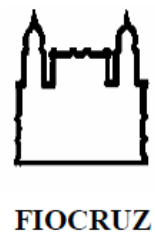




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE
ATIVA E INFECÇÃO LATENTE, VACINADOS OU NÃO COM O BACILO DE
CALMETTE-GUÉRIN (BCG)**

SCARLET TORRES MORAES MOTA

Salvador - Bahia

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE
ATIVA E INFECÇÃO LATENTE, VACINADOS OU NÃO COM O BACILO DE
CALMETTE-GUÉRIN (BCG)**

SCARLET TORRES MORAES MOTA

Orientadora: Theolis Costa Barbosa Bessa

Co-orientadora: Marcia Weber Carneiro

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau
de Mestre.

Salvador – Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M917p Mota, Scarlet Torres Moraes.
Padrões de expressão gênica em indivíduos com tuberculose ativa e infecção latente, vacinados ou não com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). / Scarlet Torres Moraes Mota. - 2018.
73 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Theolis Costa Barbosa Bessa, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Expressão gênica. 3. Vacina.
4. Patogênese. I. Título.

CDU 616.982.2


“PADROES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE ATIVA E INFECÇÃO LATENTE, VACINADOS OU NÃO COM O BACILO DE CALMETTE- GUERIN (BCG)”


SCARLET TORRES MORAES MOTA

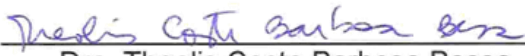
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de janeiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Juliana Perrone B. Menezes Fullam
Pesquisadora
IGM


Dr. Pablo Ivan Pereira Ramos
Pesquisador
IGM


Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa
Pesquisadora
IGM

Dedico este trabalho aos meus pais, João Carlos dos Reis Mota e Ana Maria Torres Moraes, meus maiores exemplos de vida. Cada conquista minha é um triunfo de vocês.

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha família. Meus pais, João e Ana, por todo amor e incentivo. Aos meus irmãos, Stevie e Stefanie, por toda parceria e amizade. Aos meus sobrinhos, Yan e Yuri, que me proporcionam tantas alegrias.

Às minhas orientadoras, Dra. Theolis Barbosa e Dra. Marcia Weber, exemplos de dedicação e comprometimento. Obrigada pela paciência, oportunidade, ensinamentos, e por terem confiado em mim para a realização deste trabalho.

Aos nossos colaboradores, Dr. Artur Trancoso e Dr. Kiyoshi Fukutani, que foram imprescindíveis nas análises computacionais deste trabalho.

Aos meus amigos, que me proporcionaram bons momentos e me apoiaram durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do time TB, que sempre me deram forças e estiveram dispostos a contribuir com preciosas sugestões. Muita obrigada pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos companheiros do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, que nos receberam tão bem neste período e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de mestrado que me foi concedida para o desenvolvimento desta pesquisa.

À biblioteca do IGM, por todo suporte no desenvolvimento do trabalho e ajuda na correção final.

MOTA, Scarlet Torres Moraes. Padrões de expressão gênica em indivíduos com tuberculose ativa e infecção latente, vacinados ou não com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). 73 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica de difícil manejo, pelos diferentes estados de equilíbrio entre a infecção e a resposta imune do indivíduo em sua evolução natural. O reconhecimento precoce da doença ativa é muito importante para o controle da disseminação do bacilo e prevenção de novos casos. Vários estudos têm procurado demonstrar biomarcadores que possam ajudar a reconhecer os diferentes estágios de manifestação da doença, que vão desde a latência à doença ativa. Nos últimos anos, abordagens utilizando biologia de sistemas, uma ferramenta de análise global que permite reconhecer processos modulados na interação entre patógeno e hospedeiro de forma integrada, vêm sendo empregadas para auxiliar na identificação de biomarcadores relevantes no curso da infecção tuberculosa. Porém, há escassez de dados na literatura sobre como a vacina BCG, amplamente utilizada contra a TB em todo o mundo e com amplo espectro de efeitos sobre o organismo, pode influenciar na modulação da resposta imune e na patogênese da doença. **OBJETIVO:** Caracterizar o perfil de expressão gênica em indivíduos com a tuberculose ativa, infecção latente e controles não infectados, incluindo a variável do status de vacinação com a BCG. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para entendermos os potenciais processos biológicos envolvidos nesta interação, efetuamos análises de bioinformática utilizando dados de expressão gênica do banco de dados público Gene Expression Omnibus (GEO). Foram obtidos 3 conjuntos de dados de transcriptoma que avaliaram amostras de sangue total de indivíduos com tuberculose ativa e latente, bem como controles saudáveis, com o status de vacinação com a BCG estabelecido. **RESULTADOS:** Entre os vacinados, os indivíduos com doença tuberculosa diferem dos controles em 4 genes, que estão associados à morte e sobrevivência celular, a autofagia, bem como a maturação do fagossomo. Ao comparar indivíduos com TB ativa e infecção latente observa-se 3 genes modulados, que estão associados ao metabolismo lipídico e de carboidratos, assim como transporte molecular. Em contraste, entre indivíduos não vacinados, as comparações entre indivíduos controles, infectados e doentes mostram 100 moléculas moduladas, com algumas interseções em vias moduladas entre indivíduos vacinados. RAB25 e SLC30A3 apresentam-se modulados positivamente em indivíduos doentes não vacinados em comparação com vacinados. Essas moléculas agem sobre o transporte molecular, migração celular, sinalização célula-célula, bem como no metabolismo de carboidratos. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados sugerem que a vacinação prévia com BCG interfere na modulação de genes específicos, influenciando na patogênese da doença pela alteração de vias importantes no controle da infecção. Estes achados podem ser aplicados no desenvolvimento de novas terapias ou otimização de terapias já existentes.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, expressão gênica, vacina, patogênese.

MOTA, Scarlet Torres Moraes. Patterns of gene expression in individuals with active tuberculosis and latent infection, vaccinated or not with Bacillus Calmette-Guérin (BCG). 73 f. il. Dissertation (Master's degree in Pathology) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease difficult to manage due to the different equilibrium states between the infection and the individual's immune response in its natural evolution. Early identification of active disease is very important for the bacillus dissemination control and prevention of new cases. Several studies attempted to find molecules that may help to distinct stages of disease manifestation, ranging from latent to active disease. In recent years, a global analysis tool that allows the recognition of modulated processes between pathogen and host interaction called systems biology have been employed to assist in the identification of relevant biomarkers in tuberculosis infection course. However, there is a shortage of data in the literature on how the BCG vaccine, widely used against TB worldwide and with a wide spectrum of effects on the organism, can influence the modulation of the immune response and the pathogenesis of the disease. **AIM:** To characterize the gene expression profile in individuals with active tuberculosis, latent infection and non-infected controls, including the variable of vaccination status with BCG. **MATERIAL AND METHODS:** To understand the potential biological processes involved in this interaction, we performed bioinformatics analyzes using gene expression data from the public database Gene Expression Omnibus (GEO). Transcriptome data from 3 datasets that evaluated whole blood samples from individuals with active and latent tuberculosis, as well as healthy controls, with their established BCG vaccination status were obtained. **RESULTS:** Among vaccinated, those with tuberculous disease differ from controls in 4 genes, which are associated with cell death and survival, autophagy, as well as phagosome maturation. When comparing individuals with active TB and latent infection, 3 modulated genes are observed, which are associated with lipid and carbohydrate metabolism, as well as molecular transport. In contrast, among unvaccinated individuals, comparisons between controls individuals, infected and patients presented 100 modulated molecules, with some intersections in modulated pathways between vaccinated individuals. RAB25 and SLC30A3 are upregulated in unvaccinated patients compared to vaccinated. These molecules act on molecular transport, cell movement, cell-cell signaling, as well as carbohydrate metabolism. **CONCLUSION:** Our results suggest that previous vaccination with BCG interferes in the modulation of specific genes, influencing the pathogenesis of the disease by altering important pathways in infection control. These findings can be applied to the development of new therapies or optimizing existing therapies.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, gene expression, vaccine, pathogenesis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Top 10 das causas de morte em todo o mundo, em 2015 (WHO, 2017)... | 17 |
| Figura 2. Taxa de Incidência da tuberculose no mundo, em 2015 (WHO, 2016)... | 18 |
| Figura 3. Escala Temporal na infecção tuberculosa (YOUNG et al., 2008)..... | 20 |
| Figura 4. Assinatura de risco para tuberculose (ZAK et al., 2016)..... | 22 |
| Figura 5. Possíveis mecanismos em que a BCG pode afetar infecções na infância, crescimento e desenvolvimento psicomotor (KJAERGAARD, 2016)..... | 24 |
| Figura 6. Decifrando interações patógeno-hospedeiro usando biologia de sistemas e implicações para desenvolvimento terapêutico (TISONCIK et al., 2009)..... | 26 |
| Figura 7. Representação esquemática do desenho de estudo..... | 29 |
| Figura 8. Definição dos grupos de comparação utilizados para definição dos GDEs..... | 32 |
| Figura 9. Seleção dos conjuntos de dados..... | 33 |
| Figura 10. Representação da Análise de Componente Principal realizada com as amostras pertencentes aos grupos CNI, ITBL e TBA dos conjuntos de dados..... | 35 |
| Figura 11. Genes diferencialmente expressos no Grupo 1 – Vacinados..... | 36 |
| Figura 12. Diagrama de Venn representando os genes diferencialmente expressos em comum para as diferentes comparações do Grupo 1 – Vacinados..... | 39 |
| Figura 13. Genes diferencialmente expressos no Grupo 2 – Não vacinados..... | 42 |
| Figura 14. Diagrama de Venn com os genes em comum do Grupo 2 – Não Vacinados..... | 45 |
| Figura 15. Genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não vacinados vs Vacinados..... | 49 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16. Redes complexas de interação para os genes diferencialmente expressos na comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+..... | 53 |
| Figura 17. Redes complexas de interação para os genes diferencialmente expressos na comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+..... | 57 |
| Figura 18. Conexão entre as vias canônicas associadas aos genes diferencialmente expressos na comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+..... | |

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Características dos conjuntos de dados..... | 34 |
| Tabela 2. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 1 – Vacinados, Comparação A: TBA vs ITBL..... | 38 |
| Tabela 3. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 1 – Vacinados, Comparação B: TBA vs CNI..... | 38 |
| Tabela 4. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 1 – Vacinados..... | 40 |
| Tabela 5. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 1 – Vacinados..... | 41 |
| Tabela 6. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 2 – Não vacinados..... | 46 |
| Tabela 7. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 2 – Não vacinados..... | 48 |
| Tabela 8. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+ | 50 |
| Tabela 9. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 3 – Não vacinados vs Vacinados, Comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+..... | 51 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 10. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+..... | 52 |
| Tabela 11. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+..... | 54 |
| Tabela 12. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 3 – Não vacinados vs Vacinados, Comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+..... | 55 |
| Tabela 13. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+..... | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|-----------------------------------------|
| ACP | Análise de Componente Principal |
| BCG | Bacilo de Calmette-Guérin |
| BCG- | Não vacinado com a vacina BCG |
| BCG+ | Vacinado com a vacina BCG |
| BK | Bacilo de Kock |
| CNI | Controles não infectados |
| DCs | Células dendríticas |
| FDR | <i>False Discovery Rate</i> |
| GDEs | Genes diferencialmente expressos |
| GEO | <i>Gene Expression Omnibus</i> |
| GPCR | Receptores acoplados à proteína G |
| HMGB1 | <i>High-Mobility Group Protein 1</i> |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucina |
| IPA | <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> |
| ITBL | Infecção tuberculosa latente |
| MODY | <i>Maturity Onset Diabetes of Young</i> |
| Mtb | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| pH | Potencial hidrogênionico |
| REDOX | estado óxido redutivo |
| RNA | Ácido ribonúcleico |
| TB | Tuberculose |
| TBA | Tuberculose ativa |

| | |
|------|--------------------------------------------------------------------------|
| Th | T <i>helper</i> , subgrupo do linfócito |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| tRNA | RNA transportador |
| WHO | Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i> |

LISTA DE URLS

GEO Gene Expression Omnibus <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=>
IPA Ingenuity Pathways Analysis <http://ingenuity.com>

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | TUBERCULOSE..... | 16 |
| 1.2 | EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE | 16 |
| 1.3 | IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE..... | 19 |
| 1.4 | BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG) | 23 |
| 1.5 | BIOMARCADORES NA TUBERCULOSE..... | 25 |
| 1.6 | BIOLOGIA DE SISTEMAS | 25 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 27 |
| 3 | HIPÓTESE | 28 |
| 4 | OBJETIVOS | 28 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 28 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| 5 | DESENHO EXPERIMENTAL | 29 |
| 6 | MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 6.1 | SELEÇÃO DOS CONJUNTOS DE DADOS..... | 30 |
| 6.2 | ANÁLISE DOS DADOS..... | 30 |
| 6.3 | SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS | 31 |
| 6.4 | ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO | 32 |
| 7 | RESULTADOS | 33 |
| 7.1 | CONJUNTOS DE DADOS. | 33 |
| 7.2 | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO 1 - VACINADOS. | 35 |
| 7.3 | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO 2 - NÃO VACINADOS..... | 42 |
| 7.4 | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO 3 – NÃO VACINADOS VS VACINADOS | 48 |
| 8 | DISCUSSÃO | 59 |
| 9 | CONCLUSÕES | 65 |
| 10 | REFERÊNCIAS | 66 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa existente há milênios, sendo causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Pode afetar os pulmões e se manifestar como TB pulmonar ou atingir outros sítios, levando à TB extrapulmonar (WHO, 2016). O Mtb, também conhecido como bacilo de Koch (BK), constitui uma bactéria patogênica aeróbica intracelular, que apresenta em sua parede celular um elevado conteúdo lipídico, responsável por efeitos biológicos essenciais, a exemplo da regulação no transporte de nutrientes, como a interação com moléculas do hospedeiro e fármacos. Genes identificados em seu genoma vêm sendo associados com a sobrevivência e crescimento, assim como virulência do bacilo, através da modulação de mecanismos referentes à ação do macrófago frente ao bacilo, metabolismo do BK e codificação de macromoléculas em sua parede. Isso confere ao bacilo a habilidade de adaptar o seu metabolismo frente a modificações no ambiente, possibilitando assim a sua persistência no hospedeiro (QUEIROZ; RILEY, 2017; CAMPOS, 2006; COLE et al., 1998; DUBNAU et al., 2002). Um dos diferentes fatores envolvidos na regulação da progressão da TB envolve a integridade do sistema imune do hospedeiro, que é responsável pela eliminação direta da bactéria, latência condicionada ou falha na contenção do bacilo, resultando na doença ativa (DUCATI et al., 2006).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose constitui um grande problema de saúde global, sendo uma das principais doenças infecciosas nos países em desenvolvimento e importante causa de morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2016) e no Brasil (BRASIL, 2017). Faz parte do grupo das dez doenças que mais matam no mundo, representando a principal causa de morte por um único agente infeccioso (Figura 1) (WHO, 2017).

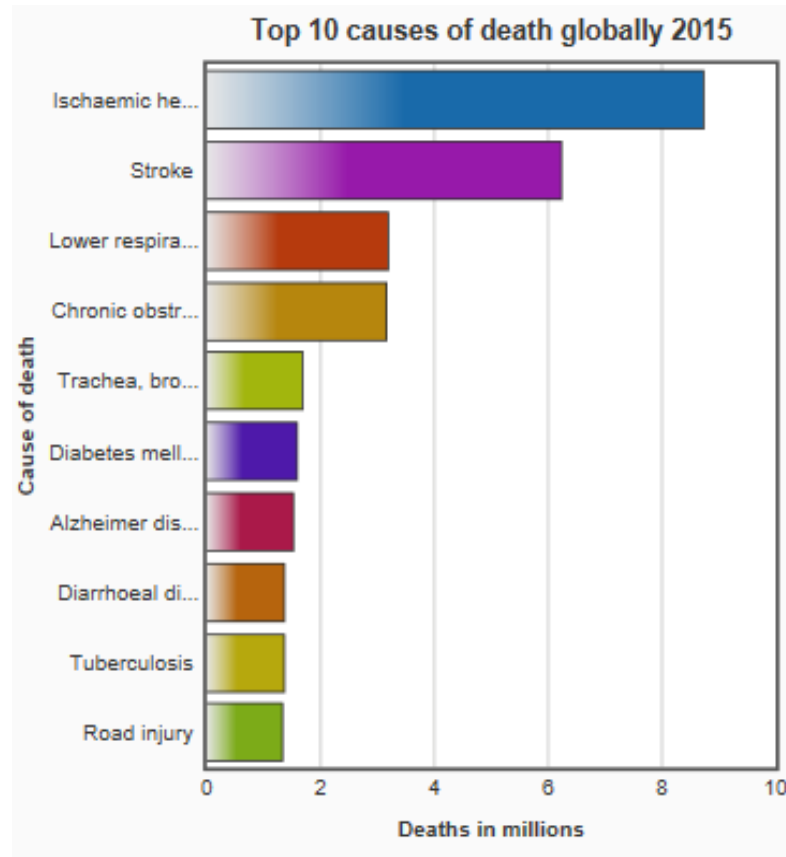


Figura 1. Top 10 das causas de morte em todo o mundo, em 2015. A tuberculose ocupa o nono lugar entre as doenças que mais matam no mundo (WHO, 2017).

Estima-se que 2-3 bilhões de pessoas estão infectadas com o Mtb. A tuberculose compreende uma doença com incidência mundial, atingindo a Europa, Ásia, África, Américas e Oceania. Em 2016, foram estimados 10,4 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes pela doença no mundo (Figura 2) (WHO, 2017). O Brasil representa um dos vinte países com maior carga de TB no mundo. Em 2016, foram registrados 66.796 casos novos de tuberculose no Brasil, com um coeficiente de incidência de 32,7 por 100 mil habitantes (WHO, 2017; BRASIL, 2017).

