (NS). No modelo de THP-1, foi possível observar que o anticorpo anti-Fas inibiu aproximadamente 100% de necrose ($p \leq 0,001$) comparado ao MC controle positivo. Os demais anticorpos não demonstraram reduções significativas (Figura 21.A). Já o modelo de PBMC, o anticorpo anti-Fas, inibiu aproximadamente 100% de apoptose ($p < 0,001$), comparado ao MC controle positivo BCG (Figura 21.B). O anticorpo anti-TNFR1 inibiu 61,8% de necrose ($p < 0,005$), quando comparado ao MC controle positivo (Figura 21.B); e o anticorpo anti-IL-1 β inibiu 66,6% de necrose ($p < 0,01$) comparado o MC controle positivo (21.B)

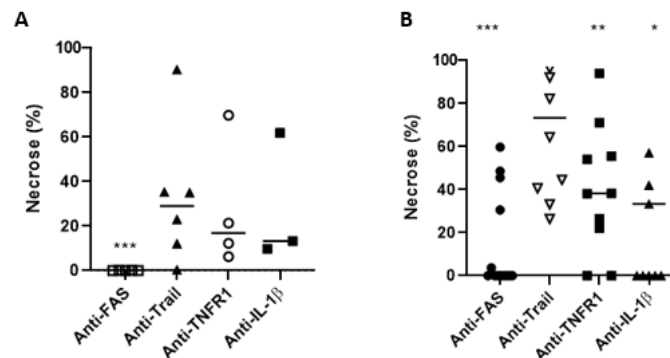


Figura 21: Percentuais de necrose em (A) células de linhagem THP-1 e (B) PBMC incubadas com o MC controle positivo (BCG) + os anticorpos neutralizantes. A taxa de necrose foi apresentada em porcentagem considerando o MC controle positivo como 100%. *** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,005$. Em A, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi empregado, com um pós-teste de Dunn. $n = 8$. Em B, o teste paramétrico One Way Anova foi utilizado. $n = 13$.

4.8 A vacina BCG induz níveis elevados de MCP-1 em células de linhagem THP-1

Visto que nem todos os fatores solúveis de interesse principal neste estudo se mostraram robustamente significantes na indução de apoptose mediada pela vacina BCG Moreau em células de linhagem THP-1, outras citocinas potenciais da via extrínseca e que poderiam estar envolvidas, como MCP-1/CCL-2, IL-6 e IL-1 β , todas envolvidas na inflamação, também foram dosadas. Apenas os níveis de MCP-1/CCL-2 se mostraram elevados e com

valores significantes ($*p < 0,05$) induzidos pela vacina BCG Moreau *in vitro* (Figura 22).

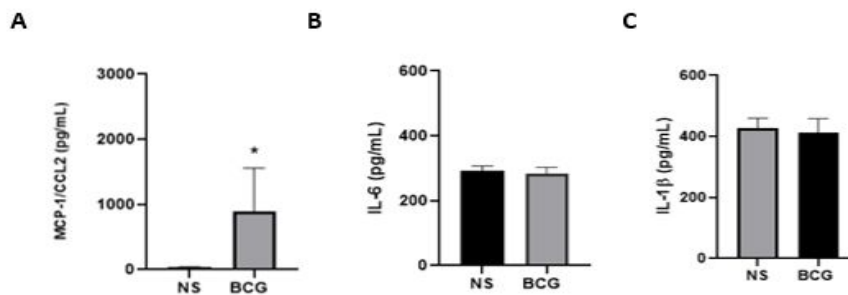


Figura 22: Níveis de citocinas induzidas pela vacina BCG Moreau em células de linhagem THP-1. A: MCP-1/CCL2; B: IL-6; C: IL-1 β . Os resultados estão expressos em média e erro padrão. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi empregado $*p < 0,05$. $n = 4$.

5 DISCUSSÃO

Na elaboração de uma vacina, além das quatro fases imperativas para o ensaio clínico, critérios como eficácia, segurança e imunogenicidade são indispensáveis para que haja aprovação e distribuição para a população (Been *et al.*,2020). Através de subsequentes passagens seriadas do *M. bovis* cepa selvagem, Calmette e Guérin conseguiram atenuar o bacilo, dando origem a vacina BCG, sendo esta eficaz contra as formas graves da TB (Brosh *et al.*,2007; Zhang *et al.*, 2013). Apesar da vacina BCG ter completado 101 anos em 2022, ainda não estão totalmente elucidados quais os mecanismos imunológicos ativados pela imunização com o BCG os quais seriam os correlatos de imunidade que levariam a proteção alcançada (Lange *et al.*,2022). Estudos já demonstraram que há uma considerável variação de eficácia entre as cepas da vacina BCG, o que pode ser atribuído às variações de metodologias de manutenção dessas vacinas, assim como a exposição às NTMs, ou até mesmo ao próprio Mtb (Cho *et al.*,2021).

Para que haja a correta conexão entre as imunidades inata e adaptativa em um processo infeccioso ou vacinal, o reconhecimento e a apresentação do antígeno de interesse se tornam cruciais (Aoshi, *et al.*, 2009). No caso da vacina BCG, ao ser inoculada a mesma é reconhecida por neutrófilos, DCs e macrófagos, que processam o microorganismo atenuado e o apresentam para os linfócitos T (Moliva *et al.*, 2017). Nesse contexto, alguns mecanismos são importantes no processamento e apresentação, como a apoptose (Ryan, Sullivan e Keane, 2011). Estudos prévios do nosso grupo já evidenciaram que a vacina BCG Moreau induz a apoptose em monócitos humanos, tanto em PBMC, quanto na linhagem THP-1 (Simas *et al.*, 2011; Silva, Ponte e Antas, 2019). Porém, nenhum estudo ainda foi capaz de investigar a fundo quais seriam as vias de morte celular envolvidas. Logo, estudos adicionais sobre como este mecanismo de morte celular acontece e o quão imunogênico ele seria são ainda necessários. Em 1998, Albert e colaboradores sugeriram que a apoptose, mas não a necrose de células imunes humanas, seria necessária para que o conteúdo apresentado pelas DCs fosse imunogênico, visto que há maior conservação antigênica. De fato, a morte celular pode modular a resposta imune

adaptativa (Albert, 2004). Em 2003, os estudos realizados por Schaible e colaboradores corroboraram com a afirmativa anterior, pois os autores viram que a inibição da apoptose em macrófagos e DCs humanas infectados com o Mtb ou o BCG, reduzia a ativação de linfócitos T CD8.

Nossos resultados de expressão gênica em PBMC infectadas com a vacina BCG Moreau evidenciaram um aumento significativo de Fas, em comparação ao controle não estimulado. Estudos prévios já demonstraram que a vacina BCG Moreau foi capaz de induzir a expressão de Fas em células renais (Brendau *et al.*, 2000) e alveolares (Lai *et al.*, 2007), o que corrobora com os nossos resultados. Contudo, aqui não foi possível observar a expressão de FADD, o que foi visto por Lai e colaboradores (2007). Isso pode estar atrelado ao fato de que FADD é uma proteína adaptadora recrutada mediante a ligação FasL/Fas (Tummers *et al.*, 2020). Logo, o nosso pouco tempo de cultura pode ter comprometido a detecção de transcritos de FADD. Além disso, os MOIs utilizados foram diferentes entre os estudos: 2:1 *versus* 50:1. Acreditamos que os mesmos motivos poderiam impactar na detecção de mRNA de TRADD, visto que este é recrutado e ativado por cascatas no processo de apoptose (Xu *et al.*, 2020).

