

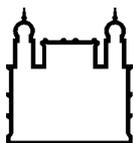
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PADRÃO DE MORTE CELULAR E
NÍVEIS DE CITOCINAS POR DIFERENTES CEPAS DA
VACINA BCG EM CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

ANDREON SANTOS MACHADO DA SILVA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Andreon Santos Machado da Silva

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PADRÃO DE MORTE CELULAR E NÍVEIS DE
CITOCINAS POR DIFERENTES CEPAS DA VACINA BCG EM CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS**

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

Orientador (es): Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas
Profa. Dra. Tatiana Pereira da Silva

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2022

Santos Machado da Silva, Andreon.

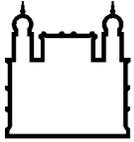
Avaliação *in vitro* do Padrão de Morte Celular e Níveis de Citocinas por Diferentes Cepas da Vacina BCG em Células Mononucleares Humanas. / Andreon Santos Machado da Silva. - Rio de Janeiro, 2022.
146 f.

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

Orientador: Paulo Renato Zuquim Antas.
Co-orientadora: Tatiana Pereira da Silva.

Bibliografia: f. 109-131

1. Vacina BCG Moreau RDJ. 2. Vacina BCG Russia. 3. Tuberculose. 4. Morte Celular. 5. Citocinas. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: ANDREON SANTOS MACHADO DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PADRÃO DE MORTE CELULAR E NÍVEIS DE
CITOCINAS POR DIFERENTES CEPAS DA VACINA BCG EM CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS**

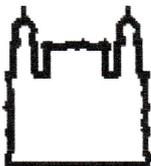
**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas
Profa. Dra. Tatiana Pereira da Silva**

Aprovada em: 1º / 12 / 2022.

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Paula Mello De Luca - Presidente (Fundação Oswaldo Cruz/ IOC)
Profa. Dra. Tonya Azevedo Duarte (Instituto de Ciências da Saúde /UFBA)
Profa. Dra. Marcia de Berrêdo Pinho Moreira (Fundação Oswaldo Cruz/ IOC)
Profa. Dra. Susan Martins Pereira (Instituto de Saúde Coletiva/UFBA)
Profa. Dra. Marta de Almeida Santiago (Fundação Oswaldo Cruz/ IOC)

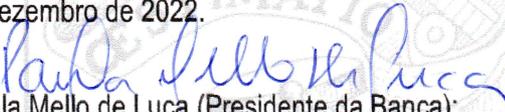
Rio de Janeiro, 1º de dezembro de 2022



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Medicina Tropical de **Andreon Santos Machado da Silva**, sob orientação do Dr. Paulo Renato Zuquim Antas e coorientação da Dra. Tatiana Pereira da Silva. Ao primeiro dia do mês de dezembro de 2022, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **“Avaliação in vitro do padrão de morte celular e níveis de citocinas por diferentes cepas da vacina BCG em células mononucleares humanas”**, no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a Paula Mello de Luca – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a Tonya Azevedo Duarte – UFBA/BA, Dr^a. Marcia de Berrêdo Pinho Moreira – IOC/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr^a. Marta de Almeida Santiago - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Susan Martins Pereira - UFBA/BA. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr^a. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 01 de dezembro de 2022.


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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar à Deus, e também a todos os meus guias e mentores, que me deram força, proteção e discernimento para seguir com essa grande jornada na ciência.

Aos meus familiares, minhas mães Joseni e Luciane; meus pais Ary e Amilton; meus irmãos Rachel, Juliana, Anna Clara, Andrei, Adilon, Amanda, Marcela, Alexandre e Tiago; meus tios Nilce, Lizeth, Alfredo, Luiza e Luzimar; aos seus companheiros; aos meus avós Maria Aparecida e Sebastião; e à toda família, que incentivaram e apoiaram toda minha trajetória.

Aos meus grandes amigos Jéssica, Monique, Ramom, Tatiane, Pedro, Raissa, Lima, Thiago Berga, Thiago Rosa, Luís Felipe, Bruno, Lucas, Rui Linz, Murilo e Clara, por sempre estarem ao meu lado, compartilhando histórias, conhecimentos, dificuldades, choros e alegrias.

Aos meus amigos que ganhei na vida profissional e hoje são meus irmãos, Sandra e Matheus, agradeço a Deus por ter nos colocados juntos nesse período de grande dificuldade que a humanidade passou. Foram muitas noites sem dormir, muitas reuniões sem hora para acabar, muita choradeira e muita alegria. Como previsto, após muita luta, finalizamos essa etapa e nos separamos, mas continuaremos unidos pelo laço da nossa amizade.

Aos meus orientadores, Paulo Antas e Tatiana Silva, pela paciência, calma, orientação e compartilhamento de conhecimentos que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

A equipe de pesquisa, aos Carlos, Lawrence, Mariana, Leandro, João Pedro, Thatiane, Bárbara, Ana, Maria, Elizabeth, Maiara e Staelen, que foram além de colegas de trabalho, uma família, onde me acolheram, e me apoiaram por todo esse caminho.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Clínica da Fiocruz/RJ, Rosa Pinho, Dalma Bianic, Ana Cristina Nogueira, Michele, Periel, Rômulo, Luísa, Gabriel e Nathalia,

por me ajudarem no desenvolvimento profissional e acadêmico, além das atividades relacionadas ao projeto de pesquisa no período em que estive vinculado ao laboratório.

Aos incríveis profissionais do Laboratório de Hanseníase da Fiocruz/RJ, Roberta Olmo, Rhana Prata e toda equipe, que nos acolheram em um período de incertezas e fragilidade, obrigado por estarem conosco e nos ajudarem a concluir essa etapa.

Ao Laboratório de Micobactéria da Universidade Federal do Ceará, aos Cristiane Frota, Lucas Nogueira, Soraya Sancho, Maria do Socorro Silva, Thales e Paulo Rafael, por me receberem no pequeno período do trabalho de campo no Ceará, e pela incrível colaboração nesse estudo.

Agradeço à coordenação do programa de pós-graduação em Medicina Tropical, e a todos os seus coordenadores e professores, pela oportunidade única, pela paciência e disposição, e pela eterna luta por nós e pela ciência.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pois o presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES, Brasil - Código de Financiamento 001.

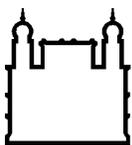
Agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz e a Fundação Oswaldo Cruz, por investirem na ciência e em mim, especialmente durante o período de incertezas e de descaso que vivenciamos.

Agradeço a todos que me auxiliaram no processo, à plataforma de citometria de fluxo de análise multiparamétrica do IOC Fiocruz/RJ; ao Serviço de Hemoterapia/HUCFF/UFRJ, pelo fornecimento das amostras de sangue (*buffy coat*) neste estudo; à Fundação Ataulpho de Paiva, pela disponibilização de vacinas BCG Moreau RDJ; ao Ambulatório Souza Araujo da Fiocruz/RJ, pela disponibilização das vacinas BCG Rússia; à Evelyn Pereira pela enorme paciência e ensinamentos estatísticos; ao Edson de Assis do Laboratório de Imunofarmacologia da Fiocruz/RJ; à equipe do Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos da Fiocruz/RJ por sempre disporem seus equipamentos para nossas análises, ao João Pedro Santos do Laboratório

de Microbiologia Celular da Fiocruz/RJ e a todos os que contribuíram e criticaram este trabalho.

Agradeço também à revisora, Paula De Luca, pelo incrível trabalho, e aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições.

“Ensinar não é transmitir conhecimento, mas criar as possibilidades para sua produção ou sua construção. Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender.”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

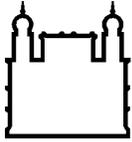
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PADRÃO DE MORTE CELULAR E NÍVEIS DE CITOCINAS POR DIFERENTES CEPAS DA VACINA BCG EM CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Andreon Santos Machado da Silva

A tuberculose (TB) é a segunda doença infecciosa que mais mata no mundo e sua alta disseminação em países vulneráveis socialmente representa uma preocupação mundial. A vacina BCG é atualmente a única medida profilática contra a TB. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre o mecanismo de proteção da vacina BCG contra esta doença. Por mais de 80 anos, o Brasil utilizou a vacina BCG Moreau RDJ. Atualmente, o Brasil adota a vacina BCG Rússia em sua campanha de imunização. Porém, esta última nunca foi estudada na população brasileira. Estudos observaram que o padrão de morte celular por apoptose e citocinas relacionadas à proteção podem ser utilizados como marcadores importantes de entendimento da vacina BCG. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo determinar e comparar parâmetros relacionados à resposta imunológica entre as cepas Rússia e Moreau RDJ da vacina BCG em um modelo *in vitro* com células mononucleares humanas de cultura primária e de linhagem. No ensaio de morte celular por citometria de fluxo, os dados mostraram que a cepa BCG Moreau RDJ apresentou altos níveis de apoptose (Anexina-V⁺/PI⁻) e necrose (Anexina-V⁺/PI⁺), quando comparada a cepa BCG Rússia, em THP-1. Porém, nas células mononucleares de sangue periférico (PBMC), não observamos diferença estatística na comparação entre as cepas. Além disso, na PBMC, o ensaio de detecção de citocinas pró-inflamatórias IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IFN γ , sCD-40L e TNF, e anti-inflamatórias IL-4 e IL-33 apresentaram aumentos significativos ($p < 0,0001$) induzidos pela cepa BCG Moreau RDJ, quando comparados à cepa BCG Rússia. Para a linhagem monocítica THP-1, a IL-1 β apresentou aumento significativo ($p < 0,005$) induzido pela cepa BCG Moreau RDJ, quando comparado à cepa BCG Rússia. A linhagem THP-1 infectada com o BCG Moreau RDJ apresentou uma correlação forte e positiva entre os níveis de Anexina-V⁺/PI⁻ e a IL-1 β , e uma correlação muito forte e positiva entre Anexina-V⁺/PI⁺ e a IL-1 β . Por outro lado e em PBMC, a cepa BCG Moreau RDJ mostrou uma correlação forte e negativa entre os níveis de Anexina-V⁺/PI⁻ e IL-1 β , IL-22, IL-10 e IL-6. Além disso, houve uma correlação forte e positiva, entre os níveis de IL-1 β e IL-22, na linha basal e com BCG Rússia e BCG Moreau RDJ. A padronização do qRT-PCR para os alvos BAD, BID, BAX, BIM, BCL-xL, MCL 1, NOXA, PUMA e TRAF 2 se mostrou satisfatória, reproduzível e com resultados fidedignos. Os dados do presente estudo evidenciaram que a cepa BCG Moreau RDJ apresentou um perfil mais imunomodulador do que a cepa BCG Rússia. Entretanto, mesmo que a cepa BCG Moreau RDJ tenha apresentado estímulos superiores a cepa BCG Rússia, ambas as cepas apresentaram perfis semelhantes de indução, quando comparado a expressão basal, exceto para IL-1 β na linhagem THP-1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

***IN VITRO* EVALUATION OF CELL DEATH PATTERN AND CYTOKINE LEVELS BY DIFFERENT BCG VACCINE STRAINS IN HUMAN MONONUCLEAR CELLS**

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Andreon Santos Machado da Silva