Estimated TB incidence rates, 2016

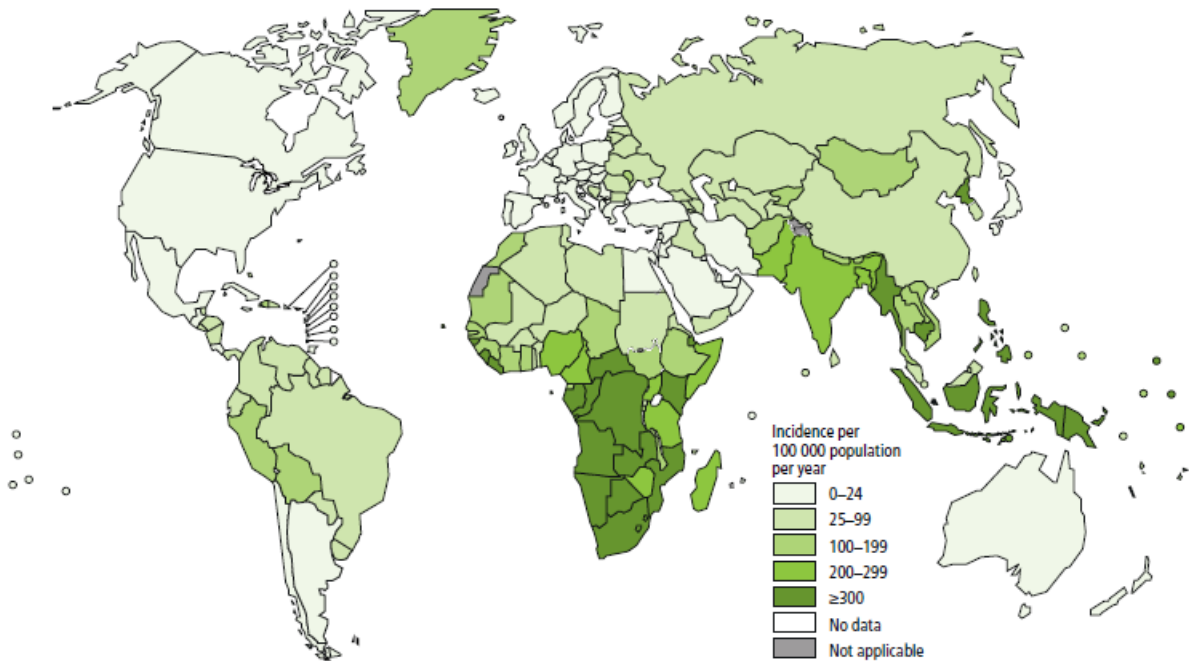


Figura 2. Taxa de Incidência da tuberculose no mundo, em 2016. O número anual de casos incidentes de TB relativo ao tamanho da população (a taxa de incidência) variou amplamente entre países em 2016, de menos de 10 por 100.000 habitantes na maioria dos países de alta renda para 150-300 na maioria dos 30 países de alta carga de TB, e acima de 500 em alguns países, incluindo o Lesoto, Moçambique, Filipinas e África do Sul (WHO, 2017).

A maior mobilidade de pessoas com a TB ativa possibilita maior propagação, novos casos da doença e resistência das cepas, tornando o controle da transmissão componente essencial para a interrupção da epidemia (DYE et al., 2002; YUEN et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) criou uma estratégia, denominada End TB, que objetiva acabar com a epidemia global da TB, através da redução global da incidência e mortalidade da doença, em 90% e 95% respectivamente, até o ano de 2035. Um dos pilares desta iniciativa se baseia na inovação e intensificação da pesquisa, com o desenvolvimento de novas ferramentas que atuem no diagnóstico, tratamento e prevenção, e que possam ser adotadas e implantadas efetivamente nos países acometidos pela doença (WHO, 2015).

1.3 IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE

A infecção pelo Mtb se inicia com a inalação de partículas aerossóis contendo o bacilo. O estágio inicial da infecção se caracteriza pela resposta imune inata com o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão (NUNES-ALVES et al., 2014). O Mtb se adaptou de diferentes formas para modular a imunidade inata e evitar a ativação da imunidade adaptativa. Os macrófagos alveolares constituem um dos primeiros tipos celulares a encontrar o bacilo, funcionando como a primeira linha de defesa contra este patógeno. No entanto, o Mtb é capaz de interferir na resposta dessas células e ativação de vias importantes para a sua sobrevivência. Vários aspectos do macrófago têm sido investigados, incluindo a fagocitose do bacilo, indução de vias antimicrobianas e responsividade ao interferon gama (IFN- γ) (SIA et al., 2015).

O recrutamento de células T, células B, macrófagos ativados e outros leucócitos leva ao estabelecimento de granulomas, que podem conter o Mtb (NUNES-ALVES et al., 2014). Neutrófilos agem produzindo e secretando enzimas que atuarão restringindo o crescimento bacteriano e promovendo a morte de macrófagos infectados. Células Dendríticas (DCs) possuem papel na ativação e diferenciação de células T. As células Natural Killer (NK) produzem mediadores importantes que restringem a replicação bacteriana, como o IL-12, TNF- α e IFN- γ (SIA et al., 2015). As células T melhoram a atividade antibacteriana dos macrófagos através da liberação de citocinas, como o IFN- γ (YOUNG et al., 2008). Enquanto os macrófagos respondem ao IFN- γ melhorando a sua ação e interagem com o bacilo, podendo fagocitar a bactéria e induzir vias antimicrobianas para a sua eliminação (SIA et al., 2015).

A maior parte dos indivíduos infectados permanecerá em um estado latente de infecção, onde nenhum sintoma clínico está presente. Uma pequena porcentagem dessas pessoas irá eventualmente progredir e desenvolver a doença ativa. A evolução da doença não ocorre de forma linear, constitui um processo complexo com tipos variados de manifestações, que são dependentes de diferentes fatores, e que podem se apresentar em um período de semanas até décadas (Figura 3) (YOUNG et al., 2008; NUNES-ALVES et al., 2014).

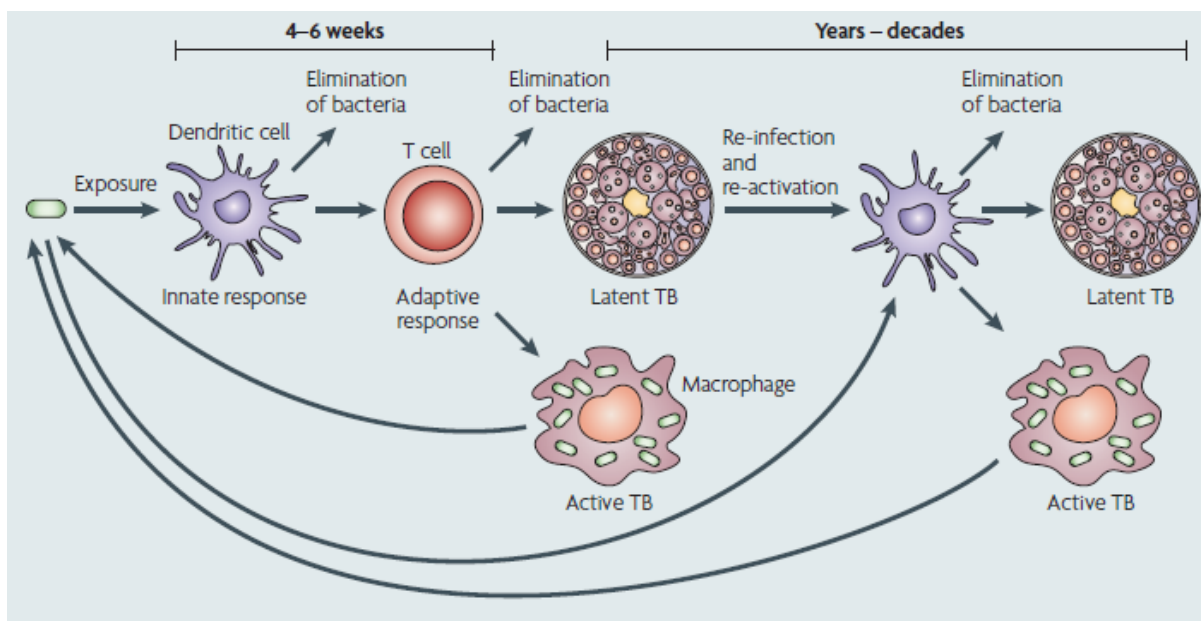


Figura 3. Escala Temporal na infecção tuberculosa (YOUNG et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos na progressão da doença não são totalmente estabelecidos, mas envolvem fatores ambientais, sociais, demográficos, econômicos, do hospedeiro e do patógeno (COMAS; GAGNEUX, 2009).

Devido à diversidade de processos envolvidos na transmissão e estabelecimento da infecção ou doença, a TB não é vista como uma doença de distribuição simples, mas representa um espectro de estados que diferem quanto ao grau de replicação do patógeno, resistência do hospedeiro e marcadores imunológicos. Esta multiplicidade de elementos envolvidos na TB dificulta a diferenciação dos estágios de manifestação, tornando a identificação da infecção pelo Mtb extremamente complexa, principalmente para o estado de latência, que se caracteriza pelo controle da replicação bacteriana (PETRUCCIOLI et al., 2016). Os testes utilizados comumente na rotina atuam, principalmente, na identificação ou isolamento do Mtb (baciloscopia e esfregaço), resposta imunológica (teste tuberculínico e ensaio de liberação de interferon-gama), e apresentação sintomatológica. Indivíduos podem avançar e reverter posições durante o ciclo da TB, dependendo das mudanças na imunidade do hospedeiro e presença de comorbidades, tornando mais complicado a aplicação destes testes e geração de resultados que possibilitem a distinção dos estágios da TB (PAI et al., 2016).

O estabelecimento de marcadores imunológicos que possam demonstrar a probabilidade aumentada de progressão ou não para a doença é essencial para o desenvolvimento de estratégias, já que a tuberculose pode levar muito tempo para se manifestar e somente 10% dos indivíduos infectados com o bacilo a desenvolvem (SKEIKY; SADOFF, 2006).

Uma vez que a grande maioria dos indivíduos infectados nunca desenvolverá a doença (RIEDER, 1999), acredita-se que o sistema imune tenha papel preponderante na contenção da infecção micobacteriana. De fato, a avaliação de marcadores imunológicos *in vitro* tem demonstrado boa correlação com a resposta *in vivo* em relação às micobactérias (MARTINS et al., 2007). Vários autores apontam a resposta Th1, caracterizada pelo estímulo à atividade microbicida do macrófago e à atividade citotóxica de linfócitos, cujo marco é a produção de IFN- γ , como exercendo um papel importante na imunidade contra o bacilo (GREEN et al., 2013; BUSTAMANTE et al., 2014; SAKAI et al., 2014). Já foi demonstrado que, na infecção por *M. tuberculosis*, os indivíduos que apresentam alta produção de IFN- γ *in vitro* apresentam menor chance de desenvolver uma doença ativa, enquanto os indivíduos que desenvolvem baixa produção desta citocina apresentam maior chance de desenvolver a doença (QUIROGA et al., 2006).

A capacidade de produzir IFN- γ , de forma isolada, não pode ser considerada como parâmetro marcador de uma resposta eficaz contra a tuberculose, já que uma parte dos indivíduos que apresentam baixa produção desta citocina desenvolve uma boa resposta contra o bacilo, enquanto outros com alta produção não conseguem um resultado esperado. Outros parâmetros associados à resposta ao bacilo devem ser investigados como potenciais marcadores de proteção em conjunto com a produção de IFN- γ . Neste contexto, moléculas e vias por elas estimuladas são alvos interessantes, pela possibilidade de associação com a proteção e a patogênese das infecções micobacterianas (ETNA et al., 2014). O balanço das respostas pró e anti-inflamatórias pode influenciar no controle ou no resultado da infecção (GIDEON et al., 2015) e muitos estudos avaliam essa modulação da resposta através da avaliação de citocinas como TNF, IL-12, IFN- γ e IL-10 em resposta a antígenos micobacterianos em cultura de sangue total (BELAY et al., 2015; HUR et al., 2014; SAHIRATMADJA et al., 2007; ROSENZWEIG; HOLLAND, 2005). Polimorfismos associados aos genes envolvidos na resposta Th1 também podem influenciar na suscetibilidade à

tuberculose, através dos seus efeitos diferenciados na modulação de mediadores da resposta imunológica (COOKE et al., 2006).

Assinaturas transcricionais de risco abrem caminho para o estabelecimento de novas estratégias para a TB, por possibilitarem entender quais os passos que precedem a evolução para a doença. No entanto, para este tipo de abordagem, deve-se levar em consideração as diferenças existentes em cada indivíduo, e se isso pode ser aplicado para toda a população ou apenas para uma porcentagem. Um estudo realizado em 2016, com um elevado número de participantes, conseguiu demonstrar pela primeira vez, uma assinatura transcricional composta por 16 genes, que conseguem prever a progressão do estado latente para a doença ativa. No entanto, este trabalho apenas utilizou indivíduos de uma mesma população, não levando em consideração a heterogeneidade existente, como também a presença de outras variáveis (Figura 4) (ZAK et al., 2016).

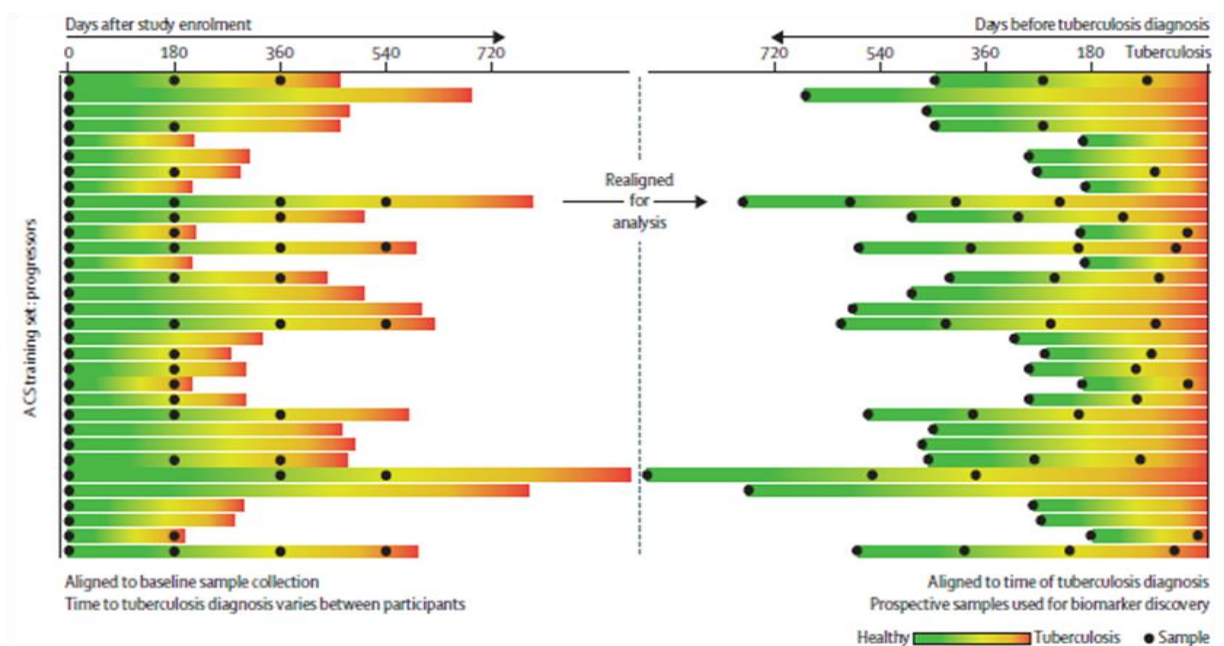


Figura 4. Assinatura de risco para tuberculose. Através do acompanhamento de uma coorte de adolescentes foi possível traçar as diferenças de expressão gênica existentes antes e até o diagnóstico da doença. Cada barra horizontal representa um indivíduo monitorado desde a inscrição no estudo até o diagnóstico de TB ativa, onde cada um passou de um estado saudável assintomático (verde) até a doença pulmonar (vermelho) (ZAK et al., 2016).

1.4 BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG)

Atualmente, a única vacina disponível contra a TB é uma cepa atenuada de micobactéria, o *Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin, BCG. A vacina apresenta eficácia variável, protegendo contra a tuberculose em recém-nascidos, mas falhando no combate à TB pulmonar em adultos, que representa a forma mais comum e infecciosa (COLDITZ et al., 1995; KAUFMANN, 2011). O Brasil possui ampla cobertura vacinal, cerca de 99% (WHO, 2017). Um estudo conduzido em Salvador relatou a eficácia da vacina de 51% para a forma pulmonar (BARRETO et al., 2005). A heterogeneidade na eficácia protetora da BCG pode ser atribuída a diferentes fatores, como a cepa da BCG, exposição à micobactérias ambientais, rota de infecção, rota de administração da vacina, entre outros (DAVIDS et al., 2006; BARRETO et al., 2006).

Efeitos na saúde que se estendem a proteção contra a doença alvo, conhecidos como efeitos não específicos, têm sido atribuídos a BCG. São efeitos complexos e duradouros no sistema imunológico que podem influenciar na susceptibilidade à infecções, crescimento e desenvolvimento psicomotor em crianças. Alguns possíveis mecanismos responsáveis por estes efeitos incluem a indução de imunidade treinada, reprogramação epigenética, mudança no microbioma, além de estimulação de perfis imunes específicos (Figura 5) (KJAERGAARD, 2016).

Apesar da sua conhecida atuação na TB, há muitos anos a BCG também é largamente utilizada como um tratamento padrão na terapia para câncer de bexiga, onde desencadeia o sistema imunológico para parar ou diminuir o crescimento de células cancerosas, ao induzir uma resposta inflamatória e liberação de diferentes citocinas. Além disto, sua aplicação vem sendo associada com uma boa performance em outros tipos de cânceres, como câncer de estômago, hepatocarcinoma e melanoma (ZHENG et al., 2015; THOMPSON et al., 2015). Além da sua aplicação na imunoterapia tumoral, a BCG também está implicada com efeitos benéficos contra a asma alérgica, esclerose múltipla e diabetes (KOWALEWICZ-KULBAT; LOCHT, 2017).

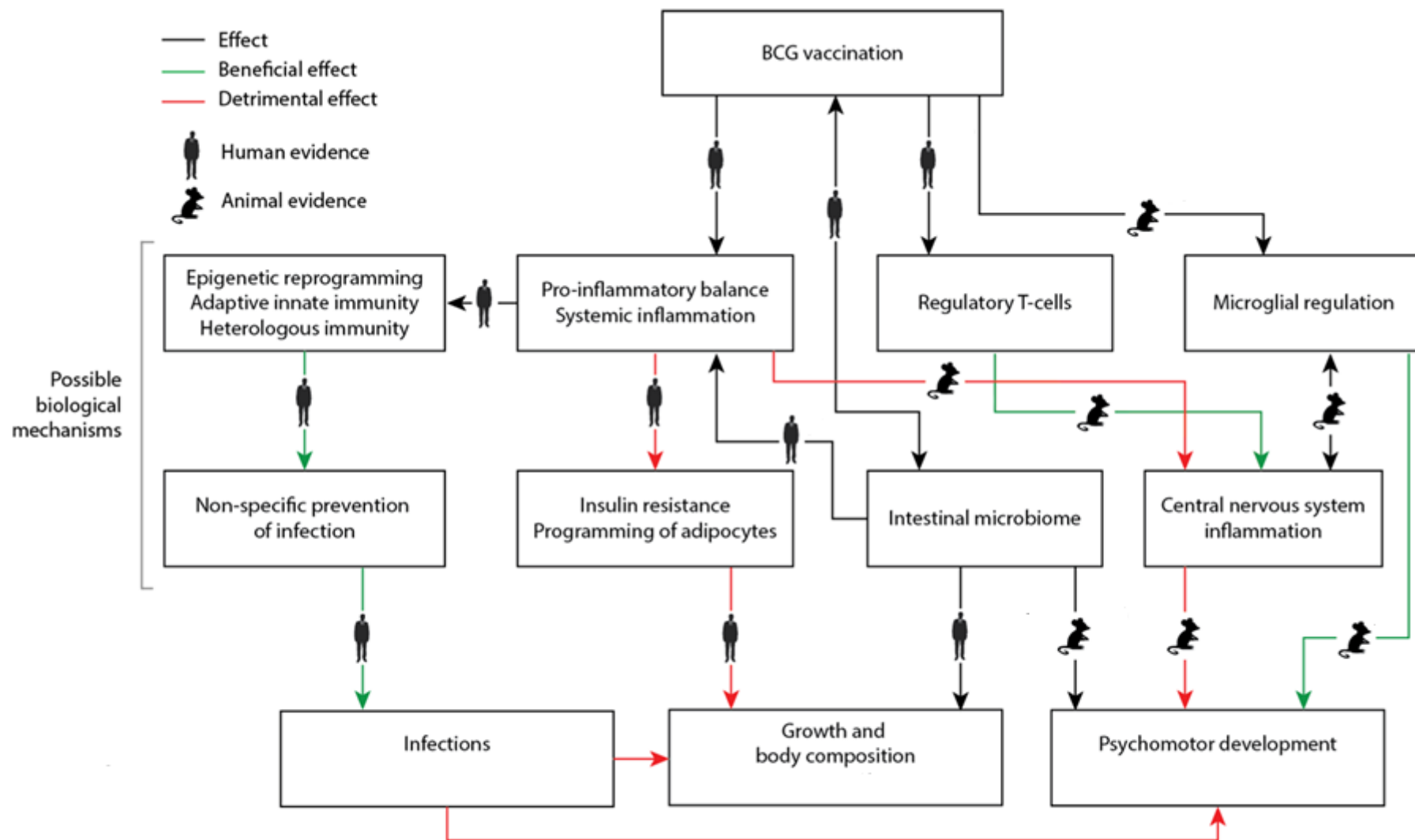


Figura 5. Possíveis mecanismos em que a BCG pode afetar infecções na infância, crescimento e desenvolvimento psicomotor (KJAERGAARD, 2016).