Nas análises da expressão gênica, um aumento de transcritos de caspase-1 também foi encontrado. A caspase-1 é uma protease envolvida durante a ativação do inflamassoma, na morte celular por piroptose, e consequentemente, na liberação de IL-1 β (Sun e Scott, 2016). A participação da piroptose no contexto imunológico ainda não foi bem elucidada. A literatura mostra que no cenário tumoral, a piroptose seria como uma “espada de dois gumes”, visto que esta morte celular desencadeia a liberação de citocinas que impedem a vigilância imunológica, e consequentemente, o desenvolvimento tumoral (Li *et al.*, 2021). Por outro lado, a inflamação causada pela piroptose ativa mais células inflamatórias, o que contribui para a eliminação da célula hiperplásica (Li *et al.*, 2021). Alguns estudos referentes a doenças autoimunes, possuem como alvo o controle da ativação dos inflamassomas e da piroptose das células hospedeiras, pois a ação exacerbada destes implica em inflamações patológicas (McKenzie *et al.*, 2019). No presente trabalho, nossos achados sobre

a caspase-1 nos fizeram refletir sobre uma possível “conversa” entre a apoptose e a piroptose no nosso modelo. Estudos já mostraram que através de mecanismos extrínsecos, a ligação FasL/Fas, e a consequente ativação da caspase 8, ocasiona uma falha na ativação do inflamassoma (Donado *et al.*, 2020). Com isso, este fica livre para clivar a Gasdermina D, uma proteína indispensável à piroptose, translocando a apoptose inicial, para uma piroptose (Donado *et al.*, 2020). Logo, para averiguarmos se essa interação ocorreria também em nosso modelo, outros marcadores precisariam ter sido avaliados, como a caspase 8 e a Gasdermina D.

Nosso estudo reforçou que a infecção *in vitro* com vacina BCG foi capaz de induzir apoptose em células de linhagem THP-1, assim como induziu os fatores solúveis presentes no MC controle positivo. Em 2015, Vasconcelos e colaboradores relataram que macrófagos derivados de células de linhagem THP-1 e infectados com a vacina BCG Moreau atenuada ou morta por calor, produziram níveis altos de TNF, IL-1 β e IL-6, quando comparados ao controle não estimulado. Contudo, aqui não conseguimos reproduzir esses resultados na dosagem de IL-1 β e IL-6 com as células de linhagem THP-1 não diferenciadas. Outros estudos mostraram que as células de linhagem THP-1 ao serem estimuladas com LPS, produzem níveis elevados de caspases 8 e 9, estas sendo importantes marcadores de apoptose extrínseca e intrínseca, respectivamente (Sun *et al.*, 2017). Ao avaliarem a participação de TNF e TRAIL na apoptose nesse modelo, os autores viram que a inibição de TNF não foi suficiente para reduzir os níveis de apoptose (Sun *et al.*, 2017). Contudo, a inibição de TRAIL diminuiu os níveis da morte celular (Sun *et al.*, 2017).

No presente trabalho a utilização de anticorpos neutralizantes falhou em evidenciar quais vias clássicas da apoptose extrínseca poderiam estar envolvidas na apoptose de células de linhagem THP-1. A literatura demonstra que a vacina BCG é capaz de induzir níveis elevados de MCP-1/CCL-2 em macrófagos utilizando diferentes MOIs (Chávez-Galán *et al.*, 2016), o que poderia corroborar com os nossos resultados. Estudos demonstram que MCP-1/CCL-2 pode regular a apoptose em diferentes tipos celulares (Yang *et al.*, 2011; Nam *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019). Ademais, estudos demonstraram que

a IL-1 β pode modular o MCP-1/CCL-2 em células tumorais (Lee *et al.*, 2019), o que pode também estar acontecendo no nosso modelo com a linhagem THP-1. Mais estudos precisam ser feitos para confirmar essa suposição.

A indução de apoptose pela vacina BCG sendo mediada pela via Fas/FasL é pouco explorada (Moliva, Turner e Torreles, 2017), um incentivo que nos fez verificar se esse mecanismo tão tradicional de apoptose poderia estar acontecendo no nosso modelo experimental. Já foi visto que em linhagem de células alveolares humanas, a vacina BCG é capaz de induzir apoptose pelo eixo Fas/FasL (Lai *et al.*, 2007). Ademais, estudos demonstraram que o eixo Fas/FasL também seria importante na imunoterapia com o BCG contra o câncer de bexiga, visto que SNPs presentes no gene FasL poderiam implicar na resposta imune do paciente mediante ao tratamento com BCG, visto que indivíduos portadores do genótipo FASL-844 CC são mais responsivos ao tratamento com BCG, do que os portadores do genótipo FASL-844 TT (Mehmut *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2014). Alguns autores apontam tanto sFas, quanto sFasL, como marcadores inflamatórios, e não apoptóticos, sendo associados com um aumento de IFN- γ , o que pode caracterizar uma resposta imune do tipo Th1 (Cui *et al.*, 2010). Por outro lado, estudos também demonstraram que sFasL pode induzir apoptose em monócitos humanos (Baran *et al.*, 2001), o que corrobora com os nossos resultados, visto que o MC controle positivo foi capaz de gerar apoptose em células autólogas. Importante ressaltar que, nos nossos experimentos com os neutralizantes de Fas, também foi possível observar que houve uma redução significativa da apoptose mediada pela vacina BCG, o que corrobora com os dados de expressão gênica, pois aqueles apresentaram maior expressão de Fas em PBMCs infectadas com o BCG Moreau. Porém, para se avaliar a apoptose pelo eixo Fas/FasL, outros marcadores precisam ser avaliados, como a caspase 8, principal caspase envolvida naquele mecanismo (Fritsch *et al.*, 2019).

A grande redução dos percentuais de necrose induzidos pela vacina BCG Moreau tanto em PBMC, quanto na linhagem THP-1, mediante a inibição com o anticorpo anti-Fas, foi outro ponto deveras interessante. A literatura demonstra que o eixo Fas/FasL pode estar envolvido em mecanismos de morte celular por extravasamento de membrana plasmática (Otani *et al.*, 2018; Donado *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Em 2018, Otani e colaboradores notaram que a

ostecalquina induziu *in vitro* uma importante regulação de Fas/FasL em adipócitos, levando estes a necroptose. Outro estudo recente também demonstrou que a angiotensina II desencadeou a necroptose em células tubulares renais de camundongos, a partir da ativação do mesmo eixo Fas/FasL (Zhu *et al.*, 2020). Por fim, Donado e colaboradores (2020) observaram que o eixo Fas/FasL foi fundamental para a ativação da apoptose inicial, como também sugerido por nós neste estudo atual. Aqueles autores sugeriram que dependendo do estímulo, esta última poderia translocar-se para uma piroptose, evidenciando assim uma possível interação entre essas vias, e tendo como produto final, o extravasamento de membrana plasmática (Donado *et al.*, 2020). Esses dados sustentam o que Berghe e colaboradores viram em 2010, quando perceberam que anti-Fas induzia apoptose e posterior “necrose secundária”, a qual é caracterizada por estresse oxidativo, hiperpolarização mitocondrial e permeabilidade da membrana lisossomal (Berghe *et al.*, 2009). Mediante isso, o nosso modelo para a avaliação do tipo de necrose seria limitado, pois o mesmo não nos permite nomear o mecanismo de extravasamento de membrana plasmática que poderia estar ocorrendo. Porém, sugere a possibilidade de que a apoptose inicial também esteja sendo translocada para a piroptose, visto que a inibição de Fas/FasL foi extremamente significativa. Mais estudos necessitam ser feitos com técnicas acessórias para confirmar essa suposição.

O TRAIL é expresso principalmente em neutrófilos, sendo melhor descrito no contexto de apoptose em células tumorais (Liguori *et al.*, 2016; Baskar *et al.*, 2019). Monócitos e macrófagos também podem expressar seus cinco receptores, e assim serem suscetíveis à apoptose dependente de caspase pelo rhTRAIL (Liguori *et al.*, 2016; Baskar *et al.*, 2019). A literatura evidencia a importância e o aumento do TRAIL produzido por neutrófilos mediado pela vacina BCG no tratamento de câncer de bexiga, e conseqüentemente, na apoptose das células tumorais (Liguori *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Isto se torna relevante e interessante, pois já foi demonstrado o aumento de TRAIL em pacientes que fazem uso da imunoterapia com o BCG, e não em pacientes com infecção urinária, evidenciando que é a vacina BCG que estimula os neutrófilos a produzirem o TRAIL (Rosevear *et al.*, 2009). Ademais, citocinas também induzidas pela vacina BCG, como IL-8 e IFN- γ , favorecem o

recrutamento de neutrófilos e a secreção de TRAIL (Simons *et al.*, 2007). Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que TRAIL pode estar envolvido na apoptose mediada pela vacina BCG, de forma similar aos resultados obtidos com Fas. Contudo, novamente as técnicas acessórias precisam ser realizadas para elucidar essa suposição.