Tuberculosis (TB) is the second killer infectious disease in the world, and its high spread levels in socially vulnerable settings represent a global concern. The BCG vaccine is currently the only prophylactic measure against TB. However, little is known about the mechanism of BCG protection against that disease. For more than 80 years, Brazil has used the BCG Moreau RDJ strain of that vaccine. Currently, Brazil uses the BCG Russia strain of that vaccine in its immunization campaign. However, this strain has never been studied in the Brazilian population. Studies have observed that the cell death pattern by means of apoptosis, and protective-related cytokines can be used as important markers for understanding the BCG vaccine. Therefore, the present study aims to determine and compare parameters related to the immune response between Russia and Moreau RDJ strains of the BCG vaccine in an *in vitro* model with human mononuclear cells from primary and cell-line cultures. In the cell-death assay by the flow cytometry approach, the data showed that the BCG vaccine, Moreau RDJ strain yielded higher levels of apoptosis (Annexin-V⁺/PI⁻) and necrosis (Annexin-V⁺/PI⁺), when compared to the Russia strain, in THP-1. However, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), we did not observe statistical difference in the comparison between the strains. In addition, at PBMC, the assay for the detection of pro-inflammatory cytokines IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IFN γ , sCD-40L and TNF, and anti-inflammatory IL-4 and IL-33 showed a significant increase ($p < 0.0001$) induced by the BCG Moreau RDJ strain, when compared with the BCG Russia strain. For the THP-1 line cell, the IL-1 β levels showed a significant increase ($p < 0.005$) induced by the BCG Moreau RDJ strain, when compared with the BCG Russia strain. The BCG Moreau RDJ-infected THP-1 cell line showed a strong and positive correlation between the Annexin-V⁺/PI⁻ and the IL-1 β levels, and a very strong and positive correlation between the Annexin-V⁺/PI⁺ and the IL-1 β levels. On the other hand, and in PBMC, the BCG Moreau RDJ strain showed a strong and negative correlation between Annexin-V⁺/PI⁻ and the IL-1 β , IL-22, IL-10, and IL-6 levels. In addition, there was a strong and positive correlation between IL-1 β and IL-22 levels at baseline, and in BCG Russia and BCG Moreau RDJ. The qRT-PCR standardization for the targets of BAD, BID, BAX, BIM, BCL-xL, MCL 1, NOXA, PUMA and TRAF 2 proved to be suitable, reproducible, and reliable. The data from the present study showed that the BCG Moreau RDJ strain has a better immunomodulatory profile than the BCG Russia strain. However, even though the BCG Moreau RDJ presented superior stimuli than the BCG Russia, both strains showed similar induction profiles when compared with baseline, except for IL-1 β in the THP-1 cell line.

ÍNDICE

CAPA	I
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tuberculose – uma doença milenar.....	1
1.1.1 A história da tuberculose.....	1
1.1.2 Epidemiologia da Tuberculose.....	3
1.1.3 Agente etiológico da Tuberculose.....	4
1.1.4 Patogênese.....	7
1.1.5 Diagnóstico e Tratamento da Tuberculose.....	9
1.2 Vacina BCG – Única medida profilática contra Tuberculose.....	13
1.2.1 A História da Vacina BCG.....	13
1.2.2 Geração de cepas da Vacina BCG.....	16
1.2.3 Imunização da população brasileira.....	21
1.3 Resposta Imunológica.....	23
1.3.1 Mecanismo de proteção do hospedeiro.....	23
1.3.2 Proteção contra Tuberculose.....	28
1.3.3 Proteção proporcionada pela vacina BCG.....	29
1.3.4 Morte celular imunogênica.....	35
1.3.5 Diferença na resposta imunológica entre as cepas da vacina BCG.....	45
1.4 Justificativa.....	47
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivo Geral.....	49
2.2 Objetivos Específicos.....	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Considerações Éticas.....	50
3.2 Cultivo de células de linhagem THP-1.....	50
3.3 Purificação e cultura das (PBMC).....	51
3.4 Manutenção, contagem e viabilidade das culturas THP-1 e PBMC.....	52
3.5 Ensaio de infecção de células mononucleares com as cepas da vacina BCG ...	52
3.6 Detecção de apoptose e necrose por citometria de fluxo.....	53
3.7 Estratégia de região para análise das populações monocíticas marcadas.....	54
3.8 Detecção de citocinas pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	55
3.9 Detecção de citocinas pelo Luminex.....	57
3.10 Extração, quantificação de RNA, geração de cDNA e qRT-PCR.....	58
3.11 Análise estatística dos resultados.....	60

4	RESULTADOS	61
4.1	Avaliação do Perfil e Nível de Morte Celular	61
4.1.1	Linhagem celular THP-1	61
4.1.2	Células mononucleadas de sangue periférico (PBMC)	63
4.2	Avaliação do perfil de citocinas.....	64
4.2.1	Avaliação do perfil de citocinas dosados por Luminex em PBMC	65
4.2.2	Avaliação do perfil de citocinas dosados por ELISA em PBMC.....	67
4.2.3	Avaliação do perfil de citocinas dosados por ELISA em THP-1.....	68
4.3	Correlação entre os níveis e perfis de morte celular e de citocinas.....	70
4.3.1	Linhagem celular THP-1	70
4.3.2	Células mononucleadas de sangue periférico (PBMC)	71
4.3.3	Análise da correlação entre IL-22 e IL-1 β	73
4.4	Padronização dos iniciadores para avaliação da expressão gênica.....	74
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÕES	87
7	PERSPECTIVAS	88
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXO I	112
	ANEXO II	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de mortalidade média anual da Inglaterra entre os anos de 1840 e 1970.	2
Figura 2. Taxa de incidência estimada de TB no mundo em 2021.	3
Figura 3. Coeficiente de incidência e mortalidade por tuberculose no Brasil.....	4
Figura 4. Modelo de parede celular de micobactéria.....	6
Figura 5: Fluxograma de diagnóstico de novos casos de TB Pulmonar.....	10
Figura 6. Fotografia de aspectos históricos no museu do Instituto Pasteur.....	14
Figura 7. Resumo das vacinas candidatas contra TB.	15
Figura 8. Genealogia das subcepas do BCG.	18
Figura 9. Esquema da expressão do complexo de proteínas pelos MTB e BCG.	19
Figura 10. Cobertura vacinal da vacina BCG no Brasil entre os anos de 2010 e 2021.....	22
Figura 11. Função, caracterização e diferenciação de células T auxiliares.	26
Figura 12. Resposta imune após efeitos específicos da vacinação com BCG.	31
Figura 13. Via da apoptose intrínseca em células de mamíferos.	38
Figura 14. Via da apoptose extrínseca em células de mamíferos..	40
Figura 15. Principais subdivisões de morte celular..	42
Figura 16. Gráficos <i>dotplot</i> representativos de citometria de fluxo.	55
Figura 17. Níveis de apoptose e necrose (%) em THP1 (n=09).	62
Figura 18. Níveis de apoptose e necrose (%) em THP-1 (n=03).	63
Figura 19. Níveis de apoptose e necrose (%) em PBMC (n=19).	64
Figura 20. Níveis (pg/mL) de citocinas pró-inflamatórias induzidas em PBMC (n=14).	66
Figura 21. Níveis (pg/mL) de citocinas anti-inflamatórias induzidas em PBMC (n=14).	67
Figura 22. Níveis (pg/mL) de citocinas induzidas na PBMC (n=19).	68
Figura 23. Níveis (pg/mL) de citocinas induzidas na THP-1 (n=19).	69
Figura 24. Correlação entre morte celular e citocina em THP-1 (n=07).	71
Figura 25. Correlação entre morte celular e citocina em PBMC (n=09).	72
Figura 26. Correlação entre os níveis de IL-1 β e IL-22 em PBMC (n=13).	73
Figura 27. As curvas de amplificação dos alvos.....	74
Figura 28. Eletroforese dos alvos amplificados.	75
Figura 29. As curvas de <i>melting</i> dos alvos.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linha do tempo da TB humana e animal.	1
Tabela 2. Parâmetro de tratamento da ILTB pela prova tuberculínica.....	12
Tabela 3. Limites de detecção das citocinas avaliadas pela técnica de ELISA.	57
Tabela 4. Limite de detecção das citocinas avaliadas pela técnica de Luminex.....	58
Tabela 5. Níveis de citocinas induzidas pelas vacinas BCGs.....	112
Tabela 6. Correlação entre os níveis de morte e citocinas por ELISA.....	113
Tabela 7. Correlação entre os níveis de morte e citocinas por Luminex.....	114

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCD	do Inglês Morte Celular Dependente de Autofagia
AHR	Receptor de hidrocarboneto arílico
APAF1	Fator 1 ativado por protease de apoptose
APC	do Inglês Célula Apresentadora de Antígeno
APP	Proteína precursora de β amilóide
ATCC	American Type Culture Collection
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BAD	Promotor de morte associado a Bcl-XL/Bcl-2;
BAK	Antagonista/killer homólogo de Bcl-2;
BAX	Proteína X associada a Bcl-2;
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
BCL-2	Linfoma de células B 2
BCL-2A1	Antagonizar MOMP
BCL-W PPP1R51)	BCL-2 tipo 2 (ou BCL2L2, KIAA 0271, proteína fosfatase 1 subunidade regulatória 51, PPP1R51)
BCL-XL	Linfoma de células B extra grande (ou BCL-2 tipo 1, BCL-2L1, Bcl-X, proteína fosfatase 1 reguladora subunidade 52, PPP1R52);
BCR	Receptor de células B
BE	Boletim Epidemiológico
BH3	Homologia pró-apoptótica
BID	BID, agonista de morte do domínio de interação de BH3;
BIM	BCL-2L11 (ou BOD, BCL-2 tipo 11, Bcl-2 tipo proteína 11);
BMF	Fator modificador de BCL-2;
BOX	Matador de ovário relacionado a BCL-2
CASP	Protease específica de cisteinil aspartato
CBMC	do Inglês Células Mononucleares de Cordão Umbilical
CD	Grupamento de diferenciação

CDS	do Inglês Sensor de DNA citosólico
c-FLIP	Proteína celular inibidora de FLICE;
CFP	Proteína de filtrado de cultura de 10 kD
c-IAP	Inibidores de proteínas de apoptose;
CLR	Lectina C
DC	Célula dendrítica
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DU	do inglês Duplicação em Tandem
EB	Esquema Básico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimático
EPTB	do inglês Tuberculose Extrapulmonar
ESAT-6	do inglês Alvo antigênico secretado precocemente de 6 kDa
ESX-1	do inglês Sistema de secreção de proteínas do tipo 1
FADD	Proteína associada a FAS com domínio de morte
FAP	Fundação Ataulpho de Paiva
FasL	Ligante de antígeno de superfície associado a FS-7;
FasR	Receptor de antígeno de superfície associado a FS-7 (ou CD95 ou APO-1)
FSC	do inglês Tamanho Celular
GATA3	Proteína de ligação GATA 3
HRK	Ativador de apoptose harakiri (ou HRK, DP5, harakiri, proteína de interação BCL2)
IAP	Inibidores de proteínas de apoptose
ICD	do inglês Morte Celular Imunogênica
IFNγ	Interferon- γ
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ILTB	Infecção Latente da Tuberculose
IQR	do Inglês Intervalo Interquartil

IRB	do inglês Comitês de Revisão Institucional
IRF4	Fator regulador de interferon 4
IRF4	do inglês Fator regulador de interferon 4
LDCD	do inglês Morte Celular Dependente de Lisossomo
MCL-1	Leucemia de células mielóides-1
MNT	Micobacteriose Não Tuberculosa
MOMP	do inglês Permeabilização da Membrana Externa Mitocondrial
MPT	do Inglês Transição da Permeabilidade Mitocondrial
MS	Ministério da Saúde
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF-Kb	Intensificador de cadeia leve do fator nuclear kappa de células B ativadas
NK	Célula Natural Killer
NLR	do inglês Receptor do Tipo NOD
NOD	do inglês Domínio de Oligomerização de Ligação a Nucleotídeos
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
OMA1	OMA1, proteína de metalopeptidase de zinco (ou 2010001O09Rik, DAB1, MPRP-1, YKR087C ou ZMPpeptidase);
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA1	Proteína de atrofia óptica 1
OPG	Osteoprotegerina
p53	Gene com controle do ciclo celular e reparo do material genético
PAMP	do Inglês Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMC	do inglês Células Mononucleares de Sangue Periférico
PE	Prolina-glutamato
PI	do inglês Iodeto de Propídeo
PNI	Programa Nacional de Imunização
PPD	do Inglês Derivado de Proteína Purificada
PPE	Prolina-prolina-glutamato
proCASP	Indturo da protease específica de cisteinil aspartato