1.5 BIOMARCADORES NA TUBERCULOSE

Biomarcadores abrangem características quantificáveis que podem ser utilizadas para compreender a relação entre os processos biológicos mensuráveis e os resultados clínicos (STRIMBU; TRAVEL, 2010). Estudos têm ajudado a revelar padrões potencialmente associados à proteção contra a tuberculose. Assinaturas transcricionais foram relacionadas à tuberculose ativa (KUBLER et al., 2015; BERRY et al., 2010) e à extensão e gravidade de doença (ANDRADE et al., 2014; KUBLER et al., 2015). Adicionalmente, diferentes trabalhos têm utilizado a abordagem da biologia de sistemas para a identificação de biomarcadores que discriminem a forma latente e ativa da doença, no entanto, até o momento estes estudos não chegaram a um consenso quanto à quais biomarcadores seriam úteis para distinção destas formas (LEE et al., 2016; MIHRET et al., 2014; LU et al., 2011). Como exemplos, quatro genes (*NEMF*, *ASUN*, *DHX29*, *PTPRC*) foram descritos como potenciais biomarcadores de transição da forma latente para ativa, utilizando amostras da população de Taiwan (LEE et al., 2016). Três foram encontrados (*CXCL10*, *ATP10A* e *TLR6*), avaliando amostras de indivíduos da China (LU et al., 2011). Já ao avaliar amostras da Etiópia, foram encontrados nove genes com potencial discriminatório (*BLR1*, *Bcl2*, *IL4d2*, *IL7R*, *FCGR1A*, *MARCO*, *MMP9*, *CCL19*, e *LTF*) (MIHRET et al., 2014). Vários fatores podem ser atribuídos a diversidade de assinaturas encontrada, como diferenças de fundo genético, variações no desenho do estudo, técnicas metodológicas utilizadas, região demográfica do paciente, entre outros (HAAS et al., 2016; LEE et al., 2016).

1.6 BIOLOGIA DE SISTEMAS

Sistemas biológicos são intimamente interligados e independentes, e doenças raramente serão consequência de anormalidades em um único gene, mas sim de perturbações em uma rede intracelular complexa (SAMBAREY et al., 2017). O entendimento dos fatores que levam um indivíduo a permanecer assintomático ou desenvolver a doença é importante para o desenvolvimento de vacinas e terapias, e uma nova ferramenta para este fim é a biologia de sistemas. A biologia de sistemas estuda sistemas biológicos através da perturbação sistemática (biologicamente, geneticamente ou quimicamente); monitorando genes, proteínas, e vias; integrando dados e formulando modelos matemáticos que descrevem a estrutura do sistema e a

resposta individual a estas perturbações (IDEKER et al., 2001). A biologia de sistemas constitui uma análise de rede global que integra sofisticados algoritmos computacionais, dados de tecnologia de alto rendimento e sistemas experimentais para fazer modelos preditivos. Os modelos são avaliados, as respostas monitoradas, permitindo a análise da alteração de componentes específicos do sistema como um todo, fornecendo com isso uma base para novas previsões e hipóteses (Figura 6) (TISONCIK et al., 2009).

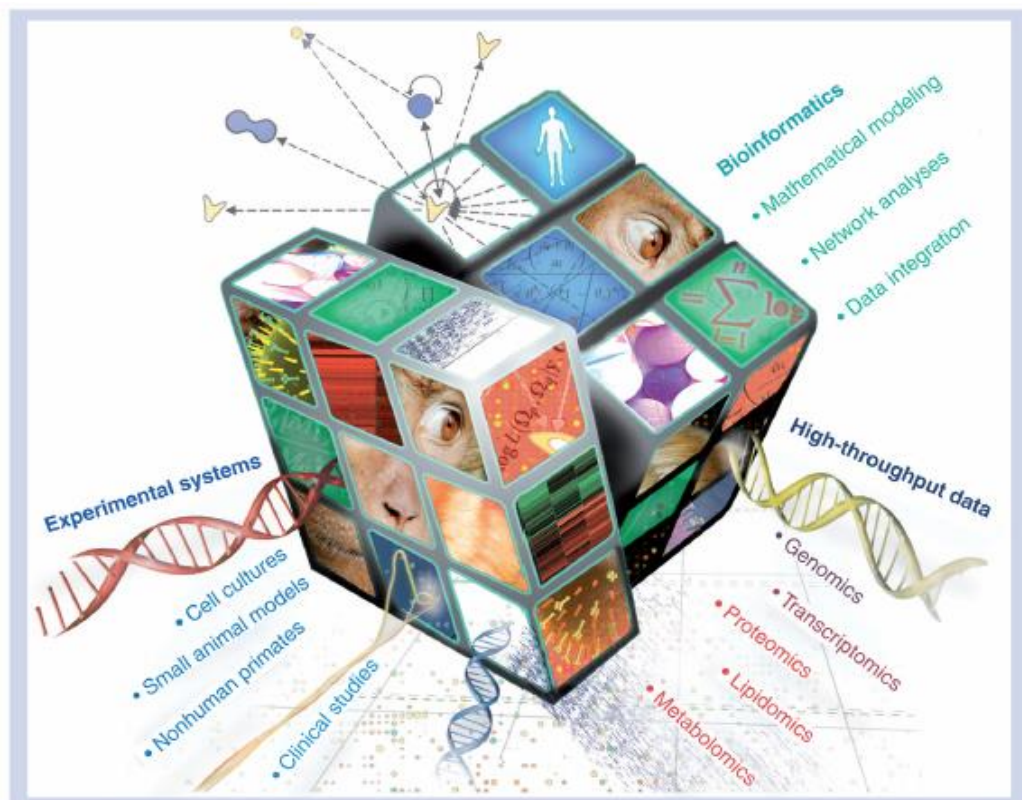


Figura 6. Decifrando interações patógeno-hospedeiro usando biologia de sistemas e implicações para desenvolvimento terapêutico. O cubo Rubik's ilustrado simboliza a biologia de sistemas como uma matriz multidimensional integrando modelos computacionais, sistemas experimentais e tipos de dados de alta performance (TISONCIK et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A TB é uma doença de apresentação complexa, com a possibilidade de se manifestar em diferentes estágios, dificultando assim o seu diagnóstico e controle. Conseguir identificar biomarcadores que possam prever a progressão da infecção para a doença torna-se uma estratégia importante, que pode proporcionar o desenvolvimento de intervenções para combater a epidemia da doença. Levar em consideração fatores inerentes ao indivíduo, como o status de vacinação com a BCG, que apresenta uma cobertura diversificada em todo o mundo, e que pode induzir diferentes efeitos no organismo, é fundamental para a melhor compreensão dos fatores determinantes para o estabelecimento da doença.

A biologia de sistemas fornece um campo amplo de investigação, que permite a análise de dados complexos e obtenção de um vasto número de resultados, possibilitando assim o desenvolvimento de hipóteses e teorias que contribuam para o melhor entendimento da doença como um todo. Um estudo de revisão, contendo 20 artigos com dados de transcriptômica publicados no período de 2007 até o ano de 2015, evidenciou que estes trabalhos buscam, principalmente, assinaturas que explorem a discriminação da TB ativa em relação a controles, distintos estados da doença (forma latente, pulmonar e extrapulmonar) ou frente a outras doenças pulmonares (HAAS et al., 2016).

Visto que estudos vêm apontando a capacidade da BCG em modificar processos biológicos e levar a efeitos não esperados, que se estendem além da doença alvo, este deve ser um fator a ser levado em consideração para melhor compreensão da patogênese da TB. Não há trabalhos que utilizem a abordagem de biologia de sistemas considerando como variável o status de vacinação dos indivíduos, sendo que este pode ser um fator de grande influência na progressão da doença. Desta forma, o estudo proposto poderá contribuir para demonstrar marcadores que estejam modulados diretamente pela BCG e pelo Mtb, e que possam ser correlacionados à proteção contra a doença, visando o futuro desenvolvimento de estratégias de prevenção contra a tuberculose. Pretendemos avaliar a expressão de genes em indivíduos que possuem a doença ativa, os que apresentam apenas a forma latente e controles não infectados, que estão vacinados ou não com a BCG, de forma

a compreender melhor o perfil de cada grupo avaliado e fornecer hipóteses sobre potenciais marcadores de uma resposta imune eficaz contra a tuberculose.

3. HIPÓTESE

Há uma assinatura gênica em indivíduos com a forma ativa da tuberculose, que é distinta da apresentada por indivíduos com a forma latente da doença e de controles não infectados, a qual varia de acordo com o status vacinal dos indivíduos avaliados.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de expressão gênica em indivíduos com a tuberculose pulmonar ativa, infecção latente e controles não infectados, vacinados ou não com a BCG, a partir de dados de transcriptômica disponíveis em um banco de dados público, para obter um painel de genes-alvo com potencial uso como biomarcadores de proteção.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar conjuntos de dados que contemplam informações de expressão gênica referentes às formas clínicas da tuberculose e que identifiquem o status vacinal com BCG.
- Comparar os grupos levando em consideração o status de vacinação para verificar quais os genes diferencialmente expressos e vias moduladas especificamente pela vacina.
- Identificar as funções e vias que foram modificadas nas diferentes comparações realizadas nos grupos vacinados, não vacinados e não vacinados vs vacinados.

5. DESENHO EXPERIMENTAL



Figura 7. Representação esquemática do desenho de estudo.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 SELEÇÃO DOS CONJUNTOS DE DADOS

O Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=>) consiste em um repositório público internacional que armazena e distribui livremente dados de transcriptômica enviados pela comunidade científica. Os conjuntos de dados selecionados representam coleções de amostras biologicamente e estatisticamente comparáveis. Foram pesquisados no GEO, utilizando-se como palavras-chave de busca “tuberculosis active latent expression gene OR pathogenesis tuberculosis”. Foram considerados como critérios de inclusão: organismo *Homo sapiens*, amostra analisada de sangue total, avaliação das formas clínicas da doença, definidas como tuberculose ativa (TBA) e infecção tuberculosa latente (ITBL), assim como controles não infectados (CNI), e indicação do status vacinal de cada indivíduo. Incluímos um total de 3 conjuntos de dados (GSE19439, GSE19444 e GSE19442) obtidos por análises de microarranjos, que utilizaram a plataforma Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947). Esses conjuntos foram provenientes de um mesmo trabalho (citação Pubmed, PMID: 20725040), com amostras obtidas de populações diferentes, totalizando um número amostral de 76 indivíduos para o Grupo 1 – Vacinados (27 TBA, 31 ITBL e 18 CNI), 51 para o Grupo 2 – Não Vacinados (19 TBA, 27 ITBL e 5 CNI), que também foram avaliados na comparação do Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados (Figura 8). As amostras outliers foram retiradas do número amostral.

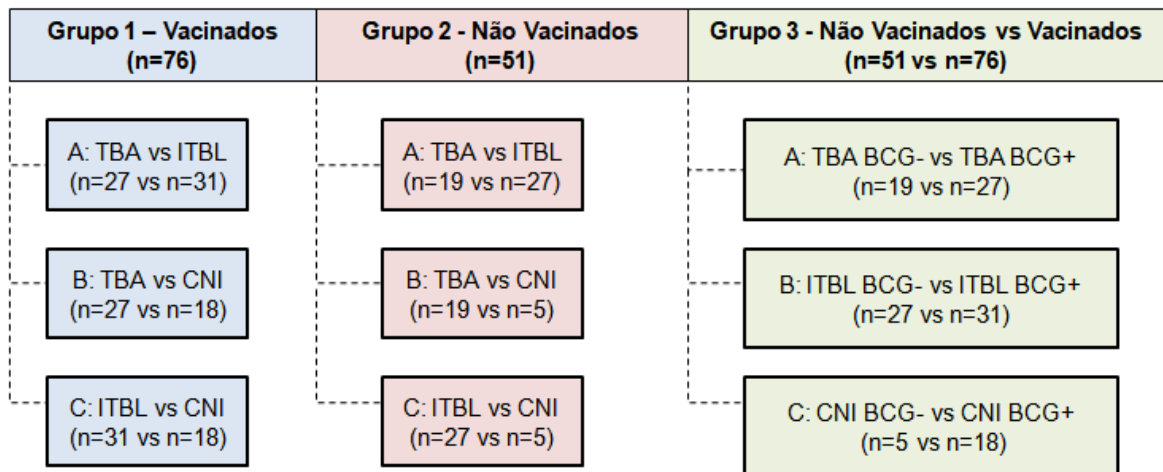
6.2 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados brutos de cada conjunto de dados foram obtidos e incluídos para análise a partir do software RStudio, utilizando o pacote Stats. Os dados de expressão foram normalizados por log₂, buscando o ajuste dos dados para efeitos sistemáticos (diferenças não biológicas que podem ocorrer devido a uma variedade de fatores externos, como protocolos, armazenamento e preparação das amostras e leitura do scanner) e redução do risco de inconsistência dos dados, evitando a repetição e perda de informações. Também foram submetidos à correção através da ferramenta ComBat, para reparo da variação experimental não-biológica, conhecida como efeitos

de lote (batch effects), que são gerados, por exemplo, por dados obtidos em diferentes condições experimentais, ou por laboratórios e tecnologias de arranjos diferentes. A Análise de Componente Principal (ACP) foi performada para observação da completa retirada dos efeitos de lote, e verificação do enquadramento das variáveis nos eixos correspondentes. O pacote `arrayQualityMetrics`, função `ouliers`, método `ks.test`, foi utilizado para identificação e eliminação de amostras com valores discrepantes, que não se emparelhavam com os valores do seu grupo e poderiam tendenciar os resultados. Um total de sete amostras outliers (contendo valores atípicos ou anormais) foram retiradas das análises, devido à possibilidade de influenciar diretamente nos resultados finais. Estas amostras incluíam 5 indivíduos ITBL (4 BCG+ e 1 BCG-), 1 CNI (BCG-) e 1 TBA (BCG+).

6.3 SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Os genes diferencialmente expressos (GDEs) foram identificados a partir de comparações entre diferentes condições experimentais, onde foram representados através de Volcanos Plot, um tipo de diagrama Scatter Plot, que avalia a relação entre duas variáveis, onde foi traçada a medida de efeito no eixo x (fold-change) e a significância estatística no eixo y ($-\log_{10}$ do valor de p). Os genes altamente desregulados se encontram mais distantes no lado esquerdo e direito, e àqueles com as mudanças mais significativas se localizam próximos do topo do plot. O valor de p foi corrigido para múltiplas hipóteses, e ajustado utilizando a abordagem de False Discovery Rate (FDR). Considerou-se nas análises entre os diferentes grupos o nível de significância ($q\text{-value} < 0,05$) e fold-change de $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$. Os grupos de comparação definidos foram: Grupo 1 – indivíduos vacinados (comparação A: TBA vs ITBL, comparação B: TBA vs CNI, comparação C: ITBL vs CNI), Grupo 2 – indivíduos não vacinados (comparação A: TBA vs ITBL, comparação B: TBA vs CNI, comparação C: ITBL vs CNI), Grupo 3 – não vacinados vs vacinados (comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+, comparação B: ITBL BCG- vs ITBL BCG+, comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+) (Figura 8).



TBA: Tuberculose ativa, ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado, BCG-: Não vacinado com BCG, BCG+: Vacinado com BCG.

Figura 8. Definição dos grupos de comparação utilizados para definição dos GDEs.

6.4 ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO

Os genes diferencialmente expressos foram carregados no *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Ingenuity Systems Inc. <http://ingenuity.com>) para caracterização destes, de acordo com as vias canônicas, funções celulares e moleculares, geração de redes interconectadas, função e desenvolvimento de sistema fisiológico.

7. RESULTADOS

7.1 CONJUNTOS DE DADOS

Foram encontrados 46 resultados relatados para “tuberculosis active latent expression gene OR pathogenesis tuberculosis”. Seis conjuntos de dados foram selecionados considerando os critérios de inclusão, organismo *Homo sapiens*, amostras de sangue total e avaliação das formas clínicas da tuberculose (latente e ativa). Dentre estes 6 conjuntos de dados encontrados, apenas 3 descreviam o status de vacinação com BCG dos voluntários nos estudos, sendo por fim, utilizados nas análises (Figura 9).