A apoptose mediada por TNF ocorre em contextos de infecções, tumores ou estresses (Ebach *et al.*, 2005). O TNF é uma das principais citocinas envolvidas na eliminação do Mtb, por conseguir induzir os macrófagos infectados a apoptose (Rojas *et al.*, 1999). Estudos prévios do nosso e outros grupos, já mostraram que a vacina BCG foi capaz de induzir produção de TNF em PBMC e em células de linhagem THP-1 (Simas *et al.*, 2011; Souza-Vasconcelos *et al.*, 2015), visto que há um aumento de TNF transmembranar e TNF em macrófagos estimulados com o BCG (Rodriguez-Cruz *et al.*, 2019). Hipoteticamente, isso impactaria na ativação e migração de células imunes ao local da infecção (Rodriguez-Cruz *et al.*, 2019), e o consequente processamento do antígeno. O bloqueio prévio por neutralizante de TNF reduziu os percentuais de apoptose mediados pela vacina BCG Moreau, corroborando com estudo anterior do nosso grupo (Simas *et al.*, 2011). O intrigante foi que, no que se refere a expressão de TRADD em PBMCs infectadas com o BCG, não encontramos valores modulados de forma significativa. Logo, estudos adicionais ainda seriam necessários para se entender o papel real de TNF na apoptose mediada pela vacina BCG. Além disso, assim como observado na inibição de Fas, a inibição do TNFR1 reduziu os percentuais de necrose em PBMC estimuladas com o MC controle positivo (Figura Suplementar 2).

O eixo TNF/TNFR1 já é conhecido por atuar em diferentes mecanismos programados de morte celular, como a necroptose (Blaser *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que TNF pode estar envolvido na piroptose e autofagia de células hepáticas humanas (Ezquerro *et al.*, 2018), assim como na piroptose de células renais (Wang *et al.*, 2020). Ademais, a participação de TNF na inibição da ferroptose em fibroblastos, também já foi vista (Wu *et al.*, 2022). Esses dados reforçam a importância do TNF nos diversos mecanismos de morte celular, não apenas a apoptose. Novamente, isso levanta alguns questionamentos do nosso modelo, visto que a redução dos percentuais de necrose via a neutralização de

TNFR1, pode ser resultado da inibição de uma morte celular secundária (Silva, do Vale e Santos, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Porém, alguns autores criticam o termo “morte secundária acidental”, pois os mesmos acreditam que a translocação da apoptose para necrose seria finamente regulada, o que impactaria diretamente na fisiopatologia e nas implicações terapêuticas de diferentes doenças (Berghe *et al.*, 2014; Galluzi & Kromer, 2017). Mediante isso, mais estudos precisam ser realizados para se averiguar o verdadeiro papel de TNF no nosso modelo.

Na literatura, já está bem fundamentado que a vacina BCG seria capaz de induzir IL-1 β em PBMC e em células de linhagem THP-1 (Simas *et al.*, 2011; Souza-Vasconcelos *et al.*, 2015), bem como essa citocina seria importante em outros contextos, como na imunidade treinada induzida pelo BCG (Arts *et al.*, 2018). Dados obtidos pelo nosso grupo já mostraram uma relação positiva entre a liberação de caspase-1 e IL-1 β induzidas pela vacina BCG Moreau em PBMC, bem como em células de cordão umbilical e de linhagem THP-1 (Antas *et al.*, 2019). Como um todo, esses resultados fortalecem a ideia de que há o envolvimento desses marcadores tipicamente associados a piroptose, na morte celular induzida pela vacina BCG (Antas *et al.*, 2019), o que é fortalecido pelos resultados da inibição com os anticorpos neutralizantes anti-IL-1 β na redução dos percentuais necrose em células PBMC infectadas com a vacina BCG. Ademais, naquele mesmo estudo não foi possível identificar os marcadores de ativação de inflamassoma (Antas *et al.*, 2019), o que fortalece o entendimento de que as vias de morte celular “conversam” ativamente entre si (Taabazuing, Okongo and Bachovchih, 2017; Donado *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que alterações transmembranares nas mitocôndrias resultam na liberação do citocromo C para o citosol, o qual desencadearia um processo apoptótico intrínseco (Shen *et al.*, 2017). A IL-1 β seria uma citocina importante nesse tipo de morte celular, pois a mesma induz aumento nos níveis de citocromo C (Shen *et al.*, 2017). Logo, a necessidade de estudar melhor essas vias de morte celular que possam estar sendo induzidas pela vacina BCG de forma mais integrada, se torna tentadora. Além disso, mais estudos precisam ser realizados para se averiguar os possíveis mecanismos autócrinos no eixo IL-1 β /IL-1R na apoptose mediada pelo BCG em monócitos humanos.

Na concepção de que as vias de morte celular “conversam” entre si, há sinalizações em comum entre a apoptose e a autofagia, estas mediadas por estresse de retículo endoplasmático (Song *et al.*, 2017). Mediante o estímulo celular, pode ocorrer uma autofagia inicial e uma posterior translocação para a apoptose, ou até mesmo, a inibição desta última (Song *et al.*, 2017). Também já foi visto que a apoptose pode acontecer de forma sinérgica com a ferroptose, através da modulação de TRAIL por agentes ferroptóticos, em células tumorais (Hong *et al.*, 2017). Nossos resultados em PBMC mostraram que os mediadores solúveis podem induzir percentuais aumentados e significantes de apoptose de forma isolada, mas não de forma conjunta. Esse dado é interessante, pois a suposição de que a neutralização dos mediadores de interesse poderia reduzir drasticamente a apoptose mediada pelo BCG, se tornou abolida. Logo, isso nos fez refletir em uma possível modulação e interação entre esses mediadores na indução de apoptose.

Como limitações técnicas encontradas, (i) esse estudo incluiu o uso de células de linhagem THP-1 e respostas imunes *in vitro*, o que poderia ocorrer como um vies de acordo com o tipo de linhagem celular utilizada (Daigneault *et al.*, 2010). (ii) O número de experimentos foi reduzido. Logo, apesar das análises apresentarem poder estatístico, as amostras do estudo foram obtidas de doadores sadios com o componente genético miscigenado, o que traz uma margem de variabilidade muito grande (Tanabe *et al.*, 2018). (iii) Houve uma dificuldade em trabalhar com PBMC provindas de “buffy-coat”, visto que por ser tratar de uma cultura primária, as mesmas apresentaram níveis elevados de morte celular espontânea em tempos prolongados de cultivo (120 horas). Logo, torna-se imperativo aperfeiçoar este nosso modelo para tentar minimizar a morte celular basal em períodos longos de cultura. Ademais, já foi observado que o processo da obtenção das amostras clínicas por leucoferese, pode vir a influenciar de forma negativa a viabilidade celular, uma vez que este processamento seria mediante sucessivas etapas de centrifugação (Redsang – Sibratec, 2011). Este viés tem o potencial de acarretar em uma baixa viabilidade celular (Dagur Mccoy, 2016). Além desse fato, a baixa viabilidade na amostra final também pode ser devida à presença de agentes citotóxicos, como

conservantes presentes em um dos reagentes utilizados no manuseamento dessas amostras (Dagur; Mccoy, 2016).