PRR	do Inglês Receptores de Reconhecimento de Padrão
PT	Prova Tuberculínica
PU.1	Fator de transcrição da família ETS
PUMA	Modulador de apoptose regulado positivamente por p53 (ou componente 3 de ligação de BC3, JFY-1, BCL-2);
RCD	do inglês Morte Celular Regulada
RD	do inglês Região de Deleção
RIP	Serina/treonina-proteína quinase
RIPK1	Serina/treonina quinase 1 que interage com o receptor;
RIPK3	Interação do Receptor Kinase 3
RLR	do inglês Receptor do tipo RIG
RORγt	Receptor nuclear órfão relacionado ao receptor de ácido retinóico gama
SD	do inglês Desvio Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
SH-HUCFF	Serviço Hemoterápico do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
SMAC/DIABLO	Segundo ativador da caspase derivado da mitocôndria/inibidor direto da proteína de ligação da apoptose com baixo IP
SSC	do inglês Granulosidade e Complexidade
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TB	Tuberculose
T-bet	Codificado por Tbx21
tBID	Agonista de morte do domínio de interação de BH3
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	do inglês Linfócito T auxiliar
TLR	do inglês Receptor do Tipo <i>Toll</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	do inglês Fator de Necrose Tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral 1 (ou TNFRSF1A);

TNFRSF21	Superfamília de receptores do fator de necrose tumoral 21 (ou DR6)
TNFRSF25	Superfamília de receptores de fator de necrose tumoral 25 (ou DR3)
TRADD	TNFRSF1A associado via domínio de morte
TRAF	Fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (ou EBI6, MGC: 10353, receptor de TNF)
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionada a NF (ou ligante APO2)
TRAILRs	Receptor de ligante indutor de apoptose relacionada ao TNF 1 (ou TNFRSF10A, DR4)
Treg	Células T reguladoras
TRM	Teste Rápido Molecular
TS	Teste de Sensibilidade
Ub	Ubiquitinação
UFC	Universidade Federal do Ceará
XIAP	Inibidor ligado ao X da proteína apoptótica (ou API3, BIRC4, IAP-3, ILP1, MIHA, XLP2)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose – uma doença milenar.

1.1.1 A história da tuberculose.

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é o principal agente etiológico da tuberculose (TB), onde esta doença causou cerca de 20 a 30% das mortes na Europa dos séculos XVII a XIX [1,2]. A grande incidência da infecção por MTB fez com que a população estivesse em contato direto com o patógeno, garantindo uma alta exposição a longo prazo e, provavelmente, permitindo uma pressão seletiva genética na população [1,3]. Mesmo sendo uma doença com tratamento efetivo, estabelecido e evitável com medidas de prevenção, ainda são observados valores elevados de incidência, prevalência e mortalidade no mundo [4].

Segundo Pezzela (2019), a origem da TB possui quatro linhas de tempo na história antiga, a saber: (i) os achados arqueológicos primitivos ou antigos; (ii) a documentação da literatura e eventos médicos e não médicos; (iii) a descoberta da causa da TB; e (iv) as modalidades de tratamento subsequentes da TB, juntamente com testes modernos na utilização de DNA recombinante [2]. A presença do MTB foi observada em múmias a partir de genotipagem de seu material genético em dentes e ossos e, com isso, se conclui que a TB é uma doença milenar, e que esteve presente em períodos histórico na humanidade (Tabela 1) [2,3].

Tabela 1. Linha do tempo da TB humana e animal. Fonte: [2]

PERÍODO	LOCALIZAÇÃO
Bisão: 17.000 anos atrás	Estados Unidos: DNA antigo (aDNA)
Período Neolítico: 9.000 anos atrás	Israel: Alit-Yam: mulher e criança aDNA
5.450 a 4.780 aC	Alemanha: aDNA
Múmias 2.400 aC	Egito: Doença de Pott com lesões tuberculosas degenerativas na coluna vertebral
Mulheres Paracas-Caverna, 1.001 a 1.300 dC	Peru: aDNA

Existem vários documentos históricos que registram a passagem da TB ao longo dos tempos [5]. Entretanto, dentre uma série de fatos, tais como: a descoberta científica

de que a doença é transmissível; e a aceitação da teoria da transmissibilidade pelo entendimento da não geração espontânea das doenças; o acontecimento mais marcante na história do MTB foi a origem da denominação Bacilo de Kock [2,3,6]. O médico microbiologista alemão Heinrich Hermann Robert Kock, isolou em 1882 pela primeira vez, a micobactéria causadora da doença, a partir de escarros de pacientes com doença ativa [2,3,6]. Na mesma época, também houve o desenvolvimento da coloração específica de microscopia denominada de Ziehl-Neelsen, descrita pelo bacteriologista alemão Franz Ziehl e pelo patologista alemão Friedrich Carl Adolf Neelsen [2,3,6].

Costa e colaboradores (1988) realizaram um estudo para levantar comentários relacionados a tendência da TB no mundo entre os anos de 1840 e 1970. Aqueles autores pontuaram que a TB se apresentava como uma doença social, pela sua redução e estabilidade ao longo de ampla campanha de divulgação de medidas de combate. Porém, não se poderia deixar de considerar os fatos importantes que se sucederam durante este processo, tais como (i) a identificação do bacilo causador da doença em 1880, (ii) a quimioterapia específica estabelecida a partir de 1940, e (iii) a implementação de campanhas com a vacina Bacilo de Calmette & Guérin (BCG) a partir de 1950 (Figura 1) [7].

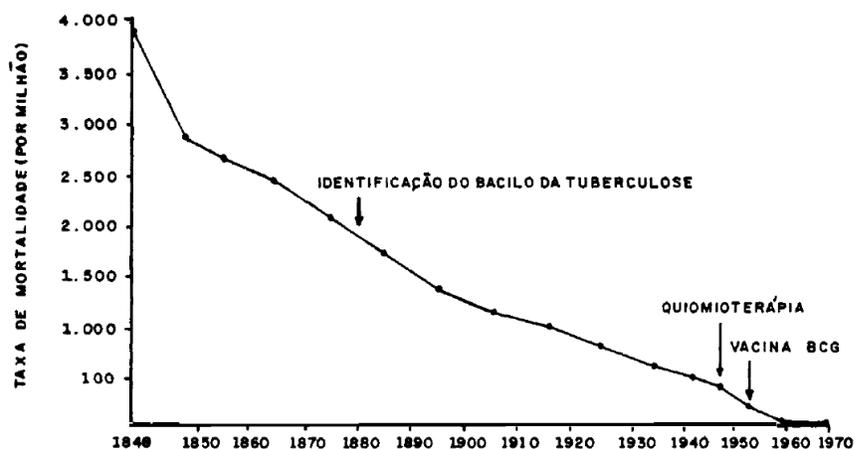


Figura 1. Taxa de mortalidade média anual da Inglaterra média e Gales entre os anos de 1840 e 1970.
Fonte: [7].

1.1.2 *Epidemiologia da Tuberculose.*

A TB foi anunciada em 1993, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma emergência de saúde pública global [8]. Em 2021, segundo a OMS, cerca de um quarto da população mundial está infectada pelo MTB, mais de 1,5 milhão de pessoas morreram de TB no mundo e 10 milhões desenvolveram a doença, onde 5,6 milhões foram homens, 3,3 milhões foram mulheres, e 1,1 milhão foram crianças [9]. Dentre os países que apresentaram maior incidência de TB no mundo, 8 países representaram mais de dois terços do total global: Índia (28%), Indonésia (9,2%), China (7,4%), Filipinas (7,0%), Paquistão (5,8%), Nigéria (4,4%), Bangladesh (3,6%) e República Democrática do Congo (2,9%) (Figura 2) [8].

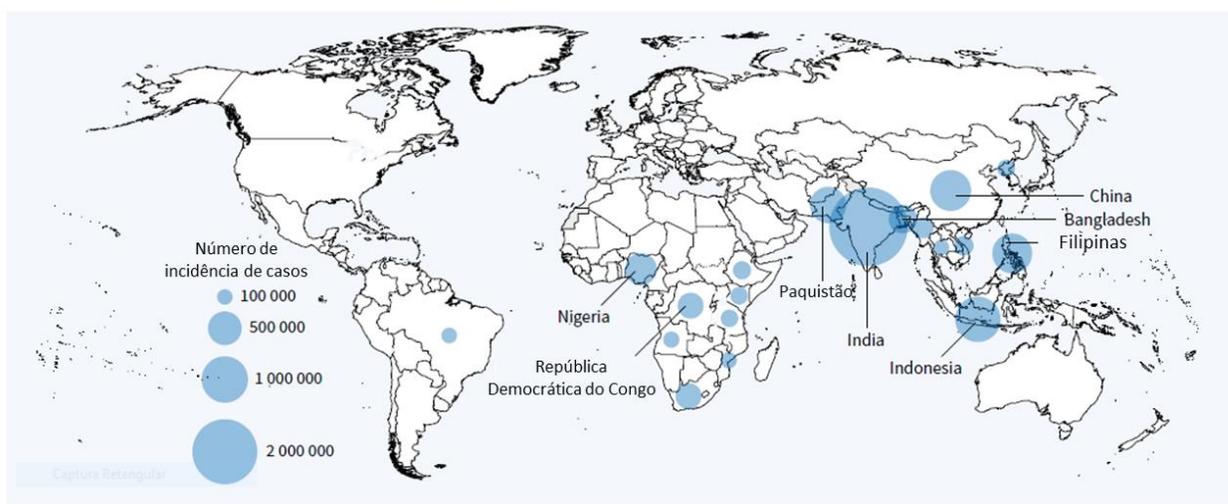


Figura 2. Taxa de incidência estimada de TB no mundo, em 2021. Fonte: Adaptado de [10].

No cenário atual, a Covid-19 e a TB são as duas principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo [11]. Assim, a TB se encontra no topo das doenças de agente patogênico único que mais mata, perdendo recentemente apenas para a Covid-19 [9,12]. Atualmente, o Brasil ocupa a 12ª posição daqueles países que contribuíram com déficit de notificação, pois a alta incidência de uma doença com sintomas semelhantes a TB, como a Covid-19, promoveu a subnotificação e redução da acessibilidade da população infectada, ou em tratamento, aos postos de saúde [12]. O país encontra-se, na 20ª posição de taxa de incidência de TB no mundo, compondo o

grupo dos 22 países com altas incidências, e sendo também foco de discussões sobre estratégias de combate e controle, entre a OMS e as nações unidas [8,9].

Segundo o Boletim Epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde (MS), em 2020, aproximadamente 4.543 óbitos pela doença foram notificados, rendendo um coeficiente de mortalidade de 2,1 por 100 mil habitantes (Figura 3) [9]. Em 2021, o Brasil apresentou 68.271 casos novos de TB, com um coeficiente de incidência de 32,0 casos por 100 mil habitantes [9].

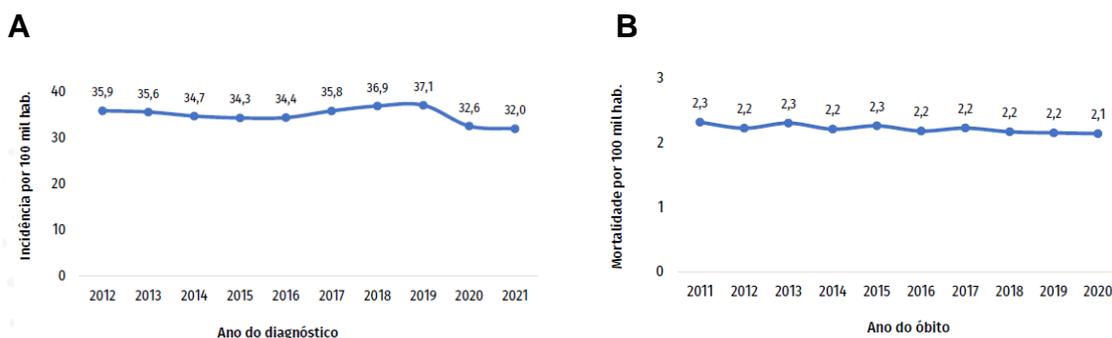


Figura 3. (A) Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil hab.) no Brasil, de 2012 a 2021, (B) Coeficiente de mortalidade por tuberculose (por 100 mil hab.) no Brasil, 2011 a 2020. Taxas representativas de dados mais recentes em porcentagem de casos novos confirmados por tuberculose pulmonar no Brasil. Fonte: [9].