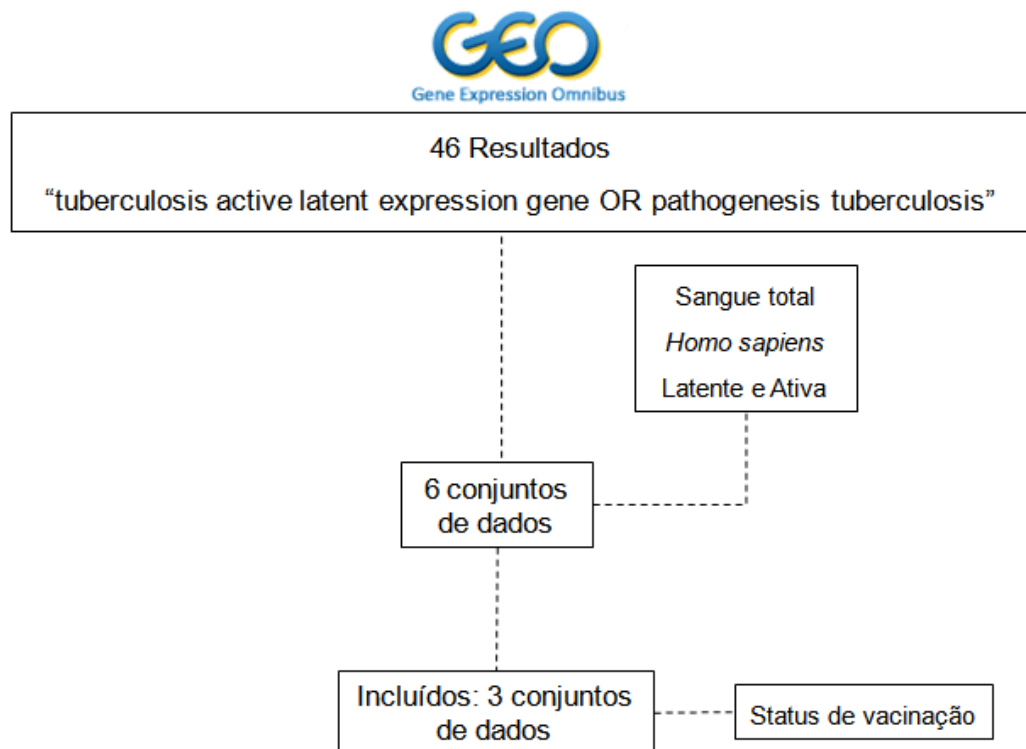


Figura 9. Seleção dos conjuntos de dados

Os três conjuntos de dados incluídos continham dados de microarranjos, sendo provenientes da plataforma Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947). O conjunto de dados GSE19439 incluía amostras de sangue total da região do Reino Unido, de 13 indivíduos com TBA (9 vacinados, 3 não vacinados e 1 com status desconhecido), 17 com ITBL (13 vacinados, 3 não vacinados e 1 com status desconhecido) e 12 CNI (6 vacinados e 6 não vacinados). O conjunto de dados GSE19444 também utilizou amostras oriundas do Reino Unido, sendo 21 indivíduos com TBA (13 vacinados, 2

não vacinados e 6 com status desconhecido), 21 ITBL (18 vacinados e 3 não vacinados) e 12 CNI (todos vacinados com BCG). O conjunto de dados GSE19442 utilizou amostras procedentes da África do Sul, incluindo 20 voluntários com TBA (6 vacinados e 14 não vacinados) e 31 com ITBL (4 vacinados, 22 não vacinados e 5 com status desconhecido). Os conjuntos de dados avaliados foram obtidos de um mesmo trabalho (Citação, PMID:20725040), que avaliou grupos independentes das diferentes populações estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos conjuntos de dados

| Series | Plataforma | Citação | Região geográfica | Grupos |
|----------|------------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------|
| GSE19439 | Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947) | PMID: 20725040 | Reino Unido | 13 TBA (9 BCG+, 3 BCG-, 1 desconhecido) |
| | | | | 17 ITBL (13 BCG+, 3 BCG-, 1 desconhecido) |
| | | | | 12 CNI (6 BCG+, 6 BCG-) |
| GSE19444 | Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947) | PMID: 20725040 | Reino Unido | 21 TBA (13 BCG+, 2 BCG-, 6 desconhecidos) |
| | | | | 21 ITBL (18 BCG+, 3 BCG-) |
| | | | | 12 CNI (BCG+) |
| GSE19442 | Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947) | PMID: 20725040 | África do sul | 20 TBA (6 BCG+, 14 BCG-) |
| | | | | 31 ITBL (4 BCG+, 22 BCG-, 5 desconhecidos) |

TBA = Tuberculose ativa, ITBL = Infecção tuberculosa latente, CNI = Controle não infectado, BCG- = Não vacinado com BCG, BCG+ = Vacinado com BCG.

Os três conjuntos de dados totalizaram 147 amostras referentes a 53 indivíduos com TBA (27 vacinados, 19 não vacinados, 7 com status desconhecido) 64 ITBL (31 vacinados, 27 não vacinados, 6 com status desconhecido) e 23 CNI (18 vacinados e 5 não vacinados). A média de idade destes indivíduos foi de 64 anos (intervalo de 18-78 anos). Sete amostras foram excluídas das análises, por serem consideradas fora do padrão, apresentando valores de expressão fora da curva das amostras pertencentes ao seu grupo. Após obtenção e tratamento dos dados usando o programa RStudio, um total de 25.155 sondas, referentes à genes conhecidos, foram conservadas para avaliação e identificação dos GDEs. O gráfico de diagnóstico, ACP,

foi utilizado para demonstrar que houve a remoção completa dos efeitos de lote, e que as amostras se enquadram dentro dos seus respectivos grupos (Figura 10). Os GDEs foram representados através de gráficos volcans, onde as esferas verdes representam os genes modulados e com diferença significativa nas comparações. As amostras de indivíduos com status desconhecido da vacinação com a BCG não foram incluídas nas comparações.

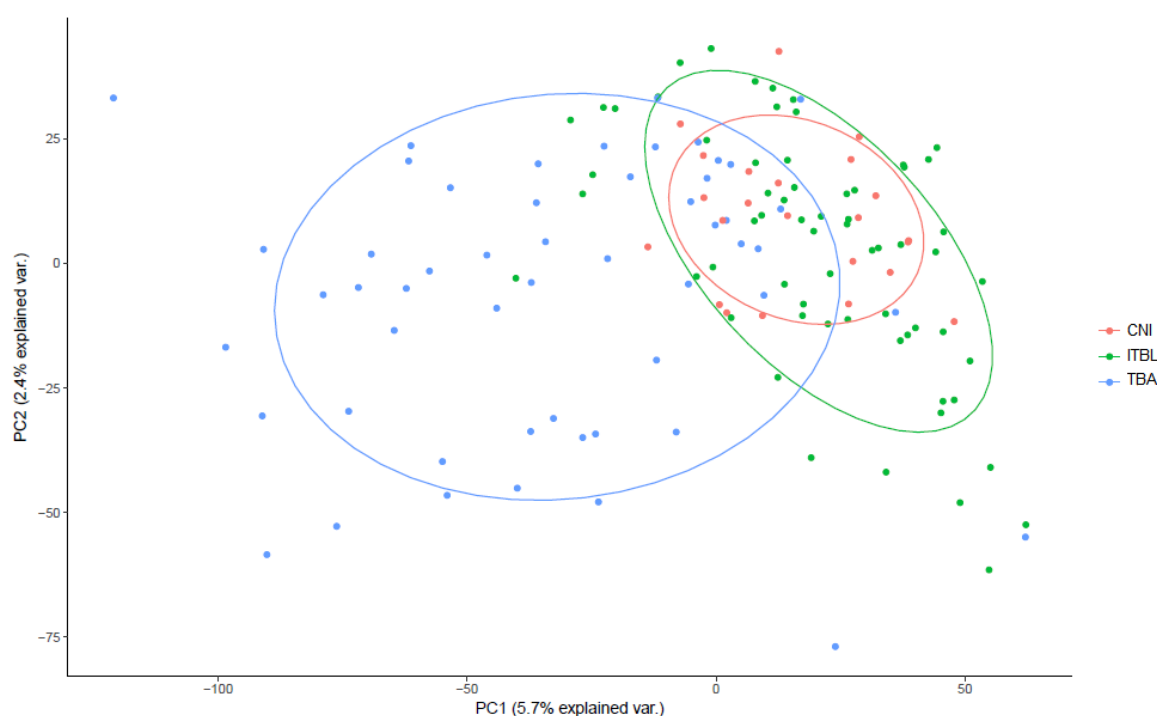
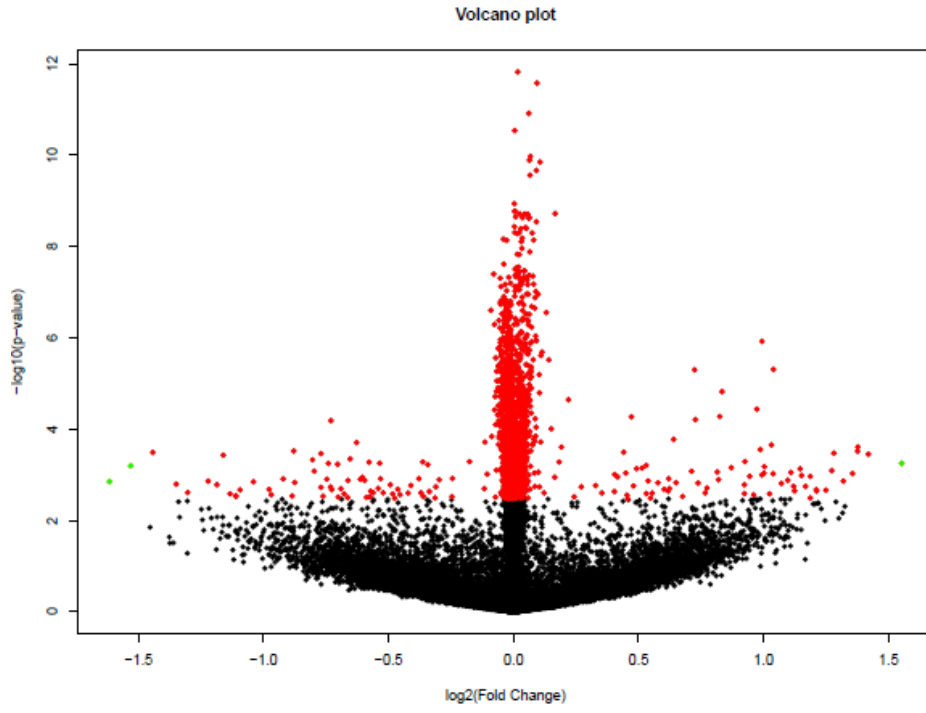


Figura 10. Representação da Análise de Componente Principal realizada com as amostras pertencentes aos grupos CNI, ITBL e TBA dos conjuntos de dados.

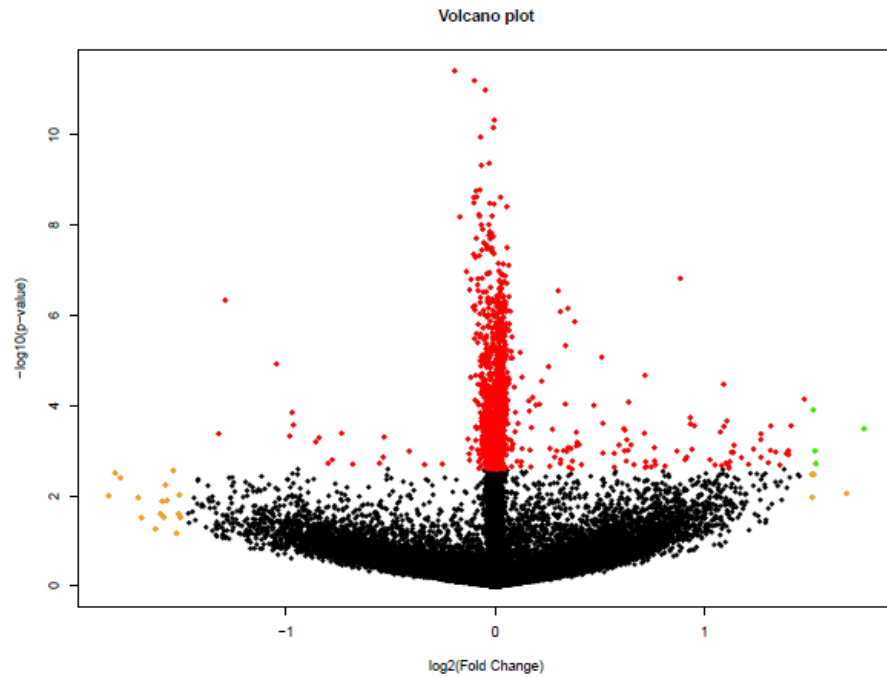
7.2 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO 1 - VACINADOS

No grupo 1, contendo apenas amostras de vacinados, foram identificados 3 GDEs para a comparação A: TBA vs ITBL e 4 GDEs para a comparação B: TBA vs CNI. Não foram identificados GDEs para a comparação C: ITBL vs CNI (Figura 11).

A:



B:



C:

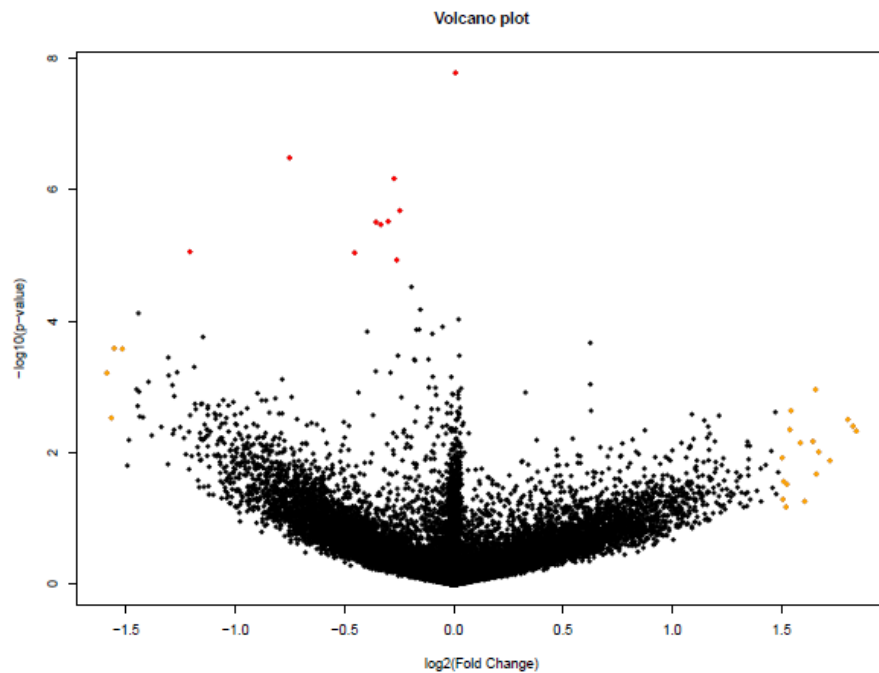


Figura 11. Genes diferencialmente expressos no grupo 1 – vacinados. Gráficos Volcano demonstrando a quantidade total de genes diferencialmente expressos no Grupo 1 – Vacinados na comparação A: TBA vs ITBL, B: TBA vs CNI e C: ITBL vs CNI, considerando como erro alfa de 5% e um $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$. Esferas verdes são àquelas com $p\text{-value} < 0,05$ e $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$, esferas vermelhas apenas com $p\text{-value} < 0,05$, esferas amarelas apenas com $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$, e esferas pretas $p\text{-value} > 0,05$ e sem $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$.

Os genes identificados na comparação A: TBA vs ITBL se referem ao *KCNK1*, modulado positivamente, *DHDDS* e *GIP* modulados negativamente na forma ativa em comparação com a infecção latente (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 1 – Vacinados, Comparação A: TBA vs ITBL.

| Gene (Símbolo) | Nome | Valor de p | Valor de p corrigido | Diferença de expressão (log2) |
|----------------|--------------------------------------------------------|------------|----------------------|-------------------------------|
| <i>KCNK1</i> | potassium two pore domain channel subfamily K member 1 | 0.00056 | 0.0130 | 1.55 |
| <i>DHDDS</i> | dehydrodolichyl diphosphate synthase subunit | 0.00063 | 0.0143 | -1.53 |
| <i>GIP</i> | gastric inhibitory polypeptide | 0.00140 | 0.0261 | -1.61 |

Na comparação B: TBA vs CNI os genes identificados são, o *MCF2L*, *YARS*, *CTSL2* e *SIRT2*, todos modulados positivamente na forma ativa em comparação com os controles não infectados (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 1 – Vacinados, Comparação B: TBA vs CNI.

| Gene (Símbolo) | Nome | Valor de p | Valor de p corrigido | Diferença de expressão (log2) |
|----------------|----------------------------------------------------|------------|----------------------|-------------------------------|
| <i>MCF2L</i> | MCF.2 cell line derived transforming sequence like | 0.00012 | 0.0054 | 1.52 |
| <i>YARS</i> | tyrosyl-tRNA synthetase | 0.00032 | 0.0110 | 1.76 |
| <i>CTSL2</i> | cathepsin V | 0.00102 | 0.0253 | 1.53 |
| <i>SIRT2</i> | sirtuin 2 | 0.0019 | 0.0412 | 1.53 |

Não foram encontrados genes em comum no grupo dos vacinados, sendo estes específicos para cada comparação (Figura 12).

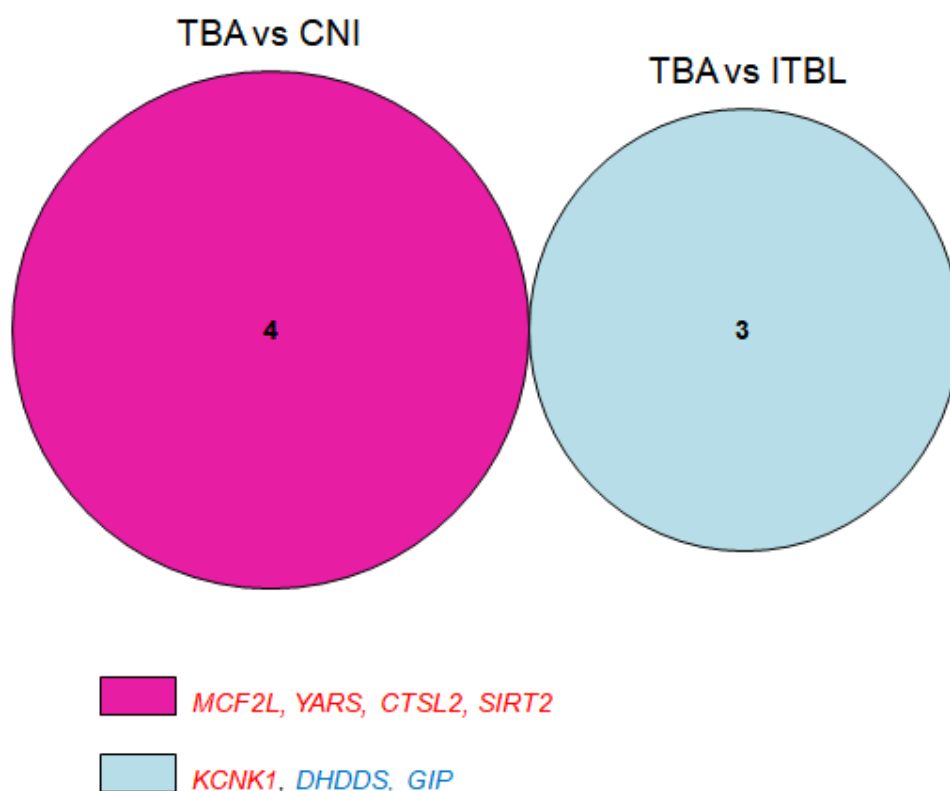


Figura 12. Diagrama de Venn representando os genes diferencialmente expressos em comum para as diferentes comparações do Grupo 1 – Vacinados. Genes destacados em vermelho estão modulados positivamente, e em azul modulados negativamente.