Como limitações biológicas encontradas, (i) esse estudo utilizou PBMC de doadores adultos saudáveis que provavelmente foram previamente imunizados na infância com a vacina BCG. Ademais, a cidade do Rio de Janeiro é endêmica para TB e NTMs (Rodrigo *et al.*, 2016). Com isso, torna-se necessário avaliar a apoptose induzida pelo BCG em um modelo *in vitro* com indivíduos que nunca foram expostos à vacina BCG ou quaisquer NTMs. Este modelo alternativo só seria factível recrutando indivíduos no ato do nascimento. Assim, estudos do nosso grupo já mostraram que a infecção de células de cordão umbilical com a vacina BCG Moreau induziu percentuais elevados e significantes de necrose, mas não apoptose, quando comparados com o controle não estimulado (Simas *et al.*, 2011). Isso potencializa a necessidade de experimentos adicionais nos modelos experimentais utilizados neste trabalho (Figura 23).

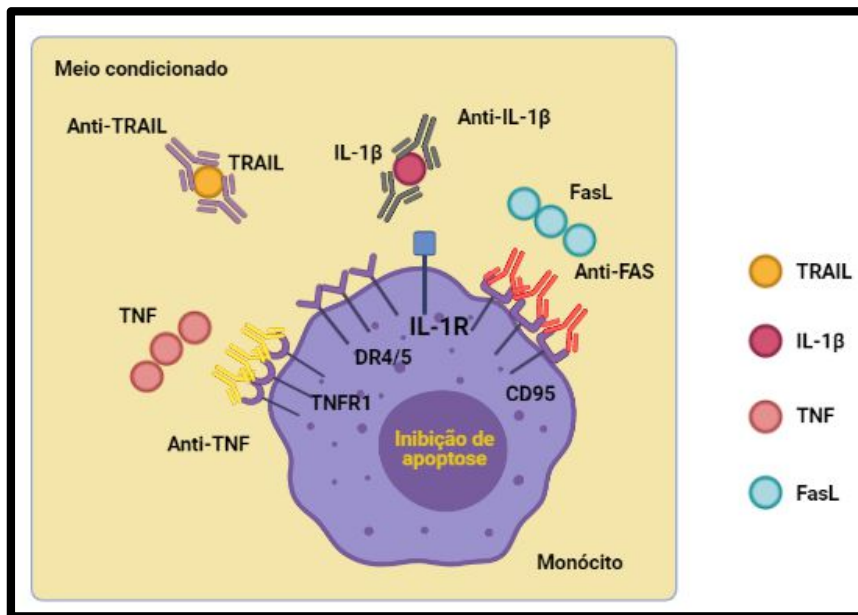


Figura 23: Modelo de inibição e apoptose em monócitos humanos estimulados com MC de PBMC infectadas com a vacina BCG, através do bloqueio com os anticorpos neutralizantes.

6 CONCLUSÕES

- 1) A vacina BCG Moreau foi capaz de induzir *in vitro* a expressão dos genes Fas e caspase-1 em PBMC;
- 2) Os fatores solúveis presentes no meio condicionado de PBMC estimuladas com a vacina BCG Moreau foram capazes de induzir apoptose nas PBMC autólogas e na linhagem THP-1 em repouso;
- 3) Os anticorpos neutralizantes conseguiram bloquear parcialmente a apoptose em PBMCs estimuladas com meio condicionado obtido de células autólogas infectadas com a vacina BCG Moreau, mostrando uma possível indução de mecanismos multifatoriais de apoptose. Porém, não houve redução significativa da apoptose na linhagem THP-1, também estimuladas com aquele meio condicionado, a qual que poderia estar sendo induzida pelo MCP-1;
- 4) Os anticorpos neutralizantes utilizados em conjunto, conseguiram bloquear de forma parcial a apoptose em PBMCs estimuladas com meio condicionado obtido de células autólogas infectadas com BCG, porém não tão significativo quanto de forma isolada.

7 PERSPECTIVAS

- 1) Realizar uma análise proteômica do meio condicionado estimulado ou não com a vacina BCG Moreau, para validar os componentes presentes na sua composição;
- 2) Padronizar os protocolos de dosagem de FasL e TRAIL pela técnica de ELISA;
- 3) Realizar mais experimentos com os anticorpos neutralizantes, mesclando as combinações, para verificar se há uma possível interação entre os mediadores bloqueados na apoptose mediada pela vacina BCG Moreau;
- 4) Avaliar a apoptose mediada pela vacina BCG em monócitos humanos por outra metodologia, como microscopia de imunofluorescência;
- 5) Dosar caspase 8, importante caspase envolvida na apoptose extrínseca;
- 6) Inibir MCP-1 com anticorpos neutralizantes nas células de linhagem THP-1 infectadas com a vacina BCG Moreau e avaliar os percentuais de apoptose.

8 REFERÊNCIAS

1. Al-Aamri Hm, Irving Hr, Bradley C, Meehan-Andrews T. Intrinsic And Extrinsic Apoptosis Responses In Leukaemia Cells Following Daunorubicin Treatment. **Bmc Cancer**. 2021; 21(1): 438.
2. Albert B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K e Walter P. Molecular Biology Of The Cell. **Garland Science**. 2014; 5: 1728 pp.
3. Albuquerque, L. **Avaliação do efeito in vitro da vacina BCG Moreau na expressão de marcadores fenotípicos e no perfil de citocinas em adultos e neonatos**. Orientador: Paulo Renato Zuquim Antas, 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.
4. Allard B, Panariti A, Martin Jg. Alveolar Macrophages In The Resolution Of Inflammation, Tissue Repair, And Tolerance To Infection. **Front Immunol**. 2018; 9:1777.
5. Amaral Ep, Costa Dl, Namasivayam S, Riteau N, Kamenyeva O, Mittereder L, Mayer-Barber Kd, Andrade Bb, Sher A. A Major Role For Ferroptosis In Mycobacterium Tuberculosis-Induced Cell Death And Tissue Necrosis. **J Exp Med**. 2019; 216(3): 556-570.
6. Anderson FD, Ushijima RN, Larson CL. Recurrent herpes genitalis. Treatment with Mycobacterium bovis (BCG). *Obstet Gynecol*. 1974; 43(6):797-805.
7. Antas, Paulo Rz, Ponte Carlos Gg, Almeida, Matheus R., Albuquerque, Lawrence Hp, Sousa-Vasconcelos, Periel S., Pedro, Thaize, Gomes Natália Ls, Moreira, Otacílio C., Silva, Fernanda C., Castello Branco, Luíz Rr, Pinho, Rosa T. 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 (Lond)**. 2019; 16 (18).
8. Antonangelo L, Faria CS, Sales RK. Tuberculous pleural effusion: diagnosis & management. **Expert Rev Respir Med**. 2019; 13(8):747-759.
9. Aoshi T *et al*. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. **Curr Opin Virol**. 2011; 1(4):226-32.
10. Arnett E, et al. PPAR γ is critical for Mycobacterium tuberculosis induction of Mcl-1 and limitation of human macrophage apoptosis. *PLoS Pathog*. 2018 Jun

- 21;14(6):e1007100. doi: 10.1371/journal.ppat.1007100. PMID: 29928066; PMCID: PMC6013021.
11. Arts Rjw, Moorlag Sjcfm, Novakovic B, Li Y, Wang Sy, Oosting M, Kumar V, Xavier Rj, Wijmenga C, Joosten Lab, Reusken Cbem, Benn Cs, Aaby P, Koopmans Mp, Stunnenberg Hg, Van Crevel R, Netea Mg. Bcg Vaccination Protects Against Experimental Viral Infection In Humans Through The Induction Of Cytokines Associated With Trained Immunity. **Cell Host Microbe**. 2018; 23(1):89-100.
 12. Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LR. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2005; 100(5): 459-65.
 13. Benn CS *et al*. Vaccinology: time to change the paradigm? **Lancet Infect Dis**. 2020; 20(10):e274-e283.
 14. Bhat ZS, Rather MA, Maqbool M, Lah HU, Yousuf SK, Ahmad Z. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in Mycobacterium tuberculosis. **Biomed Pharmacother**. 2017; 95: 1520-1534.
 15. Blaser H *et al*. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends Cell Biol**. 2016; 26(4):249-261.
 16. Bombarda S. *et al*. Imagem em Tuberculose Pulmonar. **J Pneumol**. 2001; 27(6).
 17. Brandau S *et al*. Killing of Fas ligand-resistant renal carcinoma cells by interleukin-2- and BCG-activated effector cells. **Cancer Immunol Immunother**. 2000; 49(7):369-76.
 18. Brasil. Ministério Da Saúde. Boletim Epidemiológico Tuberculose 2021.
 19. Brasil. Ministério Da Saúde. Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação. Edição 1. 2014.
 20. Brasil. Ministério Da Saúde. Manual de recomendações para o controle de Tuberculose no Brasil. Edição 2. 2019.
 21. Brasil. Ministério Da Saúde. Manual Nacional De Vigilância Laboratorial Da Tuberculose E Outras Micobactérias. Brasília. 2008.
 22. Brasil. Ministério Da Saúde. Plano Nacional Pelo Fim Da Tuberculose Como Problema De Saúde Pública. Brasília .2017