1.1.3 Agente etiológico da Tuberculose.

O complexo MTB pertence é um grupo de bactérias do gênero *Mycobacterium* composto pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium caprae*, e *Mycobacterium canetti* [2–4]. O bacilo possui uma parede celular espessa, o que o proporciona uma menor taxa de absorção de nutrientes, crescimento lento, forma diferenciada de coloração e redução na entrada de antibióticos, levando a um tratamento a longo prazo, sendo este um dos principais motivos de baixa adesão.

As micobactérias possuem colônias que são visualizadas somente a partir de semanas de cultivo, devido ao seu crescimento lento [2]. Entretanto, existe uma relação entre sua velocidade de crescimento e a sua patogenia, pois quanto maior a velocidade de multiplicação, mais rápida seria a sua disseminação no sítio de infecção [2]. Além disso, elas também possuem um crescimento em fator-corda, causado pela principal molécula contendo ácido micólico, a trealose 6,6-dimicolato, um componente da parede celular e envolvido em importantes mecanismos imunomoduladores responsáveis pela virulência das micobactérias [1].

De modo geral, as micobactérias possuem (i) altos níveis de lipopolissacarídeo no envelope celular, e que garante resistência a alguns fármacos; (ii) estruturas em forma de bastonetes; (iii) falta da formação de endósporos; (iv) crescimento filamentosos; (v) parede celular com estruturas similares aquela de bactérias Gram-negativas; (vi) ácidos micólicos em sua parede celular, que proporcionam o fator corda; (vii) uma camada serosa resistente à água e a estresses, como o ressecamento; e (viii) capacidade de atrair células inflamatórias ao local da infecção e escape do fagolisossomo (Figura 3) [1,3].

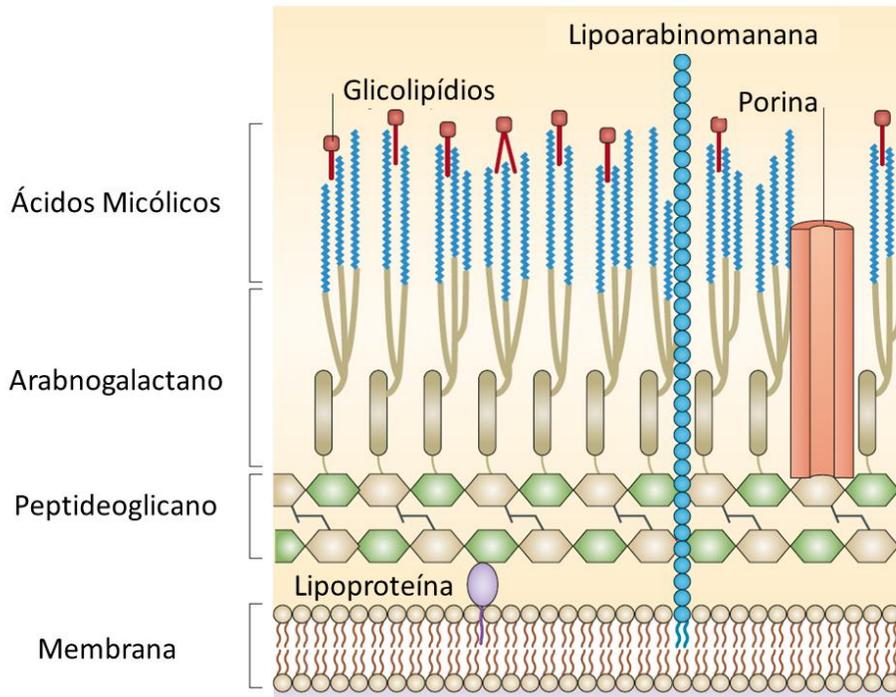


Figura 4. Modelo de parede celular de micobactéria. Fonte: Adaptado de [13].

A parede celular espessa da micobactéria acarreta a necessidade de uma técnica de coloração diferenciada [14]. Portanto, existem duas técnicas comumente utilizadas para coloração de MTB, a saber: (i) Ziehl-Neelsen, ou exame de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), que apresenta em sua composição a fucsina e o azul de metileno, e (ii) Kinyoun, conhecida também como “ácido-rápido”, que faz uso de carbol de fucsina [2,14]. Ambas as técnicas possuem penetrabilidade no citoplasma pela parede celular quando a amostra é aquecida, e usam o álcool-ácido, que remove os resíduos que não penetraram, sem alterar seu perfil ou morfologia, e podem ser visualizadas por microscopia óptica [2,14]. Entretanto, o carbol de fucsina utilizado pela técnica de Kinyoun impregna o citoplasma do bacilo com mais facilidade com tempo menor de aquecimento [2,14].

1.1.4 Patogênese

A TB pode ser transmitida de uma pessoa para outra, por aerossóis contaminados, expelidos no ar a partir da fala, canto, tosse e espirro [9]. As células epiteliais pulmonares do tipo II do tecido, em contato com os ácidos micólicos presentes no envoltório dos bacilos alojados nos alvéolos pulmonares do hospedeiro, expressam sinalizadores quimiotáticos que atraem macrófagos alveolares, que serão os principais responsáveis pela multiplicação e disseminação do MTB [1–3]. Em contato com o bacilo, os macrófagos alveolares iniciam a fagocitose e exercem seu papel de célula apresentadora de antígeno (APC) [2,15]. Porém, com a inibição da fusão fagolisossomal e seu consequente escape, os bacilos alcançam o citoplasma e iniciam sua proliferação intracelular [14]. Os macrófagos infectados expressam moléculas quimiotáticas que atraem mais macrófagos e outras células do processo inflamatório para a área da infecção, a fim de combater o patógeno e induzir as células infectadas a sua morte [15]. No entanto, o MTB inibe a apoptose e desencadeia a necrose dos macrófagos do hospedeiro, um mecanismo ardiloso para induzir o atraso nas imunidades inata e adaptativa [16].

Rapidamente, células imunes como os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, chegam à área da lesão primária para formar uma camada chamada de tubérculo inicial, que poderá se expandir, para formar o primeiro granuloma tuberculoso denominado complexo do Ghon [2,14]. Este processo permite aos bacilos presentes, a capacidade de infectar mais macrófagos, aumentando em número de forma significativa [1,2]. As células imunes presentes no tubérculo inicial liberam citocinas que promovem um aumento do processo inflamatório infeccioso, com lesão do tecido na região que formará o futuro granuloma, este sendo uma grande concentração organizada de células imunes ao redor da região em contato com o MTB [1–3].

Dentro de semanas, com um número significativo de macrófagos infectados e com o tubérculo contendo um tamanho maior devido ao efeito quimiotático das células imunes presentes, o núcleo do tubérculo forma um centro caseoso, devido a morte dos macrófagos infectados [1–3]. Neste momento, os bacilos aeróbicos obrigatórios diminuem a sua taxa de crescimento, que pode ser totalmente interrompida com a calcificação do tubérculo, o que caracteriza a infecção latente da TB (ILTB), mas ainda

sendo possível a sua reativação [1–3]. Com o amadurecimento do tubérculo, à medida que o centro caseoso se torna maior com as mortes dos macrófagos infectados, a doença evolui para a sua forma clínica detectável para o hospedeiro e pode apresentar os sintomas da TB [1–3,14].

A liquefação acontece quando o centro caseoso do granuloma aumenta, se rompendo pelo processo mecânico da respiração, e forma uma cavidade tuberculosa preenchida por ar, o que possibilita aos bacilos crescerem de forma extracelular [1–3,14]. Sendo assim, os mesmos são liberados após a ruptura do tubérculo, alcançando os bronquíolos, sistemas circulatório e linfático, sendo chamado de TB ativa, onde ocorre o processo de disseminação aérea da doença [1–3,14].

Dentre os sintomas clínicos mais presentes da TB pulmonar, está a tosse persistente e vespertina, que em estágios mais avançados pode apresentar hemoptise, devido ao rompimento de vasos sanguíneos adjacentes ao tecido do tubérculo, seguido de emagrecimento, perda de vigor e hemorragias fatais [14].

Eventualmente, após a formação do complexo de Ghon primário, os bacilos podem entrar na corrente sanguínea e atingirem vários órgãos [3]. Essa disseminação linfo-hematogênica resulta em TB Extrapulmonar (EPTB) durante a infecção primária ou mais tarde na vida, durante a reativação da doença [3]. Dependendo da localidade, a EPTB pode se manifestar em várias partes do organismo do hospedeiro na infecção primária, ou na reativação, a depender da imunidade do hospedeiro, grau de desenvolvimento da doença e do sítio de infecção [3]. Os outros tipos de EPTB mais comuns são: manifestação nos linfonodos (linfadenite tuberculosa), manifestação na membrana que reveste o pulmão (TB pleural), manifestação neurológica (meningite tuberculosa), manifestação no abdome (TB abdominal), manifestação óssea (TB óssea), manifestação no trato geniturinário (GUTB) e manifestação cutânea (TB miliar) [3].

1.1.5 Diagnóstico e Tratamento da Tuberculose

O diagnóstico da TB no Brasil segue as orientações do Manual de Recomendações Para o Controle da Tuberculose no Brasil, e são subdivididos em diagnóstico clínico, diferencial, bacteriológico, imagem, histopatológico e por outros testes diagnósticos [9,17].

O diagnóstico laboratorial da TB é fundamental, tanto para a detecção de casos novos, quanto para o controle de tratamento [9,17]. Para TB, o MS preconiza os seguintes diagnósticos laboratoriais: (i) Teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) ou baciloscopia, (ii) Cultura, e (iii) Teste de Sensibilidade aos fármacos [9,17]. A partir do TRM, é possível realizar uma triagem inicial do paciente, o que o direciona para posteriores testes e/ou tratamentos (Figura 5) [9,17]. Entretanto, a forma de conduzir o paciente com suspeita pelo TRM pode sofrer variações quando o paciente é um contactante de outro paciente ativo, faz parte de uma população com maior vulnerabilidade ou é um paciente com resistência à rifampicina [9,17].