Os genes encontrados nas análises estão significativamente relacionados em diferentes doenças e funções, como desordens hereditárias, doenças neurológicas e oftálmicas, injúria e anormalidades no organismo e desordens musculares e esqueléticas. As funções celulares e moleculares referentes aos genes incluem morte e sobrevivência celular, desenvolvimento celular, crescimento e proliferação celular, metabolismo lipídico e transporte molecular. As funções das redes associadas a estas moléculas englobam a morfologia celular, manutenção e função celular e metabolismo lipídico. Algumas vias canônicas envolvidas são: a biossíntese de dolicol fosfato, carregamento de tRNA e autofagia. (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 1 – Vacinados.

| Cenário das Análises | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Top das Vias Canônicas | Valor de p |
| Biossíntese de dolicol e dolicol fosfato | 7,23E-04 |
| Carregamento de tRNA | 1,37E-02 |
| Autofagia | 1,86E-02 |
| Integração da sinalização enteroendócrina mediada-GPCR exemplificada por Célula L | 2,54E-02 |
| Deteção de nutrientes mediada-GPCR em células enteroendócrinas | 3,00E-02 |
| Doenças e Funções | # Moléculas |
| Desordem hereditária | 2 |
| Doença neurológica | 1 |
| Doença oftálmica | 1 |
| Injúria e anormalidades do organismo | 3 |
| Desordens musculares e esqueléticas | 1 |
| Funções Celulares e Moleculares | # Moléculas |
| Morte e sobrevivência celular | 4 |
| Desenvolvimento celular | 2 |
| Proliferação e crescimento celular | 2 |
| Metabolismo lipídico | 2 |
| Transporte molecular | 3 |
| Função e Desenvolvimento do Sistema Fisiológico | # Moléculas |
| Desenvolvimento embrionário | 2 |
| Desenvolvimento de órgãos | 1 |
| Desenvolvimento do organismo | 3 |
| Desenvolvimento e função do sistema reprodutor | 1 |
| Desenvolvimento e função do sistema cardiovascular | 2 |
| Top das Funções Associadas às Redes | Pontuação |
| Morfologia celular, manutenção e função celular, metabolismo lipídico | 20 |

Quando restringimos as informações geradas no IPA por comparação e tipo de expressão dos genes, encontramos na comparação A: TBA vs ITBL a função de transporte molecular e redes associadas a função e manutenção celular estando ativadas, enquanto as funções de metabolismo lipídico e de carboidratos, atividade hormonal; redes associadas ao metabolismo lipídico e bioquímica de pequenas moléculas, vias canônicas referentes a biossíntese de dolicol e fosfato dolicol e sinalização mediada-GPCR estavam suprimidas. Já para a comparação B: TBA vs CNI, encontramos funções de migração, crescimento e proliferação celular, morte e sobrevivência celular, arranjo e organização celular; redes de metabolismo de drogas, metabolismo lipídico, desenvolvimento e função do sistema endócrino; e vias canônicas de carregamento de tRNA, autofagia, sinalização Rac, maturação do fagossomo e via de adipogênese estando estimuladas (Tabela 5).

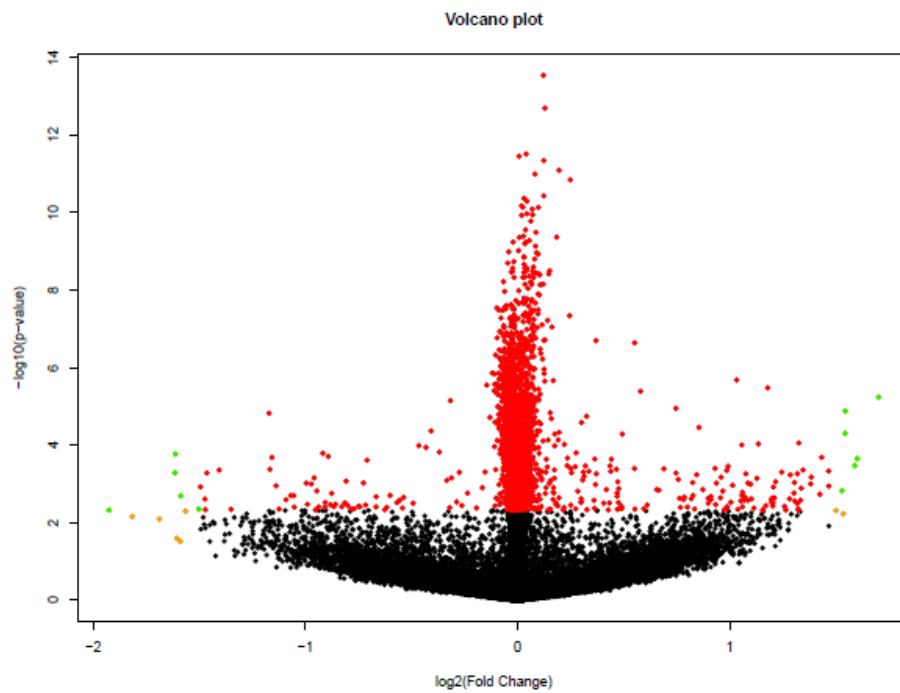
Tabela 5. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 1 – Vacinados. Genes em vermelho: modulação positiva e genes em azul: modulação negativa.

| | Genes | Vias Canônicas | Funções | Redes |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A: TBA vs ITBL | <i>KCNK1</i> | - | <ul style="list-style-type: none"> Transporte molecular | <ul style="list-style-type: none"> Função e Manutenção celular |
| | <i>DHDDS,</i> <i>GIP</i> | <ul style="list-style-type: none"> Biossíntese de dolicol e fosfato de dolicol Sinalização mediada-GPCR | <ul style="list-style-type: none"> Metabolismo lipídico Metabolismo de carboidratos Atividade hormonal | <ul style="list-style-type: none"> Metabolismo lipídico Bioquímica de pequenas moléculas |
| B: TBA vs CNI | <i>MCF2L,</i> <i>YARS,</i> <i>CTSL2,</i> <i>SIRT2</i> | <ul style="list-style-type: none"> Carregamento tRNA Autofagia Sinalização Rac Maturação do Fagossomo Via de Adipogênese | <ul style="list-style-type: none"> Migração, crescimento e proliferação celular Morte e sobrevivência celular Arranjo e organização celular | <ul style="list-style-type: none"> Metabolismo de drogas Metabolismo lipídico Desenvolvimento e função do sistema endócrino |

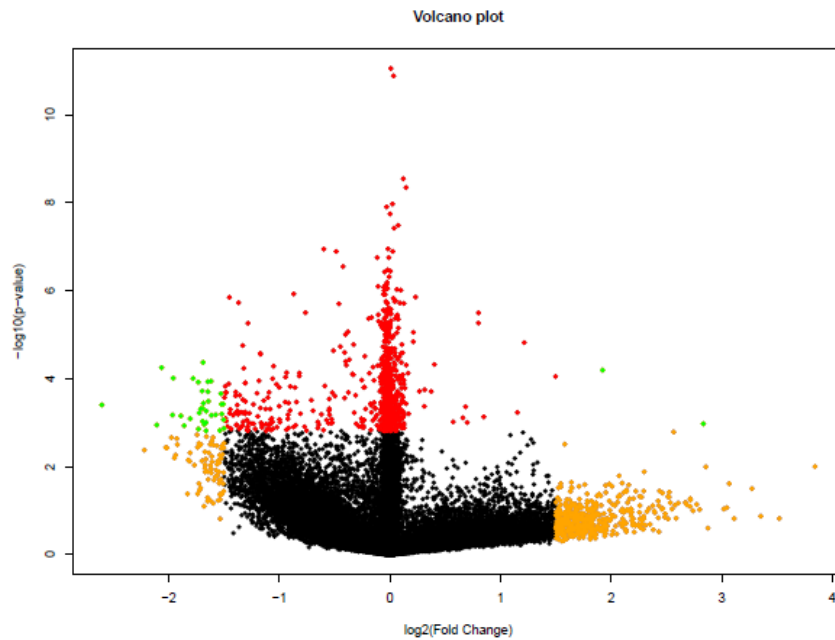
7.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO 2 - NÃO VACINADOS

Considerando as amostras de indivíduos não vacinados com a BCG nas análises, encontramos um número relativamente maior de genes diferencialmente expressos, sendo distribuídos entre as três comparações. Na comparação A: TBA vs ITBL foram encontrados 11 GDEs, na comparação B: TBA vs CNI 37 GDEs e na comparação C: ITBL vs CNI 56 GDEs (Figura 13).

A:



B:



C:

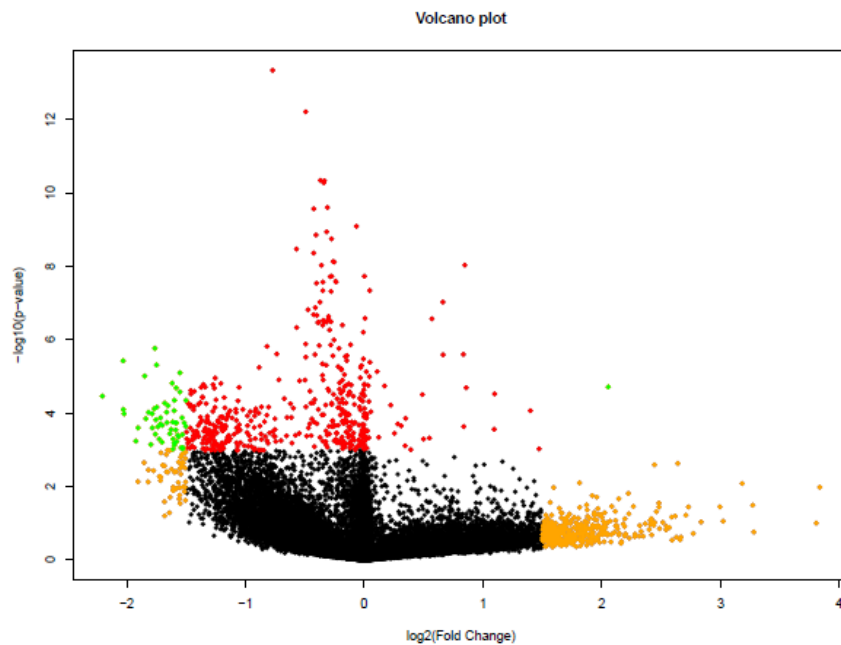
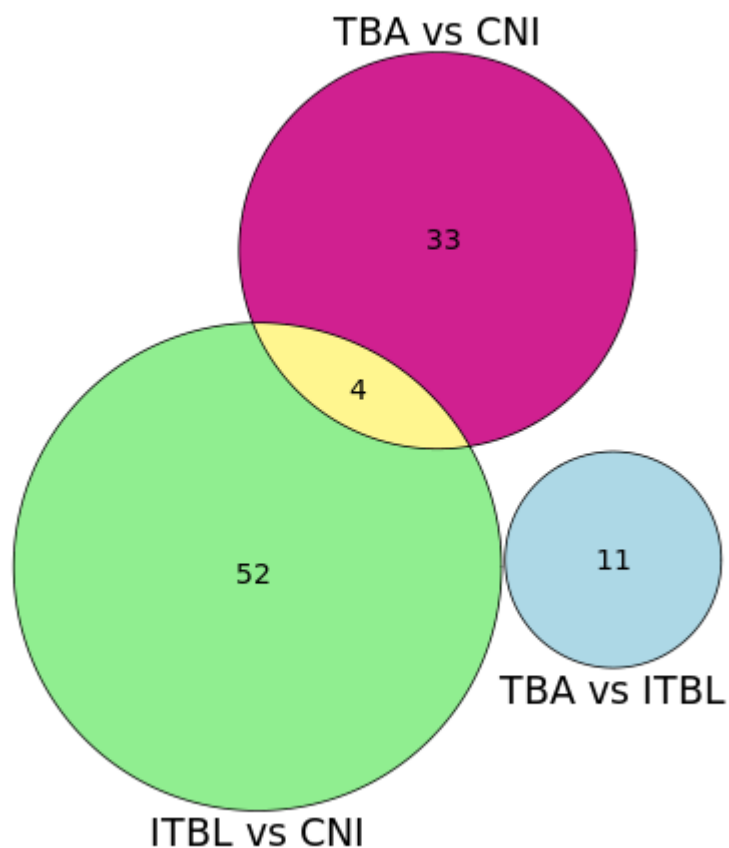


Figura 13. Genes diferencialmente expressos no grupo 2 – não vacinados. Gráficos Volcano demonstrando a quantidade total de genes diferencialmente expressos no Grupo 2 – Não vacinados na comparação A: TBA vs ITBL, B: TBA vs CNI e C: ITBL vs CNI, considerando como erro alfa de 5% e um $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$. Esferas verdes são àquelas com $p\text{-value} < 0,05$ e $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$, esferas vermelhas apenas com $p\text{-value} < 0,05$, esferas amarelas apenas com $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$, e esferas pretas $p\text{-value} > 0,05$ e sem $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$.

No total, foram identificados 100 genes diferencialmente expressos no grupo 2, sendo que 4 estavam presentes tanto nos indivíduos com a tuberculose ativa quanto com a infecção latente em relação aos controles não infectados. Destes 100 genes, 92 estavam modulados negativamente e 8 estavam modulados positivamente nos indivíduos doentes e com a infecção latente, em comparação com os controles e infectados. Observamos que no grupo dos Não Vacinados, além de termos encontrado um número elevado de genes alterados em comparação com o grupo dos Vacinados, a maior parte destas moléculas estava sendo subexpressa, indicando que o Mtb parece agir como um patógeno supressor para o estabelecimento da infecção. Os genes sobreexpressos estavam presentes, em sua maioria, na comparação entre doentes vs infectados, demonstrando que para a progressão da doença, a maior parte das moléculas precisa estar ativada (Figura 14).



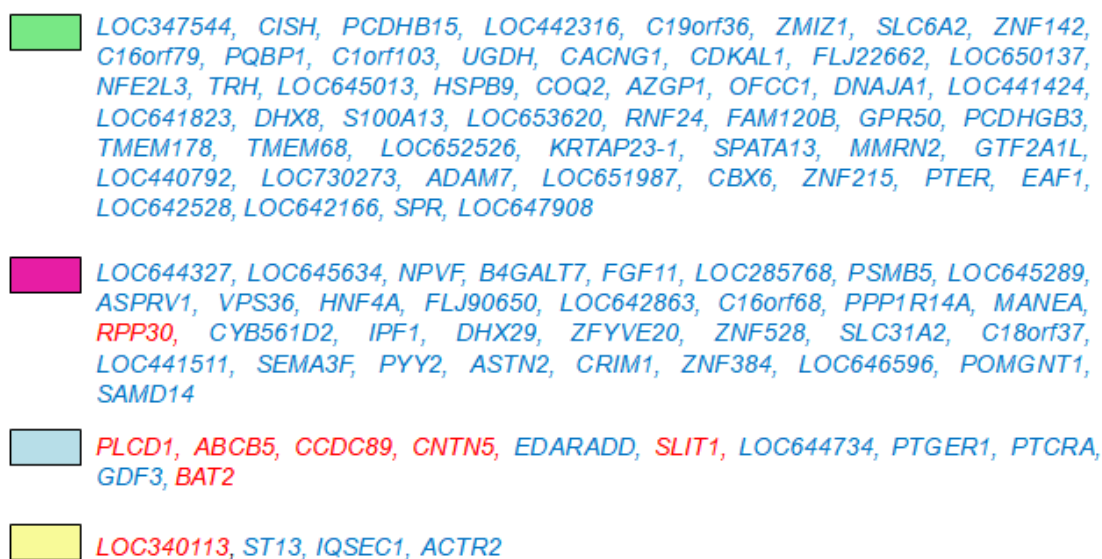


Figura 14. Diagrama de Venn com os genes em comum do Grupo 2 - Não Vacinados. Genes destacados em vermelho estão modulados positivamente, e em azul modulados negativamente.

Estes genes estavam associados com vias canônicas referentes à sinalização MODY, biossíntese de UDP-D-xilose e UDP-D-glucoronato, biossíntese de tetrahydrobiopterina e sinalização de aldosterona em células epiteliais. Dentre as funções e doenças destacam-se desordens do sistema endócrino, doença gastrointestinal e metabólica, injúria e anormalidades do organismo e desordens hereditárias. As funções moleculares e celulares referentes aos genes compreendem o desenvolvimento e migração celular, metabolismo de carboidratos, ciclo celular e interação e sinalização célula-célula. As funções associadas às redes de interações envolvem doenças e condições dermatológicas, câncer, doença respiratória, metabolismo de macromoléculas, ciclo celular, bioquímica de pequenas moléculas e modificações pós-tradução (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 2 – Não vacinados.

| Cenário das Análises | |
|-----------------------------------------------------|------------|
| Top das Vias Canônicas | Valor de p |
| Sinalização Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) | 2,41E-03 |
| Biossíntese de UDP-D-xilose e UDP-D-glucoronato | 7,32E-03 |

| | |
|--------------------------------------------------|----------|
| Biossíntese de Tetrahydrobiopterina I | 1,10E-02 |
| Biossíntese de Tetrahydrobiopterina II | 1,10E-02 |
| Sinalização de Aldosterona em células epiteliais | 2,27E-02 |

| Doenças e Funções | # Moléculas |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Desordens do sistema endócrino | 13 |
| Doença gastrointestinal | 40 |
| Doença metabólica | 13 |
| Injúria e anormalidades do organismo | 46 |
| Desordem hereditária | 14 |
| Funções Celulares e Moleculares | # Moléculas |
| Desenvolvimento celular | 5 |
| Migração celular | 2 |
| Metabolismo de carboidratos | 4 |
| Ciclo celular | 1 |
| Sinalização e interação célula-célula | 7 |
| Função e Desenvolvimento do Sistema Fisiológico | # Moléculas |
| Desenvolvimento e função do sistema endócrino | 4 |
| Desenvolvimento e função do sistema cardiovascular | 1 |
| Desenvolvimento e função do tecido conectivo | 1 |
| Desenvolvimento e função do sistema digestivo | 2 |
| Desenvolvimento embrionário | 3 |
| Top das Funções Associadas às Redes | Pontuação |
| Doenças e condições dermatológicas, desordem do desenvolvimento, Injúria e anormalidades do organismo | 29 |
| Desordem do desenvolvimento, desenvolvimento embrionário, desenvolvimento do organismo | 27 |
| Câncer, injúria e anormalidades do organismo, doenças respiratórias | 23 |
| Metabolismo de carboidratos, metabolismo lipídico, bioquímica de pequenas moléculas | 22 |
| Metabolismo de aminoácidos, ciclo celular, modificação pós-tradução | 16 |