23. Brasil. Ministério Da Saúde. Técnicas de aplicação e leitura de prova tuberculínica. Brasília. 2014.
24. Budak F, Uzaslan Ek, Cangür S, Göral G, Oral Hb. Increased Pleural Soluble Fas Ligand (Sfasl) Levels In Tuberculosis Pleurisy And Its Relation With T-Helper Type 1 Cytokines. **Lung**. 2008; 186(5): 337-43.
25. Butler Re, Krishnan N, Garcia-Jimenez W, Francis R, Martyn A, Mendum T, Felemban S, Locker N, Salguero Fj, Robertson B, Stewart Gr. Susceptibility Of Mycobacterium Tuberculosis-Infected Host Cells To Phospho-Mlkl Driven Necroptosis Is Dependent On Cell Type And Presence Of Tnfa. **Virulence**. 2017; 8(8): 1820-1832.
26. Cardona PJ. Reactivation or reinfection in adult tuberculosis: Is that the question? **Int J Mycobacteriol**. 2016; 5(4):400-407.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Availability of an Assay for Detecting Mycobacterium tuberculosis, Including Rifampin-Resistant Strains, and Considerations for Its Use — United States, 2013. **EUA**, 2013; 62(41): 821-827.
28. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. **Int Immunopharmacol**. 2014 ;23(1):37-45.
29. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro Jp, Brauer Mj, Kiefer Mc, Barr Pj, Mountz Jd. Protection From Fas-Mediated Apoptosis By A Soluble Form Of The Fas Molecule. **Science**. 1994; 263(5154): 1759-62.
30. Cho T *et al*. A review of the BCG vaccine and other approaches toward tuberculosis eradication. **Hum Vaccin Immunother**. 2021; 17(8):2454-2470.
31. Churchyard *et al*. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **J Infect Dis**. 2017; 216(suppl_6): S629-S635.
32. Cirovic B *et al*. BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment. **Cell Host Microbe**. 2020; 28(2):322-334.e5.
33. Croft M, Siegel Rm. Beyond Tnf: Tnf Superfamily Cytokines As Targets For The Treatment Of Rheumatic Diseases. **Nat Rev Rheumatol**. 2017; 13(4): 217-233.

34. Cui Hy, Zhang Q, Su B, Li W, Tang Sj. Differential Levels Of Cytokines And Soluble Fas Ligand Between Tuberculous And Malignant Effusions. **J Int Med Res.** 2010; 38(6):2063-9.
35. Dagg B. *et al.* The establishment of sub-strain specific WHO Reference Reagents for BCG vaccine. **Vaccine.** 2014; 32(48):6390-6395.
36. Dagur PK e McCoy JP Jr. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. **Curr Protoc Cytom.** 2015; 73:5.1.1-5.1.16.
37. Daigneault M *et al.* The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PLoS One.** 2010; 5(1):e8668.
38. Danelishvili L, Mcgarvey J, Li Yj, Bermudez Le. Mycobacterium Tuberculosis Infection Causes Different Levels Of Apoptosis And Necrosis In Human Macrophages And Alveolar Epithelial Cells. **Cell Microbiol.** 2003; 5(9): 649-60.
39. D'arcy Ms. Cell Death: A Review Of The Major Forms Of Apoptosis, Necrosis And Autophagy. **Cell Biol Int.** 2019; 43(6): 582-592.
40. Donado CA *et al.* A Two-Cell Model for IL-1 β Release Mediated by Death-Receptor Signaling. **Cell Rep.** 2020; 31(1):107466.
41. Doupis J, *et al.* The Role of Pediatric BCG Vaccine in Type 1 Diabetes Onset. **Diabetes Ther.** 2021; 12(11):2971-2976.
42. Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. The mycobacterial cell envelope - a moving target. **Nat Rev Microbiol.** 2020; 18(1):47-59.
43. El-Zein M, *et al.* Association Between Bacillus Calmette-Guérin Vaccination and Childhood Asthma in the Quebec Birth Cohort on Immunity and Health. **Am J Epidemiol.** 2017 ; 186(3):344-355.
44. Ezquerro S. *et al.* Ghrelin Reduces TNF- α -Induced Human Hepatocyte Apoptosis, Autophagy, and Pyroptosis: Role in Obesity-Associated NAFLD. **J Clin Endocrinol Metab.** 2019; 104(1):21-37.
45. Fadeel, B., & Orrenius, S. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications In Human Disease. **Journal Of Internal Medicine.** 2005; 258(6), 479–517.
46. Fekrvand S, Yazdani R, Olbrich P, Gennery A, Rosenzweig Sd, Condino-Neto A, Azizi G, Rafiemanesh H, Hassanpour G, Rezaei N, Abolhassani H,

- Aghamohammadi A. Primary Immunodeficiency Diseases And Bacillus Calmette-Guérin (Bcg)-Vaccine-Derived Complications: A Systematic Review. **J Allergy Clin Immunol Pract**. 2020; 8(4):1371-1386
47. Ferluga J, Yasmin H, Al-Ahdal MN, Bhakta S, Kishore U. Natural and trained innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Immunobiology*. 2020; 225(3):151951.
48. Flores-Valdez MA. After 100 Years of BCG Immunization against Tuberculosis, What Is New and Still Outstanding for This Vaccine? **Vaccines**. 2021; 10(1):57.
49. Fogel N. Tuberculosis: a disease without boundaries. **Tuberculosis** (Edinb). 2015 ; 95(5):527-531.
- 50.** Fritsch M *et al*. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. **Nature**. 2019; 575 (7784):683-687.
51. Fritschi N, Curtis N, Ritz N. Bacille Calmette Guérin (Bcg) And New Tb Vaccines: Specific, Cross-Mycobacterial And Off-Target Effects. **Paediatr Respir Rev**. 2020; 36:57-64.
52. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic Cell Death In Cancer And Infectious Disease. **Nat Rev Immunol**. 2017; 17(2):97-111.
53. Galluzzi L, Kroemer G. Secondary Necrosis: Accidental No More. **Trends Cancer**. 2017 ;3(1):1-2.
54. Green Dr. The Coming Decade Of Cell Death Research: Five Riddles. **Cell**. 2019; 177(5): 1094-1107.
55. Guégan Jp, Legembre P. Nonapoptotic Functions Of Fas/Cd95 In The Immune Response. **Febs J**. 2018; 285(5): 809-827.
56. Gupta P, Barthwal Mk. Il-1 B Genesis: The Art Of Regulating The Regulator. **Cell Mol Immunol**. 2018; 15(11):998-1000.
57. Han J, Gu X, Li Y, Wu Q. Mechanisms Of Bcg In The Treatment Of Bladder Cancer-Current Understanding And The Prospect. **Biomed Pharmacother**. 2020; 129:110393.
58. Hong Sh, Lee Dh, Lee Ys, Jo Mj, Jeong Ya, Kwon Wt, Choudry Ha, Bartlett Dl, Lee Yj. Molecular Crosstalk Between Ferroptosis And Apoptosis: Emerging Role Of Er Stress-Induced P53-Independent Puma Expression. **Oncotarget**. 2017; 8(70): 115164-115178.

59. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane Tnf-Alpha: Structure, Function And Interaction With Anti-Tnf/Anti-TNFR1 Agents. **Rheumatology (Oxford)**. 2010; 49(7): 1215-28.
60. Huang L, Nazarova Ev, Russell Dg. Mycobacterium Tuberculosis: Bacterial Fitness Within The Host Macrophage. **Microbiol Spectr**. 2019; 7(2):10.1128.
61. Jiang W, Wu Db, Fu Sy, Chen Eq, Tang H, Zhou Ty. Insight Into The Role Of Trail In Liver Diseases. **Biomed Pharmacother**. 2019; 110:641-645.
62. Jinesh G G, Chunduru S, Kamat AM. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF- α but not through TRAIL and FasL. **J Leukoc Biol**. 2012;92(1):233-44.
63. Kabir et al. Diagnostic challenges and Gene-Xpert utility in detecting Mycobacterium tuberculosis among suspected cases of Pulmonary tuberculosis. **PLoS One**. 2021;16(5): e0251858.
64. Kajikawa O, Herrero R, Chow Yh, Hung Cf, Matute-Bello G. The Bioactivity Of Soluble Fas Ligand Is Modulated By Key Amino Acids Of Its Stalk Region. **Plos One**. 2021; 16(6): E0253260.
65. Kashyap D, Garg Vk, Goel N. Intrinsic And Extrinsic Pathways Of Apoptosis: Role In Cancer Development And Prognosis. **Adv Protein Chem Struct Biol**. 2021; 125:73-120.
66. Kaufmann SH. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. **Nat Rev Immunol**. 2006; 6(9):699-704.
67. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):2016-20. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2016. PMID: 10657653.
68. Kile Bt. The Role Of The Intrinsic Apoptosis Pathway In Platelet Life And Death. **J Thromb Haemost**. 2009; Suppl 1:214-7.
69. Koch, A., & Mizrahi, V. Mycobacterium Tuberculosis. **Trends In Microbiology**. 2018; 26(6): 555-556.
70. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberculose. (Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März er, gehaltenen Vortrage) [Die Aetiologie der Tuberculose. Facsimile of the original contribution by Robert Koch in "Berliner Klinische Wochenschrift" 10 April 1882]. German. *Fortschr Med*. 1982; 100(12):539.

71. Kourime M *et al.* [BCGitis/BCGosis in children: Diagnosis, classification and exploration]. **Arch Pediatr.** 2016; 23(7):754-759.
72. Kowalewicz-Kulbat M, Loch C. Bcg And Protection Against Inflammatory And Auto-Immune Diseases. **Expert Rev Vaccines.** 2017 ; 16(7):1-10.
73. Krishnan, Nitya; Robertson, Brian D.; Thwaites, Guy. The Mechanisms And Consequences Of The Extra-Pulmonary Dissemination Of Mycobacterium Tuberculosis. **Tuberculosis.** 2010; 90(6): 361-366.
74. Kumar P *et al.* Enhanced survival of BCG-stimulated dendritic cells: involvement of anti-apoptotic proteins and NF- κ B. **Biol Open.** 2018: 7(6):bio032045.
75. Lai, Y. *et al.* Induction of cell cycle arrest and apoptosis by BCG infection in cultured human bronchial airway epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2007; 293; p. 393–401.
76. Lange C *et al.* 100 years of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin. **Lancet Infect Dis.** 2022: 22(1):e2-e12.
77. Le Gallo M, Legembre P. Cd95 Stimulation With Cd95I And Disc Analysis. **Methods Mol Biol.** 2017; 1557:11-18.
78. Lee Ch, Hung Pf, Lu Sc, Chung Hl, Chiang Sl, Wu Ct, Chou Wc, Sun Cy. Mcp-1/Mcpip-1 Signaling Modulates The Effects Of Il-1 β In Renal Cell Carcinoma Through Er Stress-Mediated Apoptosis. **Int J Mol Sci.** 2019; 2e0(23):6101.
79. Leentjens J, *et al.* 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.
80. Legrand Aj, Konstantinou M, Goode Ef, Meier P. The Diversification Of Cell Death And Immunity: Memento Mori. **Mol Cell.** 2019; 76(2): 232-242.
81. Levoïn N, Jean M, Legembre P. Cd95 Structure, Aggregation And Cell Signaling. **Front Cell Dev Biol.** 2020; 8:314.
82. Li L *et al.* Pyroptosis, a new bridge to tumor immunity. **Cancer Sci.** 2021; 112(10):3979-3994..
83. Lima L, Ferreira Ja, Tavares A, Oliveira D, Morais A, Videira Pa, Medeiros R, Santos L. FasI Polymorphism Is Associated With Response To Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy In Bladder Cancer. **Urol Oncol.** 2014; 32(1): 44.E1-7.

84. Liu B, Sun R, Luo H, Liu X, Jiang M, Yuan C, Yang L, Hu J. Both Intrinsic And Extrinsic Apoptotic Pathways Are Involved In Toll-Like Receptor 4 (Tlr4)-Induced Cell Death In Monocytic Thp-1 **Cells. Immunobiology.** 2017; 222(2): 198-205.
85. Liu J, Tran V, Leung As, Alexander Dc, Zhu B. Bcg Vaccines Their Mechanisms Of Attenuation And Impact On Safety And Protective Efficacy. **Human Vaccines** 2009; 5:2, 70-78.
86. Liu WM *et al.* Supernatants from lymphocytes stimulated with Bacillus Calmette-Guerin can modify the antigenicity of tumours and stimulate allogeneic T-cell responses. **Br J Cancer.** 2011;105(5):687-93.
87. Liu Y, Cai H. The Lrp of Mycobacterium tuberculosis regulates the innate immune response of macrophages. *Cell Mol Immunol.* 2018; 15(10):934-936.
88. Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, Qi D, Lin C, Tong R, Wang Y. Rip1/Rip3-Regulated Necroptosis As A Target For Multifaceted Disease Therapy (Review). **Int J Mol Med.** 2019; 44(3):771-786.
89. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding The Mechanism Of Il-1 β Secretion. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2011; 22(4): 189-95.
90. Luo Y, Fu X, Han B, Zhang F, Yuan L, Men H, Zhang S, Tian S, Dong B, Meng M. The Apoptosis Mechanism Of Epirubicin Combined With Bcg On Human Bladder Cancer Cells. **Anticancer Agents Med Chem.** 2020; 20(13): 1571-1581.
91. Lyon, SM.; Rossman, MD. Pulmonary Tuberculosis. **Microbiology Spectrum.** 2017; 5: 1-13.
92. Malhotra V, Okon BP, Clark-Curtiss JE. Mycobacterium tuberculosis protein kinase K enables growth adaptation through translation control. **J Bacteriol.** 2012; 194(16):4184-96.
93. Marakalala MJ. *et al.* Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized. *Nat Med.* 2016; 22(5):531-538.
94. Mata E, Tarancon R, Guerrero C, Moreo E, Moreau F, Uranga S, Gomez Ab, Marinova D, Domenech M, Gonzalez-Camacho F, Monzon M, Badiola J, Dominguez-Andres J, Yuste J, Anel A, Peixoto A, Martin C, Aguilo N. Pulmonary Bcg Induces Lung-Resident Macrophage Activation And Confers

- Long-Term Protection Against Tuberculosis. **Sci Immunol**. 2021; 6(63): Eabc2934.
95. McKenzie BA *et al*. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2018; 115(26):E6065-E6074.
96. Mehmud M, Takeda K, Abe M, Ogata H, Hirose S, Okumura K, Fujime M. Fas Ligand And Tnf-Related Apoptosis-Inducing Ligand Induction On Infiltrating Lymphocytes In Bladder Carcinoma By Bacillus Calmette-Guérin **Treatment**. **Urol Int**. 2005; 75(1): 80-7.
97. Messina NL, *et al*. Off-target effects of bacillus Calmette-Guérin vaccination on immune responses to SARS-CoV-2: implications for protection against severe COVID-19. *Clin Transl Immunology*. 2022 Apr 22;11(4):e1387. doi: 10.1002/cti2.1387. PMID: 35573165; PMCID: PMC9028103.
98. Moliva Ji, Turner J, Torrelles Jb. Immune Responses To Bacillus Calmette-Guérin Vaccination: Why Do They Fail To Protect Against Mycobacterium Tuberculosis? **Front Immunol**. 2017; 8: 407.
99. Moorlag Sjcfm, Arts Rjw, Van Crevel R, Netea Mg. Non-Specific Effects Of Bcg Vaccine On Viral Infections. **Clin Microbiol Infect**. 2019; 25(12): 1473-1478.
100. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. *Microbiologia Médica*. V. 6^a ; GEN Guanabara Koogan, 2009, 832 pp.
101. Nagabhushanam V *et al*. Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. **J Immunol**. 2003; 171(9):4750-7.