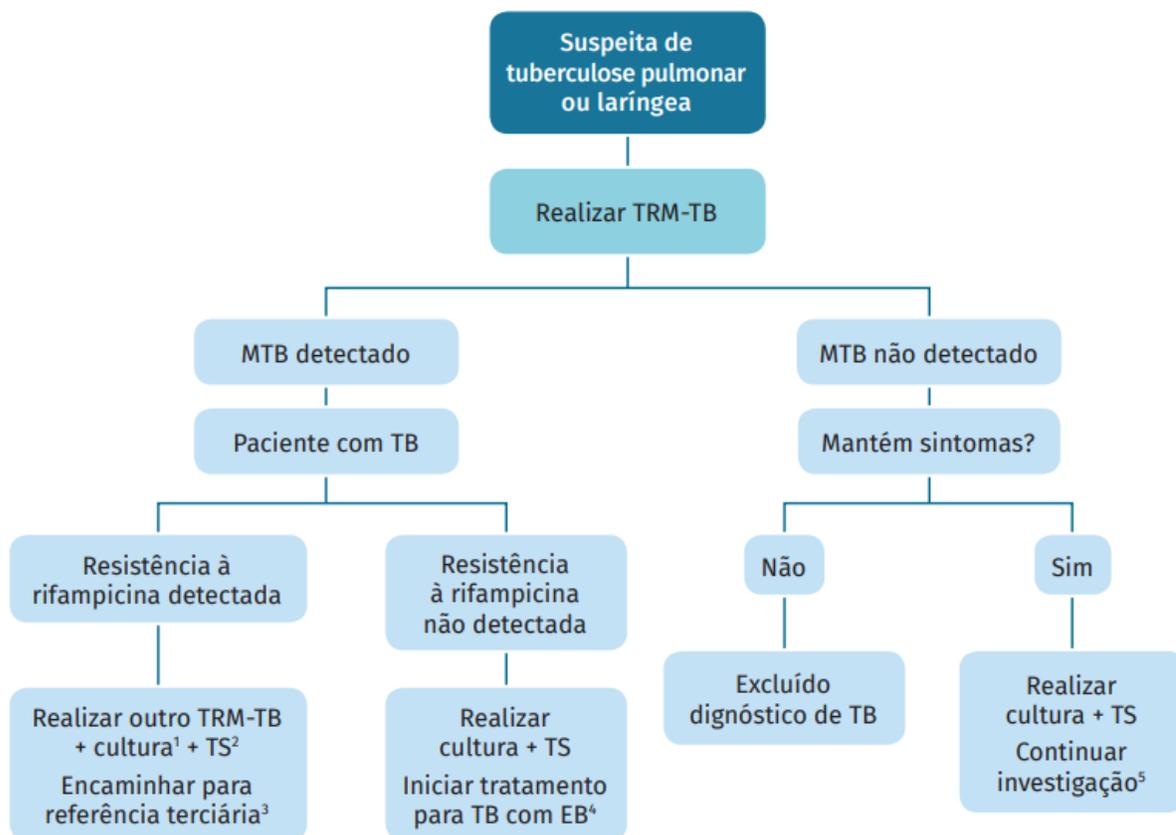


Figura 5: Fluxograma de diagnóstico de novos casos de TB Pulmonar em adultos e adolescentes baseado no Teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB). ¹ Realizar cultura de escarro preferencialmente pelo método automatizado; ² TS – Teste de Sensibilidade; ³ Referência terciária – ambulatório de referência para tratamento de tuberculose resistente. O paciente deve chegar à referência terciária imediatamente sem que se aguardem os resultados dos novos exames solicitados. Nesse serviço, a avaliação médica e a conduta adequada deverão ser tomadas em até sete dias. O resultado da cultura com TS deverá ser encaminhado à referência terciária; ⁴ EB – Esquema Básico – reavaliar o tratamento após resultado da cultura com TS; ⁵ Investigar micobacteriose não tuberculosa (MNT) e outros diagnósticos diferenciais. Fonte: [17].

O uso de métodos de imagens, como Telerradiografia de Tórax (raio-X) e/ou Tomografia Computadorizada de Tórax para identificar lesões no pulmão, também são empregados para complemento de diagnóstico de TB ativa [17].

No caso de ILTB, um dos testes de diagnóstico ocorre a partir de uma resposta imunológica proporcionada pelo contato anterior com o MTB, onde o indivíduo infectado apresenta uma memória imunológica contra a micobactéria [1–3]. Assim, quando injetado cutaneamente com um Derivado de Proteína Purificada (PPD) do patógeno, produzido

por precipitação de culturas em caldo, o organismo do hospedeiro responde com uma reação de hipersensibilidade tardia, ou tipo IV [14]. Esta reação se dá após as 48 horas de sua aplicação e, quando o teste é positivo, o indivíduo apresenta uma reação de endurecimento e vermelhidão na área em torno de onde foi injetado o PPD [9]. No entanto, o teste diagnóstico com PPD não é específico para a forma TB ativa, porém é atualmente usado como triagem para detecção de Infecção Latente da Tuberculose (ILTb) [9]. Além disso, o MS discrimina com exatidão as situações em que o teste deve ou não ser realizado, bem como seu parâmetro de positividade, a partir do tamanho da reação (Tabela 2) [18]. Em caso de positividade, junto com a presença de forma clínica e expectoração produtiva, o próximo passo é o eventual isolamento da bactéria para crescimento bacteriano a partir do escarro [17]. Mesmo com o crescimento do MTB sendo lento, a cultura acaba sendo o método padrão-ouro mais eficaz para detecção de TB ativa [17].

Tabela 2. Parâmetro de indicação de tratamento da infecção latente da TB (ILTB) de acordo com o resultado da prova tuberculínica. Fonte: [18]

Sem prova tuberculínica	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recém-nascidos coabitante de caso índice bacilífero 2. Pessoa vivendo com HIV/aids com cicatriz radiológica sem tratamento prévio 3. Pessoa vivendo com HIV/aids contato de TB pulmonar
Prova tuberculínica \geq 5 mm	<ol style="list-style-type: none"> 4. Contatos crianças menores de 10 anos, não vacinadas com BCG 5. Contatos crianças menores de 10 anos, vacinadas com BCG há mais de 2 anos 6. Contatos crianças menores de 10 anos de povos indígenas (independente da BCG) 7. Contatos adultos e adolescentes maiores de 10 anos 8. Pessoas vivendo com HIV/aids 9. Indivíduos em uso de inibidores do TNF-α 10. Alterações radiológicas fibróticas sugestivas de seqüela de TB 11. Transplantados em terapia imunossupressora 12. Indivíduos menores de 65 anos em uso de corticosteroides (>15 mg de prednisona por mais de um mês)
Prova tuberculínica \geq 10 mm	<ol style="list-style-type: none"> 13. Contatos crianças menores de 10 anos, vacinadas com BCG há menos de 2 anos 14. Silicose 15. Neoplasia de cabeça e pescoço 16. Neoplasias hematológicas 17. Insuficiência renal em diálise 18. Indivíduos menores de 65 anos com diabetes <i>mellitus</i> 19. Indivíduos menores de 50 anos com baixo peso (< 85% do peso ideal) 20. Indivíduos menores de 50 anos tabagistas (> 1 maço/dia) 21. Indivíduos menores de 50 anos com calcificação isolada (sem fibrose) na radiografia
Conversão tuberculínica**	<ol style="list-style-type: none"> 22. Indivíduos contatos de TB bacilífera 23. Profissional de saúde 24. Profissional de laboratório de micobactéria 25. Trabalhador do sistema prisional 26. Trabalhadores de instituições de longa permanência

*Casos em que não é necessário realizar a prova tuberculínica, mas em que é fundamental excluir a doença ativa antes de tratar a infecção latente de tuberculose.

**Prova Tuberculínica (PT) com incremento de 10 mm em relação à PT anterior. Para avaliar conversão, é necessário realizar a PT, pelo menos, oito semanas após a primeira aplicação da PT. Fonte: [18].

Os testes diagnósticos sanguíneos que garantem um resultado rápido e confiável de ILTB, são o QuantiFERON-TB Gold In-Tube e o T-Spot.TB, que mensuram os níveis de interferon- γ (IFN- γ) [1,2]. Já a PCR automatizada, vem sendo amplamente utilizada e

implementada no Brasil desde 2013, como o Gene Xpert MTB/RIF, teste diagnóstico para formas de TB resistente, que apresenta o resultado em 90 minutos [2].

No contexto de tratamento, a principal dificuldade encontrada na TB ativa, é a sua adesão, por ser uma terapêutica de seis meses com a utilização de múltiplas drogas, sendo a aplicação de outros fármacos necessária para evitar o surgimento de resistências [9,14]. Desde 1944, o fármaco principal introduzido no tratamento da TB foi a estreptomicina, sendo o primeiro antibiótico eficaz no tratamento da enfermidade [9,14]. Porém, sua substituição por isoniazida, etambutol, pirazinamida e rifampicina foi necessária, mediante o surgimento de resistências, sendo estes atualmente considerados o padrão-ouro para o tratamento [9,14].

1.2 Vacina Bacilo de Calmette & Guerin (BCG) – Única medida profilática contra Tuberculose.

1.2.1 A História da Vacina BCG.

A vacina Bacilo de Calmette & Guerin (BCG) foi derivada da atenuação de uma cepa virulenta de *M. bovis*, sendo atualmente a única medida profilática licenciada contra a TB [5]. A vacina BCG foi desenvolvida entre 1908 e 1921 pelos cientistas franceses Léon Charles Albert Calmette e Jean-Marie Camille Guérin (Figura 4). Aquele bacilo original, mostrou diminuição da sua virulência depois de ciclos periódicos de cultura, culminando em cerca de 230 passagens repetidas em fatias de batata embebidas em meio de bile de carne bovina glicerinado, ao longo de um período de 13 anos [19]. A partir da sua atenuação, a estirpe BCG garantiu maior proteção contra a TB em bezerros e cabras [20]. A sua implementação apresentou redução nas taxas de TB no mundo [5,6,21]. Entretanto, sua eficácia apresenta variabilidade contra a TB Pulmonar, com maior proteção nos casos de TB extrapulmonar para recém-nascidos [22], na meningite tuberculosa e na tuberculose miliar (forma disseminada) [23]. Assim, pela sua eficácia, melhor custo de produção e termoestabilidade, a mesma foi aceita na sociedade e distribuída pelo mundo em mais de 180 países [5,6,21].

Em 1921, aconteceu o primeiro uso da vacina BCG em humanos na França visando a proteção empírica em uma criança [5,21]. Após o parto, esta menina perdeu sua mãe para TB, além de ter tido longa exposição ao bacilo, devido a avó e seus irmãos também estarem infectados no mesmo domicílio [5,21]. A criança vacinada oralmente com três doses de 2 mg cada (6 mg no total; $2,4 \times 10^8$ bacilos), não apresentou manifestação clínica de TB, nem mesmo efeito colateral à imunização, encorajando um estudo posterior que ocorreu em 1924 com mais de 660 vacinações orais com o BCG em bebês [5,21]. Em seguida, as cepas-filha desta vacina foram distribuídas em todo mundo para seu uso e fabricação, resultando em mais passagens em cultura, com diferentes condições, em diferentes laboratórios, acarretando em modificações do padrão do BCG usado inicialmente [20].



Figura 6. Fotografia de aspectos históricos no museu do Instituto Pasteur de Lille, França. Em destaque, Dr. Guérin com sua auxiliar e em seu laboratório. Fonte: Acervo particular do orientador.

Ao longo da história, várias propostas de melhoria da vacina BCG foram discutidas. Nos últimos 20 anos, aproximadamente 20 novas vacinas candidatas contra

a TB entraram em ensaios clínicos [24,25]. A maioria delas são vacinas de subunidade, com vetor viral projetado para substituir o BCG, ou para aumentar a resposta imune após uma vacinação primária com BCG [24,25]. Dentre as plataformas de vacinas de vetores virais, estão (i) Ad5 Ag85A, (ii) BCG ChAdOx1/MVA85APPE15-85A, (iii) ChAdOx1 85A MVA85A, (iv) CMV-6Ag, (v) MVA vacina multifásica, e (vi) TB/Flu04L [24,25]. Já dentre as vacinas de subunidades proteicas/adjuvantes estão (vii) H107, (viii) CyVac2/Ad, (ix) ID93/GLA-SE, (x) GamTBVac, (xi) M72 + AS01, e (xii) H56:IC31 [24,25]. Dentre as vacinas de célula inteira/extrato estão (xiii) AEC/BC02, (xiv) RUTI, (xv) DAR-901, e (xvi) MIP [24,25]. Finalmente, dentre as vacinas vivas atenuadas/recombinantes estão (xvii) BCG ZMP1, (xviii) MTB VAC, (xix) Revacinação com BCG, e (xx) VPM 1002 (Figura 7) [24,25].