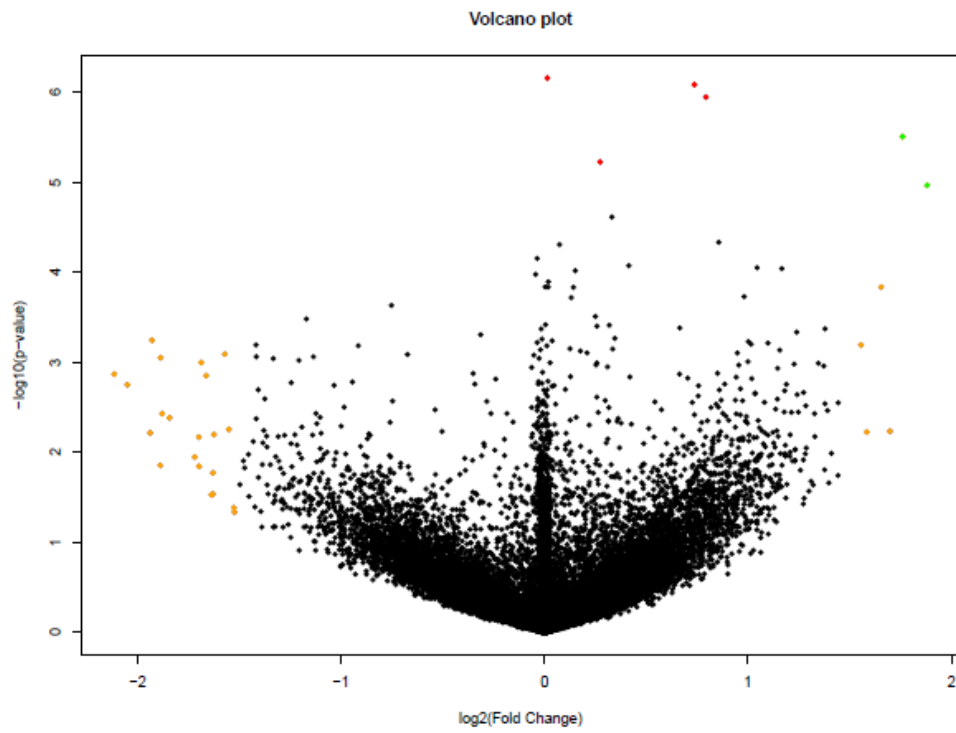
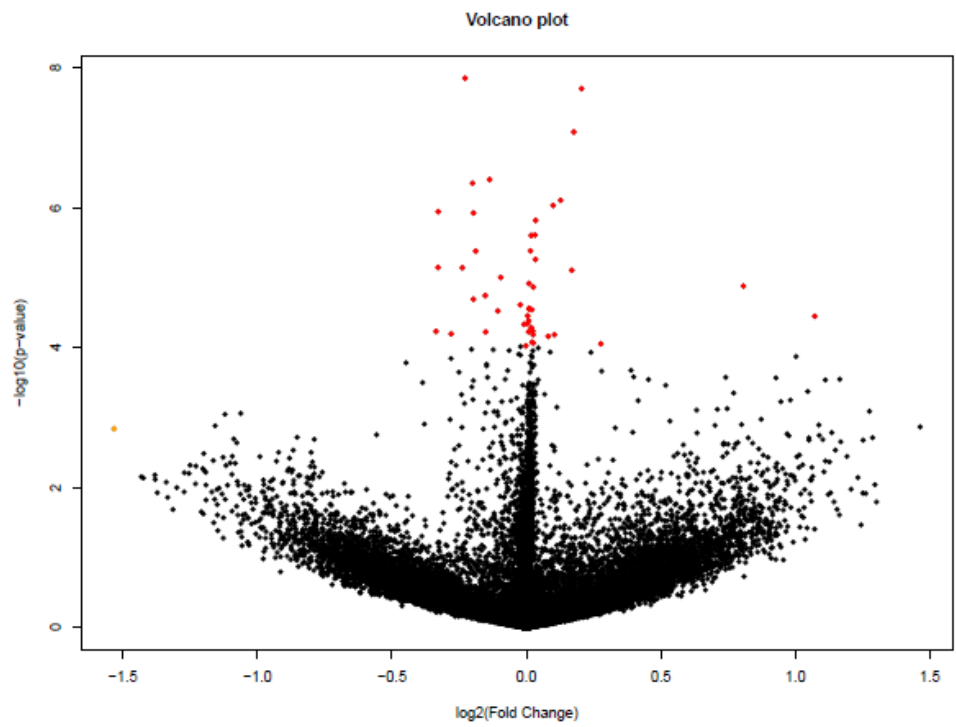
Estratificando os resultados do IPA de acordo com a modulação dos genes temos para aqueles ativados nos doentes e infectados em relação aos controles, assim como para os doentes em comparação com os infectados, funções referentes à migração e morfologia celular, arranjo e organização celular, desenvolvimento e função do sistema nervoso, metabolismo lipídico, bioquímica de pequenas moléculas, transporte molecular e redes associadas ao metabolismo de lipídios e carboidratos, bioquímica de pequenas moléculas, assim como sinalização celular. Os demais genes, que estão suprimidos nos doentes e infectados em comparação aos controles, assim como para os doentes em comparação com os infectados, diferem na apresentação de funções e redes associadas ao ciclo celular, metabolismo de aminoácidos, modificação pós-tradução e a presença de vias canônicas envolvidas na sinalização MODY e de aldosterona, como também a biossíntese de tetrahydrobiopterina, UDP-D-xilose e UDP-D-glucoronato (Tabela 7).

Tabela 7. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 2 – Não vacinados. Genes em vermelho: modulação positiva e genes em azul: modulação negativa.

| Genes | Vias Canônicas | Funções | Redes |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>LOC340113,</i> <i>RPP30,</i> <i>ABCB5,</i> <i>SLIT1,</i> <i>PLCD1,</i> <i>CNTN5,</i> <i>BAT2,</i> <i>CCDC89</i> | - | <ul style="list-style-type: none"> • Migração celular • Morfologia celular • Arranjo e organização celular • Desenvolvimento e função do sistema nervoso • Metabolismo lipídico • Bioquímica de pequenas moléculas • Transporte molecular | <ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo lipídico • Metabolismo de carboidratos • Bioquímica de pequenas moléculas • Sinalização celular |
| Demais genes (descritos na Figura 13) | <ul style="list-style-type: none"> • Sinalização MODY • Sinalização Aldosterona • Biossíntese de tetrahydrobiopterina • Biossíntese de UDP-D-xilose e UDP-D-glucuronato | <ul style="list-style-type: none"> • Desenvolvimento e Migração celular • Metabolismo de carboidratos • Ciclo celular • Sinalização e interação célula-célula | <ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo lipídico • Metabolismo de carboidratos • Metabolismo de aminoácidos • Bioquímica de pequenas moléculas • Sinalização celular • Ciclo celular • Modificação pós-tradução |

7.4 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GRUPO 3 - NÃO VACINADOS VS VACINADOS

Seguindo com as análises, resolvemos considerar cada forma clínica separadamente e dispor o status de vacinação como critério de comparação. Identificamos genes diferencialmente expressos apenas para a comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+ e comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+ (Figura 15).

A:**B:**

C:

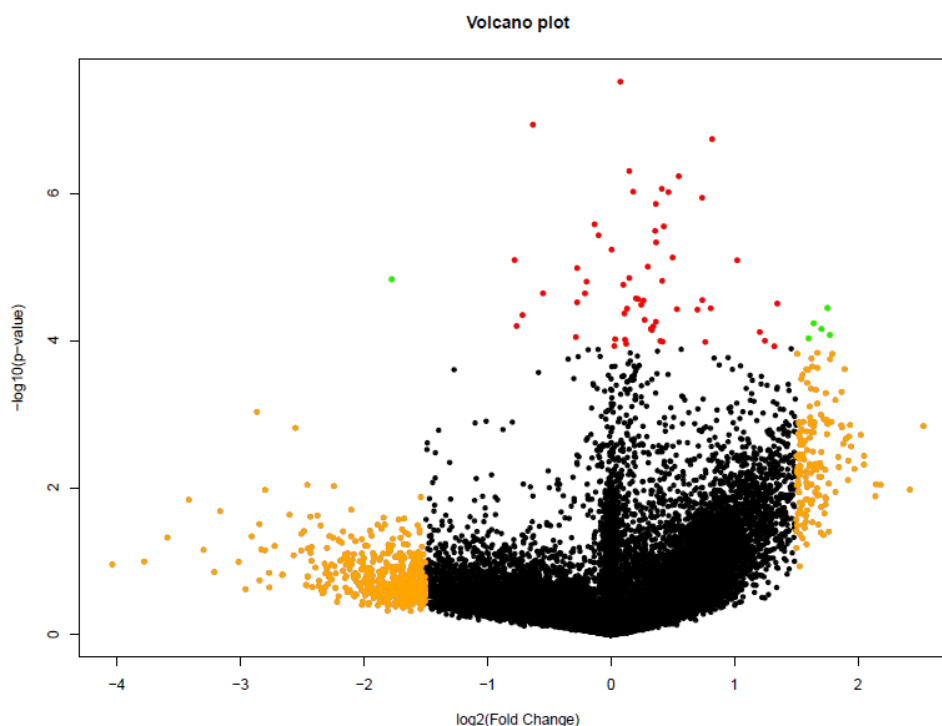


Figura 15. Genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não vacinados vs Vacinados. Gráficos Volcano demonstrando a quantidade total de genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não vacinados VS Vacinados na comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+, B: ITBL BCG- vs ITBL BCG+ e C: CNI BCG- vs CNI BCG+, considerando como erro alfa de 5% e um $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$. Esferas verdes são àquelas com $p\text{-value} < 0,05$ e $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$, esferas vermelhas apenas com $p\text{-value} < 0,05$, esferas amarelas apenas com $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$, e esferas pretas $p\text{-value} > 0,05$ e sem $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$.

Na comparação A foram identificados 2 genes modulados positivamente nos doentes não vacinados em comparação com os vacinados, o *RAB25* e o *SLC30A3*. Sendo, portanto, suprimidos nos indivíduos que receberam a vacina (Tabela 8).

Tabela 8. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação TBA BCG- vs TBA BCG+.

| Gene (Símbolo) | Nome | Valor de p | Valor de p corrigido | Diferença de expressão (log2) |
|----------------|-----------------------------------|------------|----------------------|-------------------------------|
| <i>RAB25</i> | RAB25, member RAS oncogene family | 0.000003 | 0.01978 | 1.76 |
| <i>SLC30A3</i> | solute carrier family 30 member 3 | 0.00001 | 0.04567 | 1.88 |

Estes genes estão associados com o câncer, injúria e anormalidades do organismo, doenças neurológicas e hematológicas e desordens psicológicas. Dentre as funções celulares e moleculares destacam-se o metabolismo de carboidratos, transporte molecular e migração celular. Em relação às funções das redes, temos o transporte molecular, interação e sinalização célula-célula, função e desenvolvimento do sistema hematológico, desenvolvimento, função e manutenção celular e o transporte molecular (Tabela 9 e 10).

Tabela 9. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 3 – Não vacinados vs Vacinados, Comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+.

| Cenário das Análises | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Doenças e Funções | # Moléculas |
| Câncer | 1 |
| Injúria e anormalidades do organismo | 1 |
| Doença neurológica | 1 |
| Desordens psicológicas | 1 |
| Doença hematológica | 1 |
| Funções Celulares e Moleculares | # Moléculas |
| Metabolismo de carboidratos | 1 |
| Transporte molecular | 2 |
| Migração celular | 1 |
| Top das Funções Associadas às Redes | Pontuação |
| Transporte molecular, sinalização e interação célula-célula, desenvolvimento e função do sistema hematológico | 3 |
| Desenvolvimento celular, manutenção e função celular, transporte molecular | 3 |

Tabela 10. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação A: TBA BCG- vs TBA BCG+. Genes em vermelho: modulação positiva e genes em azul: modulação negativa.

| Genes | Vias Canônicas | Funções | Redes |
|----------------------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>RAB25</i> , <i>SLC30A3</i> | - | <ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo de carboidratos • Transporte molecular • Migração celular | <ul style="list-style-type: none"> • Transporte molecular • Sinalização e interação célula-célula • Manutenção e função celular |

As redes complexas formadas por estes genes representam as interações formadas com outras moléculas, os tipos de ligações entre elas, assim como regulação. Na rede formada pelo *SLC30A3*, observamos uma posição central deste gene na rede, e uma forte relação direta com o microRNA mir-34 e a molécula *NAALADL2*, seguida de uma interação com os genes transportadores *AP3B1* e *SLC30A10*. Há também o estabelecimento de relações indiretas com o *H2AFB3*, ácidos graxos e D-glicose. A rede formada pelo *RAB25* também evidencia a instalação de diversas relações diretas, principalmente com enzimas, complexos e outras moléculas da família Rab, mas também um grande número de interações indiretas, a exemplo do regulador transcricional *ZEB1* (Figura 16).

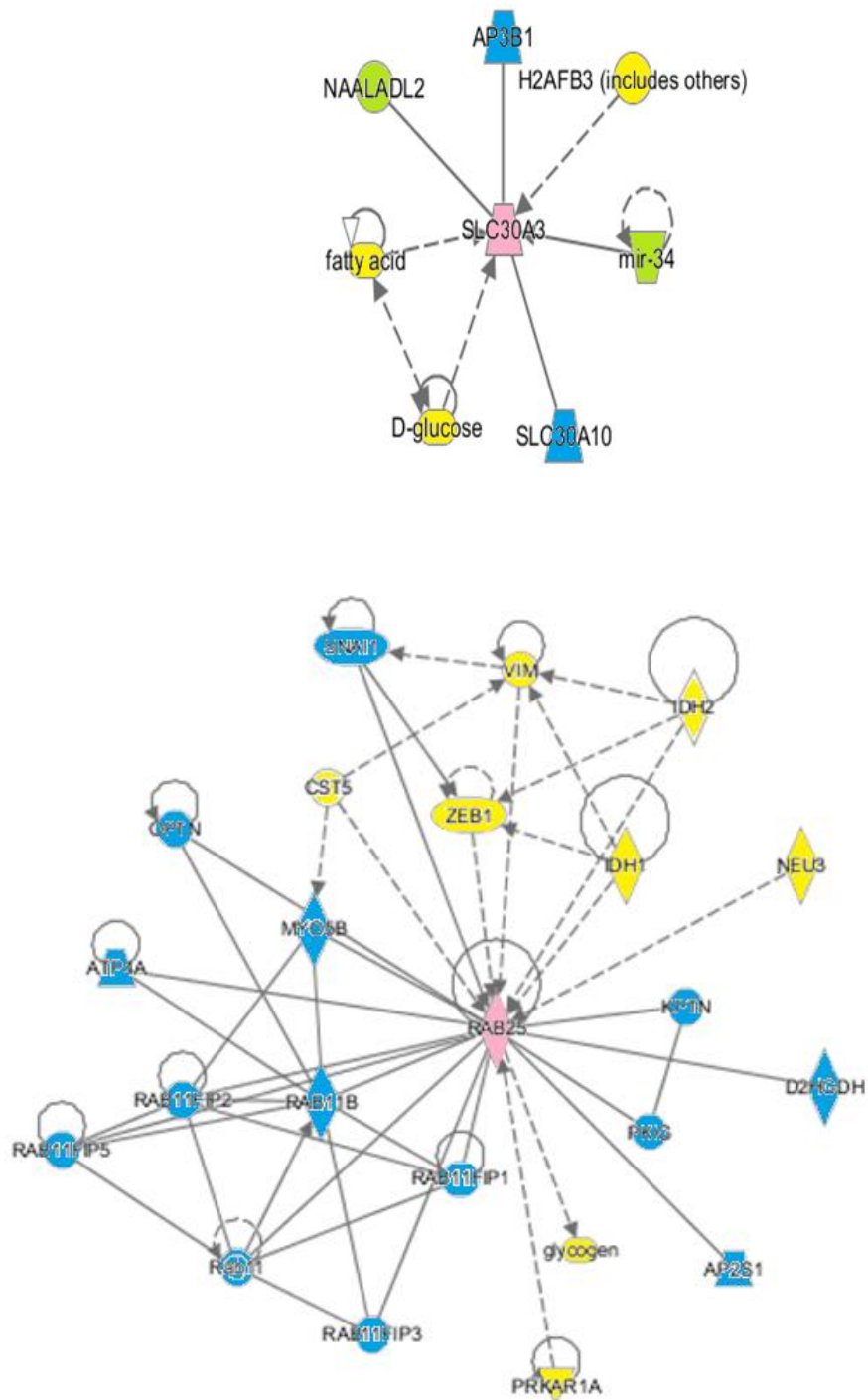


Figura 16. Redes complexas de interação para os genes diferencialmente expressos na comparação TBA BCG- vs TBA BCG+. Linhas contínuas representam as interações diretas e as linhas tracejadas representam as interações indiretas. Em rosa estão representados os GDEs identificados no trabalho, em verde as moléculas com relações diretas fortes, em azul moléculas com interações diretas intermediárias e em amarelo moléculas com relações indiretas.

Na comparação C, foram identificados 5 genes modulados positivamente (*CACNG1*, *GRP*, *CTNND2*, *TMEM68* e *IL25*) e 1 gene modulado negativamente (*SLC16A14*) nos controles não infectados que não receberam a vacina BCG em comparação com os vacinados (Tabela 11).

Tabela 11. Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+.

| Gene (Símbolo) | Nome | Valor de p | Valor de p corrigido | Diferença de expressão (log2) |
|----------------|---------------------------------------------------------|------------|----------------------|-------------------------------|
| SLC16A14 | solute carrier family 16 member 14 | 0.00001 | 0.01592 | -1.77 |
| CACNG1 | calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 1 | 0.00003 | 0.0239 | 1.75 |
| GRP | gastrin releasing peptide | 0.00005 | 0.0324 | 1.64 |
| CTNND2 | catenin delta 2 | 0.00006 | 0.0357 | 1.70 |
| TMEM68 | transmembrane protein 68 | 0.00008 | 0.0408 | 1.77 |
| IL25 | interleukin 25 | 0.00009 | 0.0434 | 1.60 |

Estes genes estão envolvidos com vias canônicas referentes ao papel de citocinas na comunicação entre células imunes, sinalização mediada-GPCR, efeitos celulares do Sildenafil, papel de receptores de reconhecimento padrão de bactérias e vírus e sinalização HMGB1. Dentre as funções e doenças se sobressaem o câncer, injúria e anormalidades do organismo, morfologia tumoral, doenças hematológicas e imunológicas. As funções celulares e moleculares compreendem a interação e sinalização célula-célula, manutenção e função celular, metabolismo lipídico, bioquímica de pequenas moléculas e migração celular. As funções das redes incluem a sinalização celular, transporte molecular, metabolismo de ácidos nucleicos, ciclo celular, doença gastrointestinal e cardiovascular, arteriopatia cardíaca e injúria e anormalidades do organismo (Tabela 12).