102. Nakken O, et al. Strong tuberculin response after BCG vaccination is associated with low multiple sclerosis risk: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol*. 2022; dyac039.
103. Nam By, Paeng J, Kim Sh, Lee Sh, Kim Dh, Kang Hy, Li Jj, Kwak Sj, Park Jt, Yoo Th, Han Sh, Kim Dk, Kang Sw. The Mcp-1/Ccr2 Axis In Podocytes Is Involved In Apoptosis Induced By Diabetic Conditions. **Apoptosis**. 2012; 17(1): 1-13.
104. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk Between Apoptosis, Necrosis And Autophagy. **Biochim Biophys Acta**. 2013; 1833(12): 3448-3459.
105. Okuda K, Sakumoto R. Multiple Roles Of Tnf Super Family Members In Corpus Luteum Function. **Reprod Biol Endocrinol**. 2003; 1:95.
106. O'Neill Laj, Netea Mg. Bcg-Induced Trained Immunity: Can It Offer Protection Against Covid-19? **Nat Rev Immunol**. 2020; 20(6): 335-337.
107. Organização Mundial da Saúde. Global Tuberculosis Report 2021.
108. Organização Mundial Da Saúde. Global Tuberculosis Report. 2020.
109. Osborn Tw. Changes In Bcg Strains. **Tubercle**. 1983; 64(1):1-13.
110. Otani T et al. Osteocalcin triggers Fas/FasL-mediated necroptosis in adipocytes via activation of p300. *Cell Death Dis*. 2018; 9(12):1194.
111. Pai et al. M. Tuberculosis. **Nat Rev Dis Primers**. 2016; 2:16076.
112. Pinto et al. Budget impact of the incorporation of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of pulmonary tuberculosis from the perspective of the Brazilian Unified National Health System, Brazil, 2013-2017. **Cad. Saúde Pública**. 2017; 33 (9).
113. Pittet LF et al. BCG vaccination to reduce the impact of COVID-19 in healthcare workers: Protocol for a randomised controlled trial (BRACE trial). *BMJ Open*. 2021; 11(10):e052101.
114. 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.
115. Pym, Alexander S.; Brodin, Priscille; Majlessi, Laleh; Brosch, Roland; Demangel, Caroline; Williams, Ann; Griffiths, Karen E.; Marchal, Gilles;

- Leclerc, Claude; Cole, Stewart T. Recombinant Bcg Exporting Esat-6 Confers Enhanced Protection Against Tuberculosis. **Nature Medicine**. 2003; 9(5): P. 533-539.
116. Rabahi, Marcelo F. *et al.* Tratamento Da Tuberculose. **Jornal Brasileiro De Pneumologia**. 2017; 43: 472-486.
117. REDSANG-SIBRATEC. Manual de controle de qualidade do sangue total e hemocomponentes. 2011.
118. Rodrigues, Nádia Cristina Pinheiro, Andrade, Mônica Kramer de Noronha, Flynn, Matthew, Braga, J.U., Sobral, Andréa, Bastos, L.S, Lino, Valéria Teresa Saraiva. Distribution of Pulmonary Tuberculosis in Rio de Janeiro (Brazil): A Spatial Analysis. *Cien Saude Colet*. 2016 **Disponível em: em:** <http://cienciaesaudecoletiva.com.br/artigos/distribution-of-pulmonary-tuberculosis-in-rio-de-janeiro-brazil-a-spatial-analysis/15626?id=15626>. Acesso em: 26/07/2022.
119. Rodriguez-Cruz A, Vesin D, Ramon-Luing L, Zuñiga J, Quesniaux V, Ryffel B, Lascurain R, Garcia I, Chávez-Galán L. Cd3+ Macrophages Deliver Proinflammatory Cytokines By A Cd3- And Transmembrane Tnf-Dependent Pathway And Are Increased At The Bcg-Infection Site. **Front Immunol**. 2019; 10:2550.
120. Rojas M *et al.* TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. **J Immunol**. 1999; 162(10):6122-6131
121. Russel, David G. Who Puts The Tubercle In Tuberculosis? **Nature Reviews – Microbiology**. 2007; 5: 39-47.
122. Ryan Rc, O'sullivan Mp, Keane J. Mycobacterium Tuberculosis Infection Induces Non-Apoptotic Cell Death Of Human Dendritic Cells. **Bmc Microbiol**. 2011; 11:237.
123. Saldaña, Mariana V.; Sosa, Liliana S.; González, María N.; Izaguirre, María J. Tuberculosis Por Mycobacterium Bovis En Un Niño De La Comuna No 8, Ciudad Autónoma De Buenos Aires. **Arch. Argent. Pediatr**. 2019; 117: 532-535.
124. Sánchez-Rodríguez C, Cruces Kp, Riestra Ayora J, Martín-Sanz E, Sanz-Fernández R. Bcg Immune Activation Reduces Growth And Angiogenesis In

- An In Vitro Model Of Head And Neck Squamous Cell Carcinoma. **Vaccine**. 2017; 35(47): 6395-6403.
125. Sato Aps. What Is The Importance Of Vaccine Hesitancy In The Drop Of Vaccination Coverage In Brazil? **Rev Saude Publica**. 2018; 52: 96.
 126. Schaible Ue, Winau F, Sieling Pa, Fischer K, Collins Hl, Hagens K, Modlin Rl, Brinkmann V, Kaufmann Sh. Apoptosis Facilitates Antigen Presentation To T Lymphocytes Through Mhc-I And Cd1 In Tuberculosis. **Nat Med**. 2003; 9(8): 1039-46.
 127. Schweichel Ju, Merker Hj. The Morphology Of Various Types Of Cell Death In Prenatal Tissues. **Teratology**. 1973; 7(3): 253-66.
 128. Scriba Tj, Penn-Nicholson A, Shankar S, Hraha T, Thompson Eg, Sterling D, Nemes E, Darboe F, Suliman S, Amon Lm, Mahomed H, Erasmus M, Whatney W, Johnson JI, Boom Wh, Hatherill M, Valvo J, De Groote Ma, Ochsner Ua, Aderem A, Hanekom Wa, Zak De; Other Members Of The Acs Cohort Study Team. Sequential Inflammatory Processes Define Human Progression From M. Tuberculosis Infection To Tuberculosis Disease. **Plos Pathog**. 2017; 13(11): E1006687.
 129. Sharma SK, Mohan A, Kohli M. Extrapulmonary tuberculosis. **Expert Rev Respir Med**. 2021 Jul;15(7):931-948.
 130. Sharma, A. Epidemiological transcriptomic data supports BCG protection in viral diseases including COVID-19. *Gene*. 2021; 783: 145574.
 131. Shaw J. e Koegelenberg CFN. Pleural Tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2021; 42(4):649-666.
 132. SHEN, J., XU, S., ZHOU, H., LIU, H., JIANG, W., HAO, J., & HU, Z. IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. **Scientific Reports**, v.7, p. 1–12, 2017.
 133. Sia Jk, Rengarajan J. Immunology Of Mycobacterium Tuberculosis Infections. **Microbiol Spectr**. 2019; 7(4): 10.1128.
 134. Silva MT, do Vale A, dos Santos NM. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. **Apoptosis**. 2008;13(4):463-482.
 135. Silva, Andreon, Ponte, Carlos, Antas, Paulo Rz. What A Difference A Strain Makes! **Int J Tuberc Lung Dis**. 2019; 23: 874.