	Pré-Clínica	Fase 1	Fase 2a	Fase 2b	Fase 3
Bebês & Neonatos	BCG-ZMP1		MTBVAC		VPM1002
Adolescentes & Adultos	BCG-ZMP1	Ad5 Ag85A	MTBVAC	M72 + AS01	VPM1002
	H107	AEC/BC02	TB/Flu04L	DAR-901	MIP
	BCG, ChAdOx/MVA PPE15-85A	ChadOx1.85A MVA 85A	ID93/GLA-SE	H56:IC31	
	CMV-6Ag		GamTBVac	BCG revaccination	
	CysVac2/Ad				
Terapêuticos	MVA Multiphasic vac. H107	ID93/GLA-SE H56:IC31	RUTI TB/Flu04L		VPM1002

■ Subunidade
 ■ Célula Inteira
 ■ Vetor
 ■ Atenuado

Figura 7. Resumo das vacinas candidatas contra TB atualmente em ensaios clínicos. Modificado da Iniciativa de Vacina contra a Tuberculose (<https://www.tbvi.eu/what-we-do/pipeline-of-vaccines/>). Fonte: adaptado de [25].

1.2.2 Geração de cepas da Vacina BCG.

O termo “vacina BCG” na atualidade consiste em um conjunto de diferentes subcepas [5,26]. Muitas vezes vistas como uma só, diferentes subcepas de *M. bovis* BCG foram cultivadas em laboratórios pelo mundo, ao longo dos anos [27]. As cepas da vacina BCG são cultivadas por diferentes métodos e são aplicadas em diferentes calendários vacinais e em populações com características genéticas distintas e expostas à diferentes condições socioeconômicas [28]. Portanto, não é surpresa que os níveis de eficácia da vacina BCG flutuem em populações adultas, sendo demonstrada em estudos clínicos comparativos a capacidade superior na proteção conferida por algumas cepas [29]. Portanto, desde o início dos anos 60, os lotes-sementes secundários liofilizados são utilizados como fonte de estirpes das vacinas comercialmente disponíveis, no intuito de minimizar estas diferenças encontradas [30]. As diretrizes de produção de vacinas da OMS exigem culturas frescas de lotes secundários do BCG advindos do lote primário [26,30]. Essas recomendações foram modificadas recentemente, sugerindo não ultrapassar quatro passagens, pois foram observadas modificações dos fenótipos em lotes de vacinas com apenas 12 subcultivos [26,30].

Em 1924, ocorreu a primeira distribuição documentada de uma cepa-filha da vacina BCG, sendo nomeada como BCG Rússia [5,21]. Segundo os registros de transferências da vacina BCG entre laboratórios, foi demonstrado que o BCG Moreau RDJ e o BCG Japão foram obtidos em 1925 [31,32] Suécia em 1926, e o BCG Birkhaug em 1927 [33]. Ao longo dos anos, estudos pontuaram que estas cepas do BCG apresentam alterações e divergências em suas estruturas genética e bioquímica, distintas imunogenicidades e virulências residuais, o que acarretou heterogeneidade na proteção contra a TB nas populações onde sua implementação ocorreu [15,20,34].

Após a atenuação, foi evidenciado que o BCG continuou a ser modificado até a introdução da técnica de liofilização em 1960, que garantiu uma segurança nas possíveis mudanças na resposta vacinal [20]. Desde o início da década de 1970, o BCG tem sido usado como parte do Programa Ampliado de Imunização da OMS, que já utilizou mais de quatro bilhões de doses até o momento e é a vacina mais utilizada na história [5].

De acordo com Behr e colaboradores (1979), quanto maior o número de passagens da vacina BCG, menor a resposta imunológica contra a TB [19]. Por este motivo, foram realizadas comparações genéticas da vacina BCG produzida em cada laboratório que recebeu a cepa inicial, e mediante o sequenciamento comparativo com o MTB, foram detectadas algumas regiões de deleção (RD) e divergências entre cada BCG produzido [20,34]. Duplicações em tandem (DU) também foram observadas, separando as cepas em grupos, onde no tandem DU1 temos a cepa-mãe, e nos tandens subsequentes, similaridades genéticas por grupos (DU2-I – DU2-IV) (Figura 8) [15,34,35]. A partir desta divisão, cada um dos dois grupos foi dividido em dois tipos de DU, a saber: (i) BCG Rússia, Moreau e Japão como grupo DU2 I; (ii) BCG Suécia e Birkhaug como grupo DU2 II; (iii) BCG Praga, Glaxo, Merieux e Dinamarquês como DU2 grupo III, e (iv) Frappier, Connaught, Tice, México, China, Phipps e Pasteur como DU2 grupo IV [34,36].

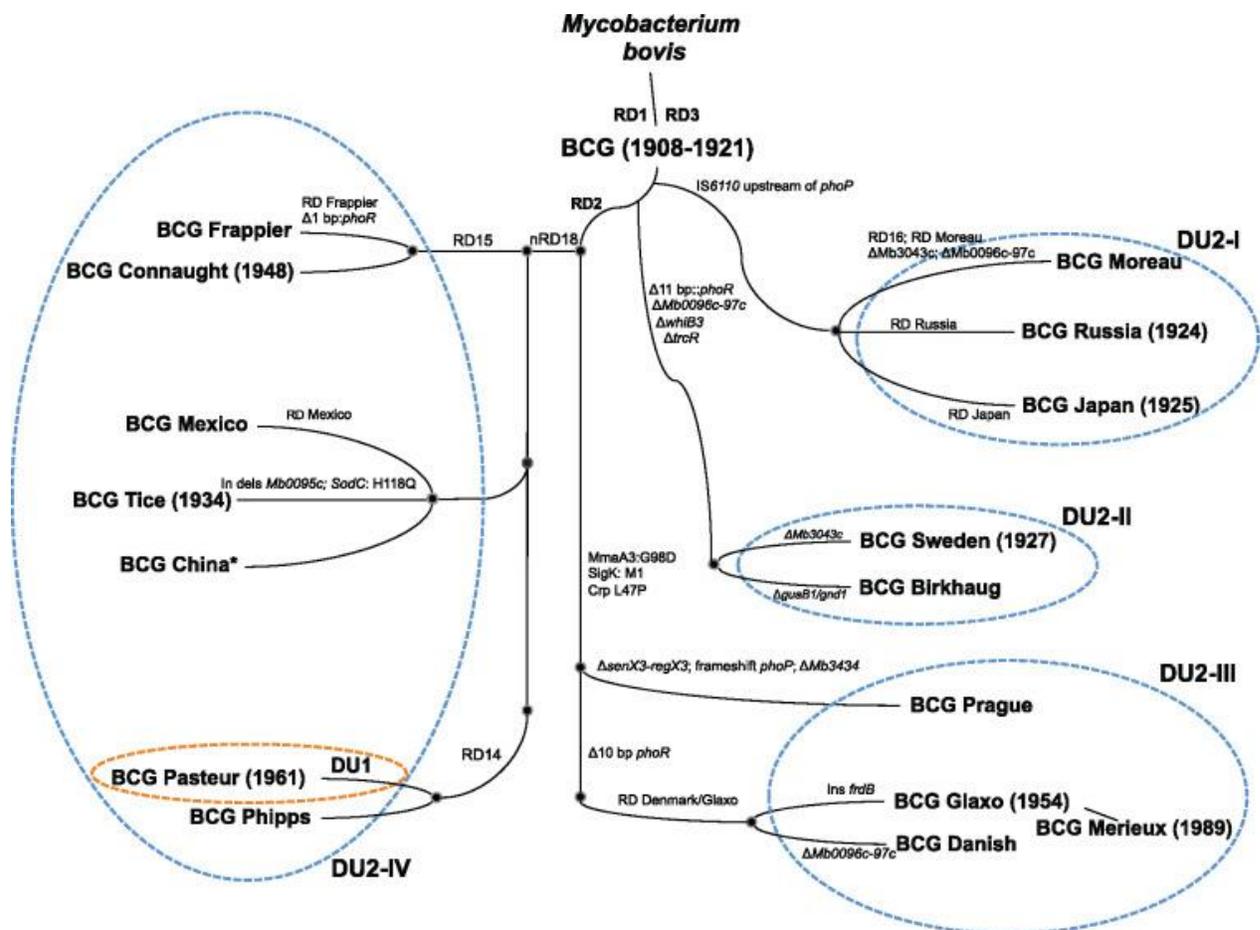


Figura 8. Genealogia das subcepas do BCG. A RD1 está ausente de todas as subcepas de BCG, e coincide com a virulência atenuada de *M. bovis*. De cima para baixo da linha do tempo, as subcepas BCG são divididas em cepas "Precoces" e cepas "Tardias". Nas cepas "Precoces", as características originais da "cepa BCG Pasteur original" foram conservadas com menos deleções, inserções e mutações no genoma dos bacilos, do que as cepas "Tardias". Nota: Ambas as cepas BCG Moreau RDJ e BCG Russia, fazem parte do mesmo grupo DU 2-I, e são próximas do BCG Pasteur inicialmente distribuído entre os laboratórios no começo de sua produção. Siglas: BCG=Bacilo de Calmette Guérin; DU=Duplicações em tandem; e RD=Região de deleção. Fonte: [35,36].

Posteriormente, e com o sequenciamento realizado, se conseguiu identificar a região do gene que proporciona virulência para a micobactéria [19]. O fator de virulência ESX-1 é um sistema de secreção de proteínas, codificado na pela RD1 nas micobactérias [34]. A RD1 tem 9,5 Kb de comprimento e compreende nove genes, incluindo os genes que codificam as proteínas secretadas pelo alvo antigênico secretado precocemente de 6 kDa (ESAT-6) e proteína do filtrado de cultura de 10 kDa (CFP-10) (Figura 9) [21].

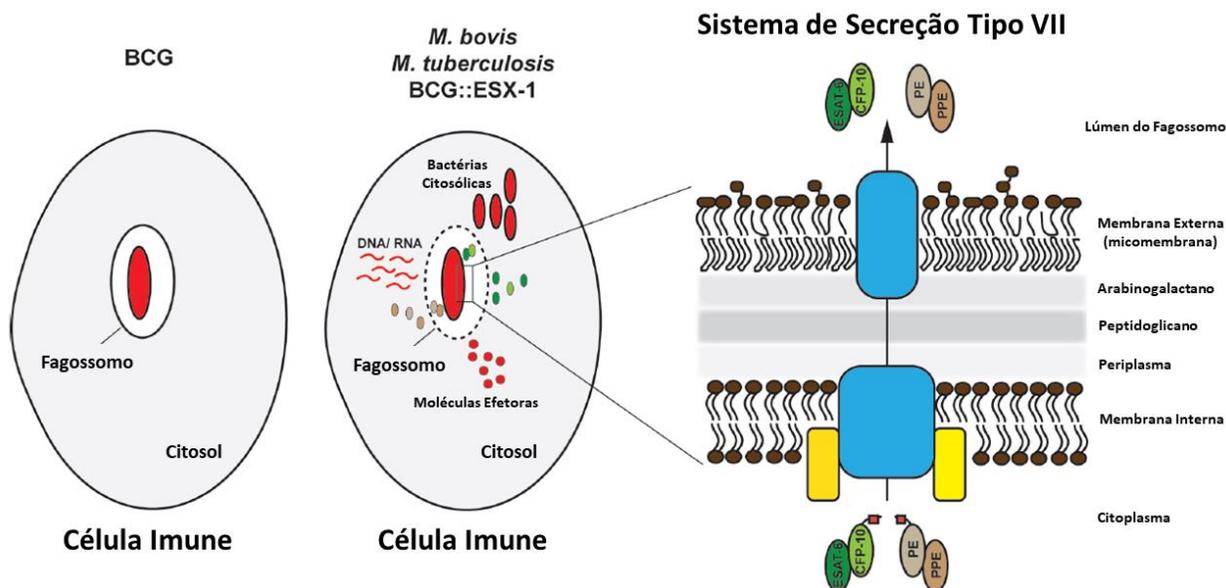


Figura 9. Esquema da expressão do complexo de proteínas ESX-1 com ESAT-6, CFP-10, PE e PPE, pelos MTB e BCG Recombinante. Sigas: CFP=Proteína de filtrado de cultura de 10 kDa; ESAT-6=Alvo antigênico secretado precocemente de 6 kDa; ESX-1=Sistema de secreção de proteínas do tipo 1; PE=Prolina-glutamato; e PPE=Prolina-prolina-glutamato. Fonte: adaptado de [25].