Tabela 12. Resumo do Ingenuity Pathway Analysis (IPA) com o grupo de genes encontrados no Grupo 3 – Não vacinados vs Vacinados, Comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+.

| Cenário das Análises | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Top das Vias Canônicas | Valor de p |
| Papel das citocinas na comunicação mediada entre células imunes | 1,60E-02 |
| Integração da sinalização enteroendócrina mediada-GPCR exemplificada por Célula L | 2,18E-02 |
| Efeitos celulares do Sildefanil (Viagra) | 3,81E-02 |
| Papel dos receptores de reconhecimento padrão na identificação de bactérias e vírus | 3,99E-02 |
| Sinalização de HMGB1 | 3,99E-02 |
| Doenças e Funções | # Moléculas |
| Câncer | 2 |
| Injúria e anormalidades do organismo | 4 |
| Morfologia tumoral | 2 |
| Doença hematológica | 2 |
| Doença imunológica | 3 |
| Funções Celulares e Moleculares | # Moléculas |
| Sinalização e interação célula-célula | 3 |
| Manutenção e função celular | 2 |
| Metabolismo lipídico | 1 |
| Bioquímica de pequenas moléculas | 1 |
| Migração celular | 2 |
| Função e Desenvolvimento do Sistema Fisiológico | # Moléculas |
| Desenvolvimento e função do sistema cardiovascular | 2 |
| Desenvolvimento do organismo | 3 |
| Morfologia tecidual | 2 |
| Comportamento | 1 |
| Desenvolvimento embrionário | 2 |
| Top das Funções Associadas às Redes | Pontuação |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Sinalização celular, transporte molecular, metabolismo de ácidos nucleicos | 10 |
| Ciclo celular, doença gastrointestinal, injúria e anormalidades do organismo | 3 |
| Arteriopatia cardíaca, doença cardiovascular, injúria e anormalidades do organismo | 3 |

Dispondo as informações de acordo com a modulação dos genes, temos o transporte molecular associado a genes suprimidos, e os demais processos referentes às moléculas ativadas (Tabela 13).

Tabela 13. Funções celulares e moleculares, Vias Canônicas e Redes complexas associadas às moléculas moduladas positivamente e negativamente no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+. Genes em vermelho: modulação positiva e genes em azul: modulação negativa.

| Genes | Vias Canônicas | Funções | Redes |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>CACNG1</i> , <i>GRP</i> , <i>CTNND2</i> , <i>TMEM68</i> , <i>IL25</i> | <ul style="list-style-type: none"> Papel das citocinas na mediação da comunicação entre células imunes Sinalização mediada-GPCR Papel dos receptores de reconhecimento padrão para bactérias e vírus Sinalização HMGB1 | <ul style="list-style-type: none"> Sinalização e interação célula-célula Função e manutenção celular Metabolismo lipídico Bioquímica de pequenas moléculas Migração celular | <ul style="list-style-type: none"> Sinalização celular Transporte molecular Metabolismo de ácidos nucleicos Ciclo celular |
| <i>SLC16A14</i> | - | <ul style="list-style-type: none"> Transporte molecular | <ul style="list-style-type: none"> Transporte molecular |

As redes de associação formadas pelas moléculas demonstram as complexas e diferentes interações exercidas, com redes menores para as moléculas *CACNG1* (formada por relações diretas com moléculas ligadas à canais de ions e complexos pertencentes a mesma família) e *TMEM68* (estabelendo interações diretas com outros dois genes, o *ELAVL1* e o *LYPD6*), e uma composta, heterogênea e interconectada rede formada pelos genes *IL-25*, *GRP*, *CTNND2* e *SLC16A14*. Esta rede é composta

de uma vasta gama de interações indiretas, tendo como molécula central um complexo ligado às citocinas pró-inflamatórias (Figura 17).

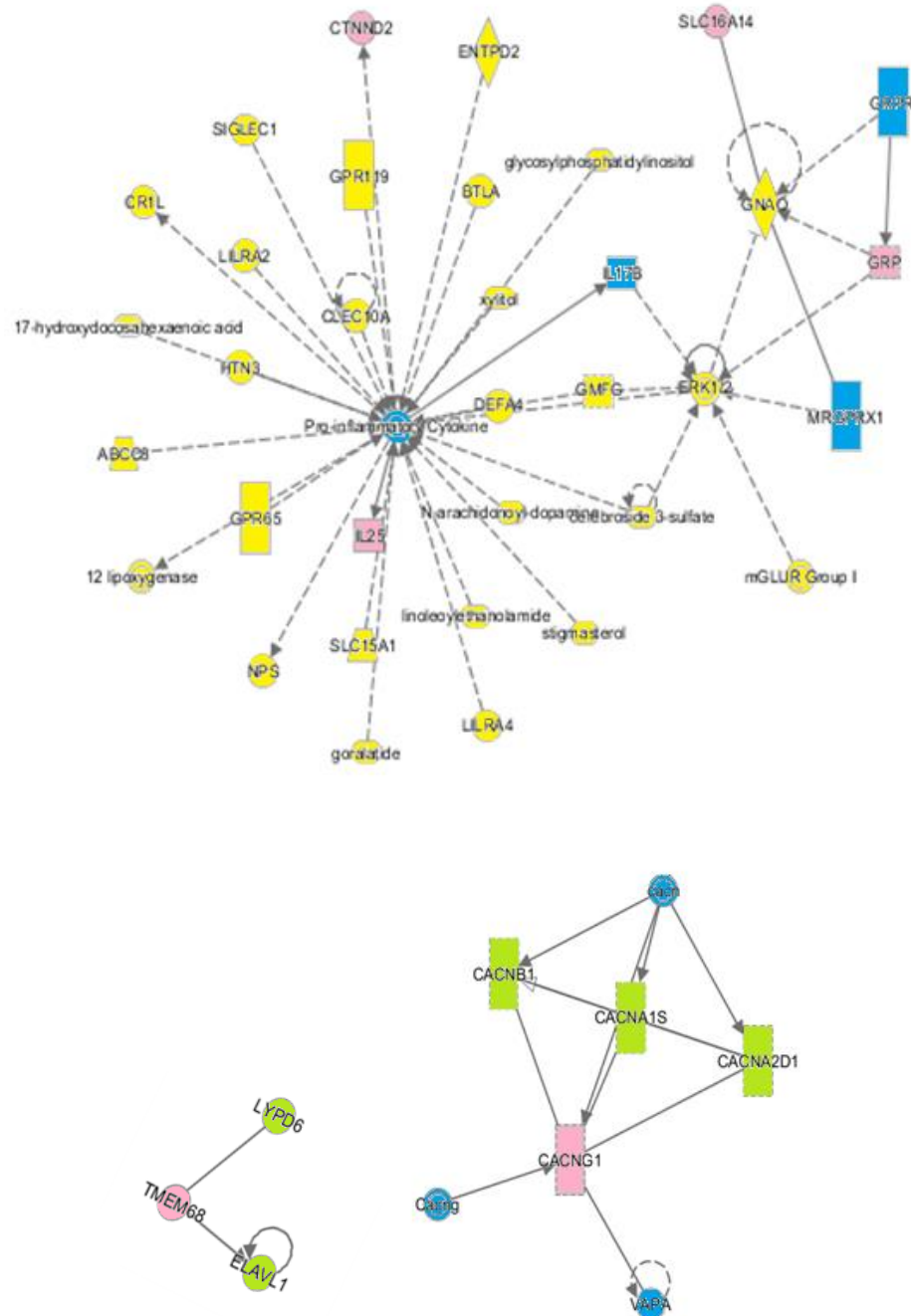


Figura 17. Redes complexas de interação para os genes diferencialmente expressos na comparação CNI BCG- vs CNI BCG+. Linhas contínuas representam as interações diretas e as linhas tracejadas representam as interações indiretas. Em rosa estão representados os GDEs identificados no trabalho, em verde as moléculas com relações diretas fortes, em azul moléculas com interações diretas intermediárias e em amarelo moléculas com relações indiretas.

As redes complexas formadas se associam diretamente com a ligação entre vias canônicas descritas para as moléculas, estando dispostas e interligadas, respectivamente. A rede composta pela maior parte das moléculas está linkada diretamente com vias atribuídas a processos ligados à imunidade inata e adaptativa (Figura 18).

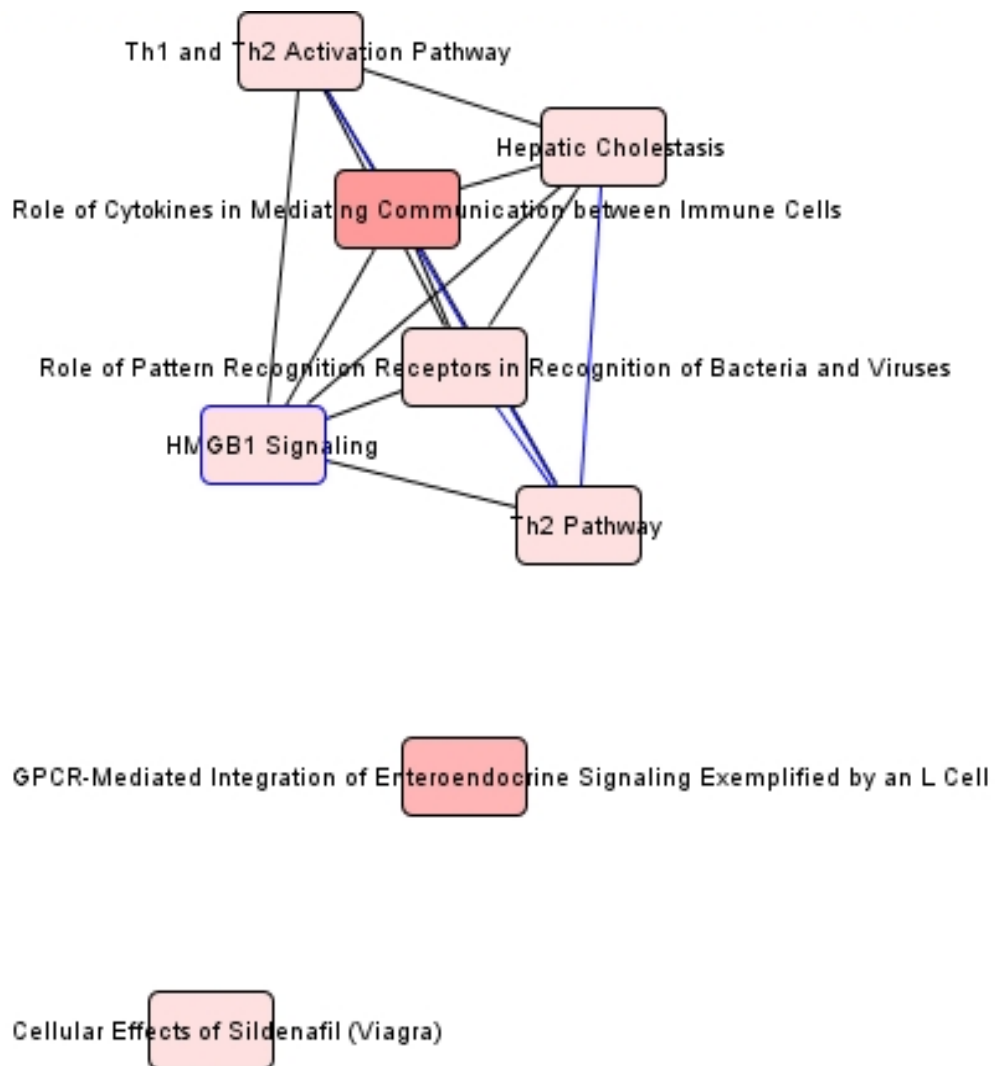


Figura 18. Conexão entre as vias canônicas associadas aos genes diferencialmente expressos na comparação C: CNI BCG- vs CNI BCG+.

8. DISCUSSÃO

Neste estudo, buscamos associar os genes diferencialmente expressos quanto às suas funções biológicas, de forma a entender quais os processos que estão alterados entre os diferentes grupos analisados e gerar novas hipóteses acerca dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença.

O *Mycobacterium tuberculosis*, por si só, expressa moléculas que interferem e modulam a resposta do hospedeiro, contribuindo para a sua sobrevivência e permanência no organismo (COLE et al., 1998). Essa dinâmica adaptação ao meio é mediada pela reprogramação transcricional iniciada em resposta a determinados estímulos, como depleção de nutrientes, alteração no pH, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e agentes que desorganizam a membrana e parede celular (FORRELLAD et al., 2013).

Sabe-se que a vacina BCG induz efeitos não direcionados à sua doença-alvo, e que isto pode levar a modificação de diferentes processos importantes no organismo, como a estimulação de uma resposta imune genérica que confere uma ação abrangente da vacina frente a outras patologias. Apesar disto, os mecanismos envolvidos nestas alterações ainda não estão totalmente esclarecidos (KJAERGAARD, 2016; GENGENBACHER et al., 2017).

Ao analisar os três conjuntos de dados de transcriptoma obtidos no GEO para grupos de indivíduos com a tuberculose ativa, infecção latente e controles não infectados, que estavam vacinados ou não com a BCG, identificamos transcritos modulados especificamente entre os grupos avaliados. Quando avaliamos os grupos 1 (Vacinados) e 2 (Não vacinados) separadamente, vemos um perfil distinto de genes diferencialmente expressos, evidenciados pela modulação de 7 moléculas e 100 moléculas, respectivamente. Essa elevada diferença indica que a primovacinação com a BCG consegue gerar uma modificação prévia da expressão de determinados genes, que podem influenciar diretamente no curso da infecção com o Mtb. Estes efeitos gerados pela vacina aparentam ser duradouros, já que os indivíduos avaliados possuem entre 18 até 78 anos de idade. Além disto, o número de moléculas encontradas no grupo dos não vacinados indica uma ação supressora do Mtb para estabelecimento da infecção, e uma reversão deste efeito quando há uma sensibilização anterior a BCG, o que poderia indicar uma ação protetora da vacina.

No nosso estudo, as moléculas encontradas estavam associadas, principalmente, com processos metabólicos. Isto difere do que já foi descrito na literatura, onde a maior parte dos genes é definida com ação no sistema imune. Trabalhos já publicados demonstram uma média de 586 (298-875) genes diferencialmente expressos em indivíduos com a tuberculose ativa em comparação com controles saudáveis, associados, principalmente, com processos ligados à imunidade e defesa, como ativação e diferenciação de leucócitos e linfócitos, e também apoptose (LEE et al., 2016; OTTENHOFF et al., 2012). Padrões de expressão gênica identificados com a elevada expressão de genes associados à resposta imune inata e redução de genes envolvidos na regulação da apoptose em indivíduos com a TB ativa comparados com a infecção latente podem também viabilizar novas hipóteses que expliquem a progressão para a doença e determinantes do fracasso ou sucesso da infecção pelo Mtb (MAERTZDORF et al., 2011).

Em nosso trabalho, um total de 5 moléculas estavam sobreexpressas nos vacinados e 8 nos não vacinados. Em ambos os grupos, os genes estavam associados com processos biológicos referentes ao metabolismo lipídico, transporte molecular, migração, arranjo e organização celular.

O Mtb possui uma diversidade de lipídios importantes para a virulência do bacilo e ação frente às respostas imunes desencadeadas pelo hospedeiro para controle da infecção, como a inibição da proliferação de células T, inibição da formação do fagolisossomo e proteção contra atividade bactericida. Assim, o metabolismo de lipídios constitui um mecanismo essencial para a persistência do patógeno no hospedeiro. Na tuberculose, o metabolismo lipídico constitui um mecanismo importante no controle da doença, já que dependendo dos tipos de lipídios presentes, estes podem aumentar ou reduzir a imunopatologia da TB. Este balanço irá definir o estabelecimento da infecção latente, da doença ativa ou do completo clearance bacteriano (QUEIROZ; RILEY, 2017).

Outros processos importantes envolvem o transporte e captura de moléculas essenciais para o metabolismo da micobactéria, como o ferro e a vitamina B12, assim como a secreção de quimiocinas e receptores de quimiocinas, que podem atuar na contenção do bacilo, na mediação da inflamação ou contribuindo para a ocorrência de cavitações no pulmão (GOPINATH et al., 2013; BORADIA et al., 2014; MONIN; KHADER, 2014).

Desta forma, a ativação destas vias em ambos os grupos estaria relacionada diretamente com a infecção, através de processos modulados pelo Mtb que são necessários para sua permanência no hospedeiro.

Interessantemente, o grupo dos vacinados apresentava adicionalmente funções associadas à morte e sobrevivência celular, metabolismo de drogas, assim como vias canônicas relatadas para autofagia e maturação do fagossomo.

Vias de morte celular representam importantes estratégias de combate ao bacilo, e a modulação destas vias pelo Mtb é vista como uma estratégia para sobrevivência do patógeno. Enquanto a apoptose representa um mecanismo benéfico para a defesa do hospedeiro e remoção de células infectadas, a necrose surge como um processo reverso. A necrose de neutrófilos infectados promove o crescimento bacteriano após a fagocitose destas células pelos macrófagos (DALLENGA et al., 2017; ABEBE et al., 2011). Já a apoptose de neutrófilos infectados contribui no controle da infecção através da modulação da resposta inflamatória e aumento da capacidade dos macrófagos em controlar o crescimento intracelular do bacilo (ANDERSSON et al., 2014). A inibição de uma das moléculas encontradas estando ativada neste grupo, a *SIRT2*, já é descrita na literatura com a possibilidade de induzir morte celular, tanto por necrose como apoptose (ZHANG et al., 2016). Desta forma, sua ativação estaria favorecendo a sobrevivência celular, por reduzir estes tipos de morte.

A via da autofagia pode ser associada à proteção contra a tuberculose, já que promove o clearance micobacteriano, estando envolvida entre os mecanismos de ação das principais drogas de uso no tratamento anti-micobacteriano, a isoniazida e pirazinamida. Esta via também está interligada com outro processo importante de defesa do hospedeiro, a inflamação, sendo capaz de modulá-la ao inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação do inflamassoma (BENTO et al., 2015; NETEA-MAIER et al., 2016; BRADFUTE et al., 2013).

A formação do fagolisossomo compreende um importante evento para o combate de microorganismos, sendo composto por diferentes etapas, como a maturação do fagossomo e fusão do fagossomo e lisossomo. O Mtb é conhecido como um dos patógenos que desenvolveram estratégias de sobrevivência para impedir este mecanismo, evitando assim a sua destruição (SCHLUGER; ROM, 1998; TJELLE et al., 2000).

A ativação de moléculas ligadas a estas vias entre os vacinados estaria favorecendo o controle da infecção, demonstrando que este poderia ser um mecanismo desencadeado pela vacina como uma tentativa de melhorar a resposta imune contra infecções, sendo a falha na modulação destes mecanismos crucial no destino da infecção.

Em relação aos genes subexpressos, identificamos 2 genes para os vacinados e 92 para os não vacinados. Os dois grupos tinham processos em comum envolvidos com o metabolismo lipídico e de carboidratos, como também bioquímica de pequenas moléculas sendo suprimidos. O grupo dos não vacinados ainda apresentou uma ligação com funções referentes ao ciclo celular, sinalização celular e metabolismo de aminoácidos. Vias canônicas pertinentes para a patogênese da TB englobam a sinalização MODY e biossíntese de tetrahydrobiopterina.