136. Silva, Denise Rossato, Mello, Fenanda Carvalho De Queiroz, D'ambrosio, Lia, Centis, Rosella , Dalcolmo, Margareth Pretti, Migliori, Giovanni Battista. Tuberculosis And Covid-19, The New Cursed Duet: What Differs Between Brazil And Europe? **J Bras Pneumol**. 2021; 47(2).
137. 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.
138. Simeão, F C S.; Chimara, E; Oliveira, R S.; Yamauchi, J U.; Latrilha, F O.; Telles, M A S. Detecção Do Fator Corda E Avaliação Do Aspecto Macroscópico Das Colônias De Micobactérias: Um Eficiente Teste De Triagem Combinado Para A Identificação Presuntiva Do Complexo Mycobacterium Tuberculosis Em Meios Sólidos. **Jornal Brasileiro De Pneumologia**. 2009; 35: 1213-1216.
139. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Crosstalk Of Autophagy And Apoptosis: Involvement Of The Dual Role Of Autophagy Under Er Stress. **J Cell Physiol**. 2017; 232(11): 2977-2984.
140. Sousa-Vasconcelos Pda S, Seguin Wda S, Luz Ede S, Pinho RT. Pattern of cytokine and chemokine production by THP-1 derived macrophages in response to live or heat-killed Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin Moreau strain. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2015; 110(6):809-13.

141. Souza, SM. Dispersão do Homo sapiens e povoamento dos continentes. Fundamentos da Paleoparasitologia. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2011. 69-92.
142. Suárez I, Fünfer Sm, Kröger S, Rademacher J, Fätkenheuer G, Rybniker J. The Diagnosis And Treatment Of Tuberculosis. **Dtsch Arztebl Int.** 2019; 116(43): 729-735.
143. Sun Q e Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. **J Leukoc Biol.** 2016;100(5):961-967.
144. Tanabe K *et al.* Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2018 ;115(25):6470-6475.
145. Tang D, Kang R, Berghe Tv, Vandenabeele P, Kroemer G. The Molecular Machinery Of Regulated Cell Death. **Cell Res.** 2019; 29(5): 347-364.
146. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L.. Microbiologia. Edição 12. Porto Alegre: Arthmed, 2016.
147. Tschopp J, Schroder K. Nlrp3 Inflammasome Activation: The Convergence Of Multiple Signalling Pathways On Ros Production? **Nat Rev Immunol.** 2010; 10(3): 210-215.
148. Tummers B *et al.* Caspase-8-Dependent Inflammatory Responses Are Controlled by Its Adaptor, FADD, and Necroptosis. **Immunity.** 2020;52(6):994-1006.e8.
149. Vanden Berghe T *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death Differ.** 2010; 17(6):922-930.
150. Vanden Berghe T *et al.* Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2014; 15(2):135-147.
151. Wallach-Dayana Sb, Petukhov D, Ahdut-Hacohen R, Richter-Dayana M, Breuer R. Sfasl-The Key To A Riddle: Immune Responses In Aging Lung And Disease. **Int J Mol Sci.** 2021
152. Wang Y *et al.* TNF- α /HMGB1 inflammation signalling pathway regulates pyroptosis during liver failure and acute kidney injury. **Cell Prolif.** 2020 ; 53(6):e12829.
153. Ware Cf. The Tnf Receptor Super Family In Immune Regulation. **Immunol Rev.** 2011; 244(1): 5-8.

154. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1beta (IL-1 β) Processing Pathway. **Sci Signal**. 2010; 3(105): Cm2.
155. Wong KW, Jacobs WR Jr. Mycobacterium tuberculosis exploits human interferon γ to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis. **J Infect Dis**. 2013; 208(1):109-19.
156. Wu *et al*. TNF antagonist sensitizes synovial fibroblasts to ferroptotic cell death in collagen-induced arthritis mouse models. **Nat Commun**. 2022; 13(1):676.
157. Xu B, Sui YI, Fan Tj. Gatifloxacin Inducing Apoptosis Of Stromal Fibroblasts Through Cross-Talk Between Caspase-Dependent Extrinsic And Intrinsic Pathways. **Int J Ophthalmol**. 2019; 12(10): 1524-1530.
158. Xu D *et al*. Modulating TRADD to restore cellular homeostasis and inhibit apoptosis. **Nature**. 2020; 587(7832):133-138.
159. Xu JC *et al*. More significance of TB-IGRA except for the diagnose of tuberculosis. **J Clin Lab Anal**. 2018;32(1): e22183.
160. Xu X, Lai Y, Hua Zc. Apoptosis And Apoptotic Body: Disease Message And Therapeutic Target Potentials. **Biosci Rep**. 2019; 39(1): Bsr20180992.
161. Yang D, Elnor Sg, Chen X, Field Mg, Petty Hr, Elnor Vm. Mcp-1-Activated Monocytes Induce Apoptosis In Human Retinal Pigment Epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2011; 52(8): 6026-34.
162. Yanti B, Mulyadi M, Amin M, Harapan H, Mertaniasih Nm, Soetjipto S. The Role Of Mycobacterium Tuberculosis Complex Species On Apoptosis And Necroptosis State Of Macrophages Derived From Active Pulmonary Tuberculosis Patients. **Bmc Res Notes**. 2020; 13(1): 415.
163. Yatim N, Cullen S, Albert MI. Dying Cells Actively Regulate Adaptive Immune Responses. **Nat Rev Immunol**. 2017 ; 7(4): 262-275.
164. Yazdi As, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. **Adv Exp Med Biol**. 2016; 941: 21-29.
165. Yu Y, Shao B, Shang F, Zhou Z, Wang X, Shuai Y, Liao L, Jin Y, Yang D. [Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells From Estrogen Deficiency Induced Osteoporosis Mice Regulate T Cell Migration And Apoptosis Through Expressing Mcp-1]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**. 2014; 30(1):19-22.

166. Yuan X, Gajan A, Chu Q, Xiong H, Wu K, Wu Gs. Developing Trail/Trail Death Receptor-Based Cancer Therapies. **Cancer Metastasis Rev.** 2018; 37(4): 733-748.
167. Zhang DW *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. **Science.** 2009; 325(5938):332-336.
168. Zhang, Wen *et al.* Genome Sequencing And Analysis Of Bcg Vaccine Strains. **Plos One.** 2013; 8(8): 1-7.
169. Zhu Y *et al.* Angiotensin II triggers RIPK3-MLKL-mediated necroptosis by activating the Fas/FasL signaling pathway in renal tubular cells. **PLoS One.** 2020; 15(3):e0228385.
170. Ziehl F. Zur färbung des tuberkelbazillus. **Dtsch Med Wochenschr**

ANEXO 1

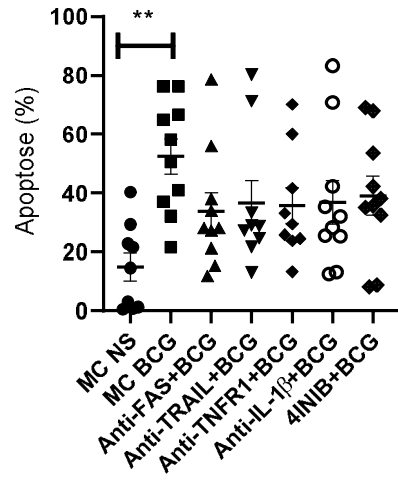


Figura Suplementar 1: Percentuais de apoptose em células de linhagem THP-1 incubadas com o MC controle positivo (BCG) + os anticorpos neutralizantes. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi empregado, com um pós-teste de Dunn $**p < 0,001$. $n = 10$.

“Em Nome Da Ciência Eu Proclamo A Jesus Cristo Como Filho De Deus. Meu Senso Científico, Que Valoriza Muito A Relação Entre Causa E Efeito, Compromete-Me A Aceitá-Lo Como Fato. Minha Necessidade De Adorar Encontra Nele A Mais Plena Satisfação. ” – Louis Pasteur, 1822-1895, Conhecido Como Pai Da Microbiologia.