Ambas as proteínas são importantes alvos antigênicos de células T, e são essenciais para a virulência do MTB [21]. A inibição do ESX-1 impede que a micobactéria escape do fagolisossomo após ser fagocitada pelo macrófago, reduzindo a inflamação no sítio da infecção [34]. Para avaliar a virulência da RD1, a inserção desta região deletada foi reintroduzida em uma BCG recombinante, e comparada ao BCG Pasteur, onde dados evidenciaram que a virulência deste BCG recombinante foi maior que a cepa parental em camundongos [37].

Ao longo dos anos, estudos de comparação de resposta imunológica evidenciaram que diversas cepas de BCG têm eficácia [34] e imunogenicidade [38] variáveis, mas a cepa de BCG mais eficiente ainda não foi estabelecida [38]. A distinção entre cepas “Precoces” e “Tardias” coincide com relatos de atenuação contínua de BCG no final da década de 1920 [39], e está correlacionada com a severa redução da produção dos antígenos proteicos MPB70, MPB83 e MPB64 em cepas “Tardias” [40,41]. As cepas genealogicamente mais antigas ou “Precoces”, como o BCG Moreau RDJ distribuído no

Brasil e Polônia, o BCG Rússia distribuído na Rússia e Turquia, e o BCG Japão distribuído no Chile, Japão, Sul da África e Tailândia, garantem perfis distintos de resposta imune [19,30,34].

A análise comparativa do genoma e do transcriptoma indica que o BCG Rússia é uma estirpe antiga mais intimamente relacionada com a estirpe Pasteur original atenuada por Calmette e Guérin [19,26,34]. Algumas alterações genéticas presumivelmente envolvem recombinação mediada por RecA, uma proteína responsável por reparo no DNA e que possui propriedades antigênicas que afetam a proteção e metabolismo do BCG [26]. A RecA é o elemento chave da evolução do genoma micobacteriano, mas não é ativado pela inserção de um nucleotídeo único no BCG Rússia [26]. Essa mutação resulta em uma parada translacional segura e prematura, e muito provavelmente, contribui para a estabilidade do genoma do BCG Rússia [26]. Interessantemente, a estabilidade do genoma dos endossimbiontes obrigatórios de afídeos *Buchnera aphidicola*, também está associada à falta de RecA [26]. Como a mutação RecA resultou em menores alterações genéticas, especulou-se que essa poderia ter mantido o BCG Rússia em um estado 'mais próximo' do BCG ancestral de 1921 [25]. De fato, ao determinar a sequência completa do genoma de um painel de cepas BCG, foi demonstrado que BCG Rússia contém menos SNPs e deleções em comparação com outras cepas do BCG [21,26]. Na comparação entre as vacinas BCG Pasteur e BCG Moreau RDJ, o gene RecA avaliado apresentou similaridade entre as cepas [42]. Entretanto, em ensaios de avaliação da capacidade de deleção de genes específicos, a vacina BCG Moreau RDJ foi capaz de preservar seu material genético, demonstrando uma característica semelhante a cepa BCG Rússia [42].

Outra alteração genética de relevância na geração das cepas da vacina BCG foi a perda da RD2, que contém 10,8 Kb e dividiu os grupos como cepas “Precoces” e “Tardias” [34]. O RD2 possui o gene *mbp64* que codifica a mesma proteína, e sua virulência foi determinada em um estudo onde se inseriu este gene para gerar o MTB H37Rv recombinante, avaliando a sua resposta imune no modelo camundongo nocaute [43]. Esta inserção melhorou alguns parâmetros de resposta imunológica. Entretanto, a mesma não potencializou a proteção frente a TB na infecção *in vivo* [43]. Além disso,

uma diminuição da expressão de outras proteínas nas cepas “Precoces” foi observada, tais como MPB70 e MPB83, que nas cepas “Tardias” apresentam maior expressão [40].

Outro gene pontual na RD14, o qual codifica o MPB1802 e apresenta função de uma proteína reguladora de transcrição, foi observada nas cepas BCG Phipps e Pasteur [21,31]. Estes dados foram avaliados a partir de um ensaio de fusão em seu promotor [31]. A região RD16 também codifica proteínas de regulação transcricional, e foi deletada da cepa BCG Moreau RDJ [34,36].

1.2.3 Imunização da população brasileira.

Por mais de 80 anos, a vacina BCG Moreau RDJ foi utilizada no Brasil nas campanhas de vacinação contra a TB [44]. Segundo a Sociedade Brasileira de Imunização, esta cepa sempre apresentou coberturas vacinais satisfatórias até 2019, com garantia de baixas taxas de casos mais graves de TB infantil [9]. Entretanto, dados do DataSus apresentaram valores preocupantes na cobertura vacinal, com uma queda acentuada pela procura desta vacina entre 2019 e 2021, e que poderia estar relacionada com a pandemia de COVID-19 (Figura 10) [45,46].

Cobertura Vacinal no Brasil da Vacina BCG entre os anos de 2010 e 2021 DataSus

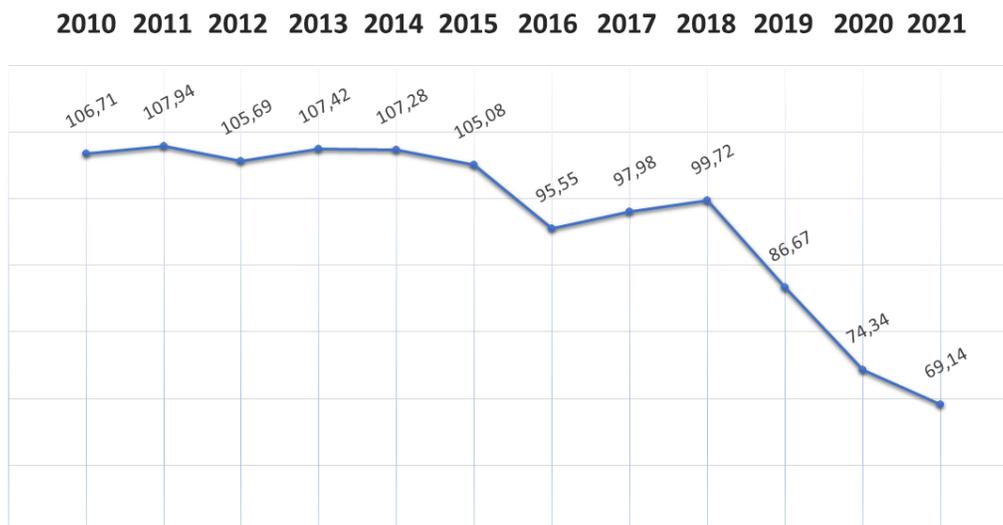


Figura 10. Cobertura vacinal da vacina BCG entre os anos de 2010 e 2021 a partir dos valores estabelecidos pelo DataSus. Fonte: adaptado de [46].

Por ações regulatórias ligadas a ANVISA e implementada em 2018, a Fundação Ataulpho de Paiva (FAP) suspendeu temporariamente a produção da vacina BCG Moreau RDJ, e o Brasil passou a utilizar a cepa BCG Rússia, produzida pelo *Serum Institute of India* (SII), porém sem estudos prévios na população brasileira, e com falta de aprovação de colegiado de pesquisadores em estudos relacionados a este BCG [47]. Segundo o MS, no Boletim Epidemiológico da TB no Brasil em 2018, uma proposta foi publicada afirmando que estudos seriam realizados após a sua implementação e o uso nas crianças brasileiras [48].

Em 2018, a OMS recomendou que a cicatriz vacinal proporcionada pela vacina BCG não poderia mais ser utilizada como parâmetro de proteção [8]. Além disso, mesmo sem o aparecimento da cicatriz, a revacinação com o BCG demonstrou inicialmente não apresentar reativação da resposta imunológica contra a TB [8]. No Brasil, uma nota oficial publicada pelo MS em 2019, formalizou a retirada da revacinação pelo BCG quando não há presença de cicatriz no recém-nascido após a imunização [49]. No entanto, outro

estudo mais recente, realizado na população indiana, mostrou que a revacinação com BCG foi imunogênica, implicando diretamente nas recentes estratégias de saúde pública [50].

Para determinar o padrão de resposta imunológica proporcionado pela vacina BCG, modelos *in vitro* são amplamente utilizados como ferramentas para tentar estudar aqueles fatores envolvidos após a imunização pela forma sistêmica nos modelos de ensaio clínico [6]. Algumas ferramentas *in vitro* nos estudos com modelos humanos de vacina BCG são aquelas que utilizam as células mononucleares de sangue periféricos de adultos (PBMC), de células mononucleares de cordão umbilical de neonatos (CBMC) e de linhagem monocítica (THP-1) [30,51,52]. Importante frisar que o Brasil possui como política de imunização contra a TB, a vacinação precoce com BCG em recém-nascidos [49]. Por isso, as PBMCs advindas de indivíduos da população brasileira apresentam pré-exposição ao BCG desde o seu nascimento. Entretanto, os demais modelos *in vitro*, como a linhagem celular da leucemia monocítica aguda humana THP-1 e as CBMCs, oferecem um perfil de ausência de exposição prévia ao BCG, e permitem averiguar este componente de resposta imunológica pré-exposição às micobactérias. Como já foi visto, a comparação entre o estímulo e o reestímulo apresenta um perfil diferente de resposta imunológica, e essa ainda pode variar quando as cepas da vacina BCG [52].

1.3 Resposta Imunológica

1.3.1 Mecanismo de proteção do hospedeiro

Na gênese das células pluripotentes do sangue, a linhagem do macrófago é originada a partir da célula-tronco mieloide, onde se diferencia para o monócito na corrente sanguínea, e conseqüentemente, se torna macrófago em um tecido, muitas vezes também chamado de histiócito, como por exemplo, o macrófago alveolar dos pulmões, a célula de Kupffer do fígado, dentre outros [53–58].

Em um processo de infecção, as células do hospedeiro expressam sinalizadores bioquímicos que atraem células da imunidade inata para combater inicialmente o patógeno [56]. Quando o monócito recebe esta informação de infecção ainda na corrente sanguínea via quimiocinas e citocinas, se inicia o processo de diapedese, com o rolamento da célula na parede do vaso sanguíneo, para atravessar os espaços entre o endotélio, e seguir para o tecido sinalizador [56,57]. Logo após o recebimento da sinalização e da diapedese, o monócito sofre uma diferenciação, aumenta de tamanho e apresenta um perfil diferente, sendo ativamente fagocítico [56–58]. A fagocitose é a capacidade da célula de englobar outras células ou substâncias para levar para um compartimento intracelular chamado de fagossomo ou vesícula fagocítica, ao mesmo tempo em que outra vesícula é formada, chamada de lisossomo, que contém lisozimas que degradam e digerem substâncias [56,57]. Posteriormente ocorre a fusão dessas duas vesículas para formar o fagolisossomo, onde a ação das lisozimas ocorrerá visando a digestão das células ou substâncias englobadas, gerando como resíduos os peptídeos que serão apresentados pelos macrófagos a outras células do sistema imune, principalmente os linfócitos, para garantir uma resposta imunológica mais específica [15].

O processo de fagocitose ocorre a partir da ligação específica em seus receptores de membrana [19–21]. Essa ligação com proteína da célula alvo ou outras substâncias, torna a ação de alta especificidade, o que permite ao macrófago criar uma estratégia específica para cada ligação dos receptores [15]. Os receptores dos tipos *Toll* (TLR), lectina C (CLR), domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NLR), receptores semelhantes ao gene I (RIG-I) induzíveis por ácido retinóico (RLRs), sensores de DNA citosólicos (CDS), e região Fc de anticorpos, fazem parte do grupo de moléculas que garantem a especificidade da célula e a sua capacidade de criar estratégias diferentes para cada ligação [15,59]. Além disso, outras células imunes, como as células dendríticas (DCs), linfócitos e células “*natural killers*” (NK), também fazem parte do arcabouço de combate ao MTB após seu alojamento no sítio de infecção [3].