Aspectos que determinam a virulência do Mtb incluem a expressão de genes que atuam no metabolismo de lipídios e ácidos graxos, codificando proteínas responsáveis pela biossíntese, degradação e transporte de lipídios presentes na parede celular do bacilo ou que participem do metabolismo de proteínas importantes para a estrutura da parede celular e virulência da bactéria (FORRELLAD et al., 2013). Assim, a supressão e ativação de genes associados a estas vias podem representar uma tentativa de manter o balanço dos processos, evitando uma exarcebação dos mesmos.

Recentemente, foi demonstrado que o Mtb consegue modular o sistema imune e estabelecer uma infecção prolongada desregulando o mecanismo de ciclo celular do hospedeiro. Isso se dá através da produção de uma proteína que impede a transição da fase G1 para S e aprisiona os macrófagos infectados na fase G0-G1 (CUMMING et al., 2017).

A sinalização MODY se refere a uma forma monogênica de diabetes em que uma mutação em um dos genes requerentes para o transporte e metabolismo da glicose causa a disfunção das células β -pancreáticas, e consequente desregulação de todo o processo (KIM, 2015). A diabetes constitui um importante fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose ativa (WHO, 2016). A tuberculose com ocorrência simultânea da diabetes se caracteriza com o aumento dos níveis de citocinas do tipo Th1, Th2, Th17, pró-inflamatórias e regulatórias. E esta superestimulação do sistema imune potencialmente contribui para o aumento da patologia imune e piora no controle da infecção (KUMAR et al., 2013). A modulação desta via torna-se importante do ponto

de vista da associação entre a tuberculose e a diabetes, onde observamos uma supressão deste processo em indivíduos não vacinados. Em contrapartida, esta via encontra-se ativada nos vacinados, demonstrando que a primovacinação com a BCG consegue modular este processo, e possivelmente favorecer o estabelecimento desta comorbidade.

A tetrahidrobiopterina constitui um cofator para sistemas enzimáticos importantes, como a síntese de óxido nítrico sintase e consequente produção de óxido nítrico e redução de superóxido, sendo essencial para manter o balanço entre estas moléculas (BENDALL et al., 2014; CRABTREE; CHANNON, 2011). O equilíbrio do estado óxido redutivo (REDOX) intracelular é essencial para a sobrevivência, persistência e reativação do bacilo (KUMAR et al., 2011). A supressão desta via é relevante do ponto de vista de combate ao bacilo através da produção de NO, onde vemos que o Mtb pode interferir nesse processo a favor do seu estabelecimento no hospedeiro.

Ao avaliarmos o padrão de genes expressos dentre as formas clínicas avaliadas estratificadas pelo status de vacinação, também observamos que a primovacinação com a BCG interfere na modulação de determinados genes, corroborando assim com os achados anteriores, onde demonstramos que o contato prévio com outra espécie de micobactéria modifica a expressão de moléculas e consequentemente de vias que são importantes na patogênese da doença.

Indivíduos não infectados com o Mtb e que não foram vacinados com a BCG apresentaram uma expressão elevada de 5 genes (*CACNG1*, *GRP*, *CTNND2*, *TMEM68*, *IL25*) associados com vias canônicas e moléculas que se interconectam e participam na ação de citocinas na interação célula-célula, papel dos receptores de reconhecimento padrão para bactérias e vírus, sinalização HMGB1, via de ativação para o tipo de resposta Th1 e Th2 e uma expressão reduzida do gene *SLC16A14* envolvido no transporte molecular. A modulação destes processos biológicos é fundamental para a geração de uma resposta imune específica e apropriada frente aos diferentes patógenos.

Dentre àqueles com TB ativa, foram identificados 2 GDEs com modulação positiva (*RAB25* e *SLC30A3*) nos não vacinados em comparação com os vacinados, envolvidos principalmente com o metabolismo de carboidratos, migração celular, transporte molecular, sinalização e interação célula-célula.

O *SLC30A3* codifica um importante transportador de íon que regula o fluxo de zinco dentro de compartimentos sub-celulares e possui papel crítico na secreção de insulina e metabolismo da glicose nas células β (SMIDT et al., 2009).

O zinco compõe um nutriente essencial para a proliferação de células, principalmente do sistema imune. Nestes tipos celulares, a depleção desta molécula repercute no prejuízo total das funções dos monócitos, redução da citotoxicidade das células NK e fagocitose de neutrófilos, assim como apoptose de células B. Em adição, também induz a diminuição de citocinas do tipo Th1, como o IFN- γ e TNF- α . Além disto, estudos apontam que o zinco pode ser utilizado pelas micobactérias para a sua multiplicação e crescimento. Na tuberculose, a depleção de zinco tem sido associada com pacientes que possuem a forma pulmonar ativa da doença (PRASAD et al., 2012; UTTRA et al., 2011; MYTHILI; LALITHA, 2016; HARRIS, 1969).

O *RAB25* codifica uma GTPase que vem sendo descrita com importante papel funcional no câncer. Em diferentes tipos de cânceres, a elevada expressão de RAB25 promove o aumento da proliferação, migração e invasão celular com supressão da apoptose, correlacionando-se com um pior prognóstico. Em modelo de câncer ovariano, a inibição da expressão de *RAB25* resultou em bloqueio da proliferação celular e induziu a apoptose e autofagia das células (WANG et al., 2017; LIU et al., 2012). Na tuberculose, não há trabalhos que descrevam o papel deste gene. Sua supressão nos doentes vacinados com a BCG poderia indicar uma ação protetora da vacina frente à infecção.

A ativação destas moléculas no grupo dos não vacinados revela vias moduladas especificamente pelo Mtb, e que são dirigidas contra a resposta do hospedeiro, sendo benéficas para o bacilo. Em contrapartida, sua subexpressão nos não vacinados induzida pela BCG seria favorável para o indivíduo.

Nosso estudo ajudou a revelar padrões de expressão associados à progressão da doença, levando em consideração a prévia vacinação dos indivíduos com a BCG, descrita como uma vacina capaz de modular diferentes processos biológicos e modificar respostas essenciais do indivíduo. Estes resultados abrem novas perspectivas que dizem respeito aos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da tuberculose.

9. CONCLUSÕES

- A primovacinação com a BCG afeta a expressão de variados genes, refletindo em mudanças de diferentes vias importantes na resposta do hospedeiro, que não são vistas quando há apenas a infecção com o Mtb.
- A BCG consegue induzir efeitos prolongados, que se mantêm durante a vida do indivíduo, através da modulação de genes importantes que podem atuar diretamente no controle da infecção pelo Mtb, e consequente estabelecimento da doença.

10. REFERÊNCIAS

- ABEBE, M. et al. Modulation of Cell Death by *M.tuberculosis* as a Strategy for Pathogen Survival. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p.1-11, 2011.
- ANDERSSON, H. et al. Apoptotic Neutrophils Augment the Inflammatory Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Human Macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- ANDRADE, B. B. et al. Mycobacterial Antigen Driven Activation of CD14++CD16- Monocytes is a Predictor of Tuberculosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.
- BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. BCG Vaccine: Efficacy and Indications for Vaccination and Revaccination. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3 Suppl, p. S45–S54, 2006.
- BARRETO, M. L. et al. Neonatal BCG Protection Against Tuberculosis Lasts for 20 Years in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 10, p. 1171–1173, 2005.
- BELAY, M. et al. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Against Rv2031 are Elevated During Latent Tuberculosis: A Study in Cohorts of Tuberculosis Patients, Household Contacts and Community Controls in an Endemic Setting. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2015.
- BENDALL, J. K. et al. Tetrahydrobiopterin in Cardiovascular Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 18, p. 3040–77, 2014.
- BENTO, C. F.; EMPADINHAS, N.; MENDES, V. Autophagy in the Fight Against Tuberculosis. **DNA and Cell Biology**, v. 34, n. 4, p. 228-242, 2015.
- BERRY, M. P. R. et al. An interferon-Inducible Neutrophil-Driven Blood Transcriptional Signature in Human Tuberculosis. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 973–977, 2010.
- BORADIA, V. M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Acquires Iron by Cell-Surface Sequestration and Internalization of Human Holo-Transferrin. **Nature Communications**, 2014.

BRADFUTE, S. B. et al. Autophagy as an Immune Effector Against Tuberculosis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p.355-365, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores Prioritários para o Monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, v. 48, n.8, 2017.

BUSTAMANTE, J. et al. Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease: Genetic, Immunological, and Clinical Features of Inborn Errors of IFN- γ Immunity. **Seminars in Immunology**, v.26, n.6, p.454-70, 2014.

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da Tuberculose e Formas Clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29–35, 2006.

COLDITZ, G. A. et al. The Efficacy of Bacillus Calmette-Guérin Vaccination of Newborns and Infants in the Prevention of Tuberculosis: Meta-Analyses of the Published Literature. **Pediatrics**, v. 96, n. 1, p. 29–35, 1995.

COLE, S. T. et al. Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.

COMAS, I.; GAGNEUX, S. The Past and Future of Tuberculosis Research. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. 1–7, 2009.

COOKE, G. S. et al. Polymorphism Within the Interferon- γ /Receptor Complex is Associated with Pulmonary Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 174, n. 3, p. 339–343, 2006.

CRABTREE, M. J.; CHANNON, K. M. Nitric Oxide Synthesis and Recycling of Tetrahydrobiopterin in Endothelial Function and Vascular Disease. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 81–88, 2011.

CUMMING, B. M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Arrests Host Cycle at the G1/S Transition to Establish Long Term Infection. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1–29, 2017.

DALLENKA, T. et al. *M. tuberculosis*-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 4, p. 519-530, 2017.

DAVIDS, V. et al. The Effect of BacilleCalmette-Guérin Vaccine Strain and Route of Administration on Induced Immune Responses in Vaccinated Infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 4, p. 531–536, 2006.

DUBNAU, E. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Genes Induced During Infection of Human Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2787–95, 2002.

DUCATI, R. G. et al. The Resumption of Consumption - A Review on Tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697–714, 2006.

DYE, C. et al. Worldwide Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 0–5, 2002.

ETNA, M. P. et al. A Human Dendritic Cell-Based in Vitro Model to Assess *Mycobacterium tuberculosis* SO2 Vaccine. **Altex**, v. 31, n. 4, p. 397–406, 2014.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence Factors of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

GENGENBACHER, M.; NIEUWENHUIZEN, N. E.; KAUFMANN, S. H. E. BCG — Old Workhorse, New Skills. **Current Opinion in Immunology**, v. 47, p. 8–16, 2017.

GIDEON, H. P. et al. Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines is Associated with Sterilization. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 1, 2015.

GOPINATH, K. et al. A Vitamin B12 Transporter in *Mycobacterium tuberculosis*. **Open Biology**, v. 3, 2013.

GREEN, A. M.; DIFAZIO, R.; FLYNN, J. L. IFN- from CD4 T Cells Is Essential for Host Survival and Enhances CD8 T Cell Function During *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 270–277, 2013.

HAAS, C. T. et al. Diagnostic “Omics” for Active Tuberculosis. **BMC Medicine**, v. 14, n. 37, p. 1-19, 2016.

HARRIS, A. B. Inhibition of Growth and Nucleic Acid Synthesis in Zinc-Deficient *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of General Microbiology**, v. 56, p. 27-33, 1969.

HUR, Y.-G. et al. Factors Affecting Immunogenicity of BCG in Infants, a Study in Malawi, The Gambia and the UK. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 184, p. 1-10, 2014.

IDEKER, T.; GALITSKI, T.; HOOD, L. A New Approach to Decoding Life : Systems Biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 2, p. 343–372, 2001.

KAUFMANN, S. H. E. Tuberculosis Vaccines--a New Kid on the Block. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 159–60, 2011.

KUBLER, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Dysregulates MMP/TIMP Balance to Drive Rapid Cavitation and Unrestrained Bacterial Proliferation. **Journal of Pathology**, v. 235, n. 3, p.431-444, 2015.

KIM, S. H. Maturity-Onset Diabetes of the Young: What Do Clinicians Need to Know? **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 39, n. 6, p. 468–77, 2015.

KJEARGAARD, J. **Bacillus Calmette-Guerin Vaccination at Birth: Effects on Early Childhood Infections, Growth, and Development**. 2016. Tese (Doutorado na Clínica Infantil da Juventude) – Research Center for Vitamins & Vaccines, University of Copenhagen, Dinamarca.

KOWALEWICZ-KULBAT, M.; LOCHT, C. BCG and Protection Against Inflammatory and Auto-Immune Diseases. **Expert Review of Vaccines**, 2017.

KUMAR, A. et al. Redox Homeostasis in Mycobacteria: the Key to Tuberculosis Control? **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. 39, 2011.

KUMAR, N. P. et al. Type 2 Diabetes Mellitus Coincident with Pulmonary Tuberculosis is Associated with Heightened Systemic Type 1, Type 17, and Other Proinflammatory Cytokines. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 10, n. 5, p. 441–449, 2013.

LEE, S.-W. et al. Gene Expression Profiling Identifies Candidate Biomarkers for Active and Latent Tuberculosis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 3, 2016.

LIU, Y. et al. Knockdown of RAB25 Promotes Autophagy and Inhibits Cell Growth in Ovarian Cancer Cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 5, p. 1006–1012, 2012.

LU, C. et al. Novel Biomarkers Distinguishing Active Tuberculosis from Latent Infection Identified by Gene Expression Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–10, 2011.

MAERTZDORF, J. et al. Human Gene Expression Profiles of Susceptibility and Resistance in Tuberculosis. **Genes and Immunity**, v. 12, p. 15-22, 2011.

MARTINS, M.V. et al. The Level of PPD-Specific IFN-gamma-Producing CD4+ T Cells in the Blood Predicts the In Vivo Response to PPD. **Tuberculosis**, v.87, n.3, p. 202-1, 2007.

MIHRET, A. et al. Combination of Gene Expression Patterns in Whole Blood Discriminate Between Tuberculosis Infection States. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 257, 2014.

MONIN, L.; KHADER, S. A. Chemokines in Tuberculosis: the Good, the Bad and the Ugly. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 552-558, 2014.

MYTHILI, C; LALITHA, R. Role of Micronutriente Zinc in Pulmonary Tuberculosis. **Scholars Journal of Applied Medical Sciences**, v. 5, n. 5A, p.1519-1524, 2016.

NETEA-MAIER, R. T. et al. Modulation of Inflammation by Autophagy: Consequences for Human Disease. **Autophagy**, v. 12, n. 2, p. 245–260, 2016.

NUNES-ALVES, C. et al. In Search of a New Paradigm for Protective Immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014.

OTTENHOFF, T. H. M. et al. Genome-Wide Expression Profiling Identifies Type 1 Interferon Response Pathways in Active Tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews**, v. 2, 2016.

PETRUCCIOLI, E. et al. Correlates of Tuberculosis Risk: Predictive Biomarkers for Progression to Active Tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 48, p. 1751-1763, 2016.

PRASAD, R. et al. Vitamin A and Zinc Alter the Immune Function in Tuberculosis. **Kuwait Medical Journal**, v. 44, n. 3, p. 183-189, 2012.

QUEIROZ, A.; RILEY, L. W. Bacterial Immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* Lipids and Their Role in the Host Immune Response. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 2017.

QUIROGA, M. F. et al. Inducible Costimulator: A Modulator of IFN- γ Production in Human Tuberculosis. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 10, p. 5965–5974, 2006.

RIEDER, H. L. Epidemiologic Basis of Tuberculosis Control. **International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, 1999.

ROSENZWEIG, S. D.; HOLLAND, S. M. Defects in the Interferon- γ and Interleukin-12 Pathways. **Immunological Reviews**, v. 203, p. 38-47, 2005.

SAHIRATMADJA, E. et al. Dynamic Changes in Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Profiles and Gamma Interferon Receptor Signaling Integrity Correlate with Tuberculosis Disease Activity and Response to Curative Treatment. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 820–829, 2007.

SAKAI, S.; MAYER-BARBER, K. D.; BARBER, D. L. Defining Features of Protective CD4 T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Opinion in Immunology**, v. 29, p. 137–142, 2014.

SAMBAREY, A. et al. Meta-Analysis of Host Response Networks Identifies a Common Core in Tuberculosis. **Systems Biology and Applications**, v. 3, n. 4, 2017.

SCHLUGER, N. W.; ROM, W. N. The Host Immune Response to Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.157, p. 679-691, 1998.

SIA, J. K.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

SKEIKY, Y. A. W.; SADOFF, J. C. Advances in Tuberculosis Vaccine Strategies. **Natures Reviews Microbiology**, v.4, p. 469-476, 2006.

SMIDT, K. et al. SLC30A3 Responds to Glucose- and Zinc Variations in β - Cells and Is Critical for Insulin Production and In Vivo Glucose-Metabolism During β -Cell Stress. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. 1–12, 2009.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, 2010.

THOMPSON, D. B. et al. Immunological Basis in the Pathogenesis and Treatment of Bladder Cancer. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 11, n. 2, p. 265-279, 2015.

TISONCIK, J. R. et al. Is Systems Biology the Key to Preventing the Next Pandemic? **Future Virology**, v. 4, n. 6, p. 553–561, 2009.

TJELLE, T. E.; LOVDAL, T.; BERG, T. Phagosome Dynamics and Function. **BioEssays**, v. 22, n. 3, p.255-263, 2000.

UTTRA, C. K. M. et al. Serum Zinc Level in Patients with Pulmonary Tuberculosis. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 174-178, 2011.

WHO. Brazil: WHO and UNICEF Estimates of Immunization Coverage: 2016 Revision. **World Health Organization**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/bra.pdf>. Acesso em: 31 de Outubro de 2017.

WHO. **The End TB Strategy**. WHO Report. Geneva, Switzerland, 2015.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. WHO Report. Geneva, Switzerland, 2016.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. WHO Report. Geneva, Switzerland, 2017.

WHO. World Health Organization. **The Top 10 Causes of Death**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 07 de Março de 2017.

WANG, S.; HU, C.; WU, F.; HE, S. Rab25 GTPase:Functional Roles in Cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 38, p. 64591–64599, 2017.

YOUNG, D.; STARK, J.; KIRSCHNER, D. Systems Biology of Persistent Infection: Tuberculosis as a Case Study. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 520–528, 2008.

YUEN, C. M. et al. Turning Off the Tap: Stopping Tuberculosis Transmission Through Active Case-Finding and Prompt Effective Treatment. **The Lancet**, v. 386, p. 2334–2343, 2015.

ZAK, D. E. et al. A Blood RNA Signature for Tuberculosis Disease Risk: a Prospective Cohort Study. **The Lancet**, v. 387, p. 2312-2322, 2016.

ZHANG, J. et al. SIRT2 Plays a Significant Role in Maintaining the Survival and Energy Metabolism of PIEC Endothelial Cells. **International Journal of Pathophysiology and Pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 120-127, 2016.

ZHENG, Y.-Q. et al. Applications of Bacillus Calmette-Guerin and Recombinant Bacillus Calmette-Guerin in Vaccine Development and Tumor Immunotherapy. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 9, p. 1255-1275, 2015.