A IL-27 é uma citocina heterodimérica da família IL-12, e que é produzida principalmente por APCs [60]. O CD40 é uma molécula coestimuladora de APCs, e que se liga ao B7 ou ao CTLA4, estes presentes em células T [60]. Esta interação está

envolvida no desencadeamento de respostas imunes mediadas por células [60]. A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória secretada por monócitos, macrófagos e DCs [61,62], pode ser potencializada pela IL-22 [62], e está diretamente relacionada com a indução de apoptose, por ativação de NF κ B mediante a ligação de IL-1R2 [61,63].

Além do macrófago, os linfócitos T também são células imunes de importância no processo de proteção contra as infecções por bactérias, vírus e protozoários intracelulares, bem como extracelulares pela expressão de moléculas de sinalização para uma ação de potencialização ou inibição de função [64,65].

Em 1986, os linfócitos T auxiliares (Th) foram identificados por um estudo pioneiro que observou inicialmente duas subpopulações diferentes de linfócitos Th pelas suas expressões de citocinas e marcadores de superfície [64]. A subpopulação classificada como Th1, é induzida por IL-12, IL-25 e IFN- γ , e expressa IFN γ , IL-2 e TNF, com importantes funções antiviral e antibacteriana [64,66,67]. Já a subpopulação classificada como Th2, é induzida por IL-4 e IL-2, expressa IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e é imunologicamente importante contra patógenos extracelulares, como infecções por parasitos [64,66,67]. A IL-33 possui um perfil pró-inflamatório e é expressa em vários tipos celulares, tendo um papel descrito como potencializador dos perfis Th1 e Th2, além de induzir a produção de IL-5, IL-13, GM-CSF e TNF, e potencializar a produção de IFN- γ [68].

Em 1995, os linfócitos Th de regulação (Treg) foram identificados com seu marcador CD25^{high} e um perfil imunossupressor, além de serem induzidos por TGF- β e IL-2, e expressam IL-10, TGF- β e IL-35 [64,67,69]. Em 2005, a subpopulação classificada como Th17 apresentou perfil de proteção, principalmente contra ações bacterianas, sendo induzida por TGF- β e IL-6, com as expressões de IL-12 e IL-23, onde ambas compartilham a subunidade p40, e a expressão de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23 [64]. Além disso, a conversa cruzada entre citocinas, APCs e células Th são descritas como complexas, e ganharam maior profundidade à medida que a plasticidade de células foram descritas, como as Th17 que possuem a capacidade de secretar citocinas dos perfis Th1 e Th2 a partir de indução por outras citocinas (Figura 11) [66,67,70].

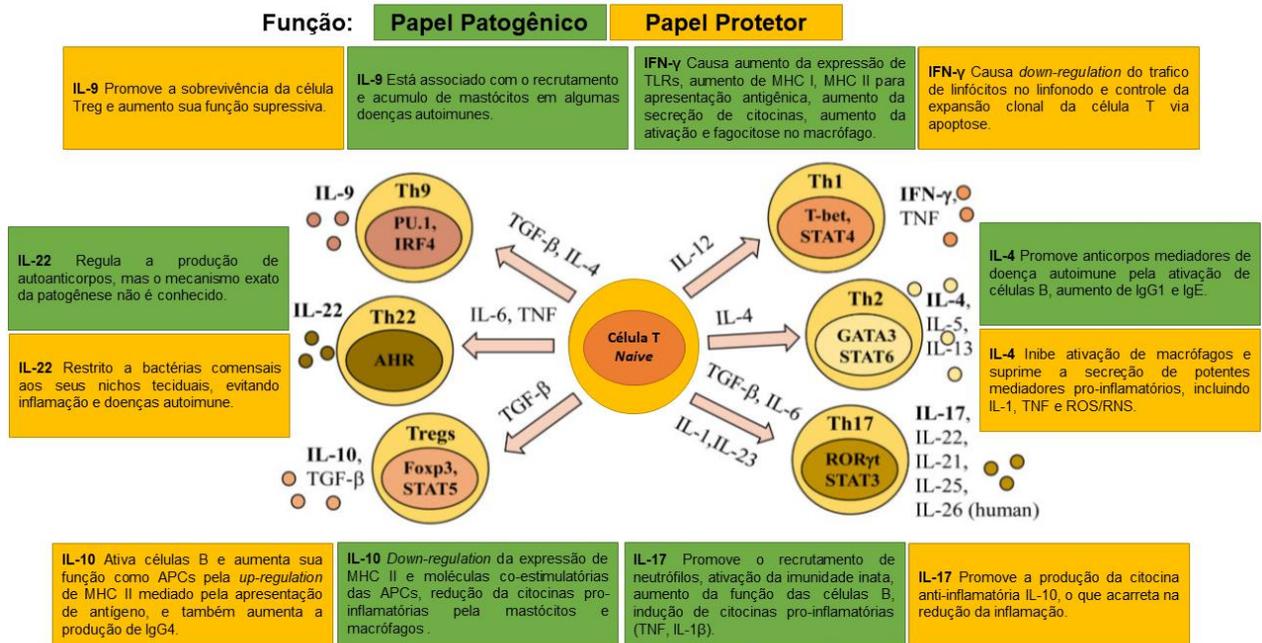


Figura 11. Função, caracterização e diferenciação das subpopulações de células T auxiliares. As citocinas para cada subpopulação são mostradas em negrito. IL-12 induz a expressão de T-bet e diferenciação do perfil Th1, que produz IFN- γ e TNF; A diferenciação de Th2 e a expressão de GATA3 são induzidas por IL-4, levando à produção de IL-4, IL-5 e IL-13, enquanto TGF- β e IL-4 induzem a expressão de PU.1 que causa diferenciação no subconjunto Th9, induzindo a produção de IL-9. O TGF- β induz a expressão de Foxp3, que leva à diferenciação na linhagem Treg; A diferenciação de Th17 é resultado da expressão de ROR γ t induzida por TGF- β , IL-6 e IL-23, levando à produção de IL-17, IL-22, IL-21, IL-25 e IL-26 (humana); IL-6 e TNF induzem AHR, diferenciação do perfil Th22 e produção de IL-22. Siglas: AHR=Receptor de hidrocarboneto arílico; GATA3=Proteína de ligação GATA 3; IFN- γ =Interferon gama; IL=Interleucina; IRF4=Fator regulador de interferon 4; PU.1=Fator de transcrição da família ETS; ROR γ t=Receptor nuclear órfão relacionado ao receptor de ácido retinóico gama; STAT=Transdutor de sinal e ativador da transcrição; T-bet=Codificado pelo gene Tbx21; TGF- β =Fator de transformação do crescimento beta; Th=Células T auxiliares; TNF=Fator de necrose tumoral; e Treg=Células T reguladoras. Fonte: adaptado de [71].

Em 2008, a célula Th9 foi nomeada por Veldhoen e colaboradores (2019), e caracterizada como uma célula secretora de IL-9 a partir da sua diferenciação por TGF β e IL-4 [72]. Além disso, células Th2 secretam IL-9 em suas fases iniciais de diferenciação [72]. Entretanto, na presença somente de TGF β , estas células apresentaram a plasticidade de se diferenciarem para o perfil Th9 [72]. Outros estudos apontaram que IL-21 e TNF também garantem um ambiente favorável para diferenciação da célula Th9,

onde a IL-21 apresentou um perfil de retroalimentação positiva sobre a Th9 na sua indução de diferenciação e aumento de secreção de IL-9 [73,74]. Até o momento, alguns fatores de transcrição foram relacionados as células Th9, como PU.1 pela sua função específica na diferenciação de células Th9 [75–77]. Por outro lado, ambos GATA3 e STAT6 regulam a diferenciação de células Th9 pela diminuição do nível de Foxp3 [78–80]. Já Blimp-1 possui função na repressão do processo de diferenciação de Th9 e a produção de IL-9 [81].

Em 2000, a célula Th22 foi descrita junto da função e caracterização da IL-22 [82]. A identificação do perfil Th22 ocorreu a partir de células Th0 e pela produção de IL-22, e ausência de IFN- γ , IL-4 e IL-17 [83]. A sua diferenciação foi dependente do fator de transcrição do Receptor de Hidrocarboneto Aril (AHR), no qual sua indução levou ao aumento da produção de IL-22, e à diminuição da expressão de IL-17 [83]. Além da IL-22, células Th22 expressaram CCR6, CCR4 e CCR10, o que demonstrou seu papel relevante na ação contra doenças na pele [84]. A IL-22 faz parte das citocinas da família IL-10, a qual é composta por IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26, e atua através de um complexo transmembranar, composto pelas cadeias IL-22R1 e IL-10R2 [83]. Além do perfil Th22, a produção de IL-22 ocorre por diversas outras fontes, tais como células Th1, Th17, T CD8+, células do sistema imune inato, e em resposta à IL-23 [85]. Os tecidos linfoides associados à mucosa, nos quais residem as células NK22, podem produzir a IL-22 [85]. Ademais, a IL-23 potencializa a ação das APCs a produzirem IL-6, e contribui na diferenciação das Th22 ou, juntamente com TGF β , garantem a plasticidade da função Th22 para expressão de IL-22 [85]. Apesar das células Th17 produzirem IL-22, o ambiente proposto por esta células não é favorável à sua autoregulação, pois células Th17 dependem do fator de transcrição ROR γ t, enquanto a expressão de IL-22 requer AHR [85].

Também em 2000, dois grupos de pesquisa se aprofundaram em estudos relacionados ao perfil de células T CD4+, onde observaram que existia uma relação íntima entre algumas células desse grupo, com a potencialização na expressão de anticorpos dos linfócitos B [71,86,87]. Uma nova subpopulação de células Th, residentes das áreas foliculares dos órgãos linfoides e denominada “linfócitos T auxiliares

foliculares” (Tfh), [88]. Os linfócitos Tfh possuem CXCR3, CXCR5, a molécula coestimuladora induzível de linfócitos T (ICOS), a molécula coestimuladora CD40L e a proteína reguladora PD-1 em sua superfície, além do fator de transcrição Bcl-6 [88]. Entretanto, os marcadores supracitados não são específicos desta subpopulação, sendo necessária sua definição a partir da coexpressão por IL-4 e IL-21, pois esta subpopulação não expressa citocinas de perfis Th1, Th2 e Th17 [88]. A IL-21 estimula a proliferação de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos, além de promover também a mudança de classe IgG para IgA nos linfócitos B quando interagem com CD40L [89]. O Bcl-6 inibe a diferenciação dos linfócitos Tfh em Th1, Th2 e Th17 [90], suprime os genes que atuam na diferenciação celular, no controle do ciclo celular, na apoptose e na inflamação, e nos centros germinativos, aquele auxilia na rápida proliferação de linfócitos B em resposta a antígenos T-dependentes, sendo este necessário para a geração de memória, tanto em linfócitos T quanto em linfócitos B [91,92].

1.3.2 Proteção contra Tuberculose.

Os macrófagos são as células imunes que mais se envolvem na patogênese da TB [15,59]. Devido a sua ação fagocítica inicial, com o objetivo de combater o bacilo e apresentar seus antígenos para a formação de uma melhor resposta imunológica, o mesmo acaba sendo o principal hospedeiro para a proliferação micobacteriana intracelular [15,59,93].

Recentemente, Zeng e colaboradores (2022) realizaram uma meta-análise que identificou os perfis de citocinas avaliadas em estudos ao longo dos anos na infecção da TB, a partir de culturas ou biópsias, e comparou estes perfis nas respostas imunes no derrame pleural maligno e tuberculoso [94]. Um perfil inflamatório do tipo Th1 foi predominantemente observado no derrame pleural tuberculoso, com níveis elevados de TNF e IFN γ , em comparação ao derrame pleural maligno, que apresentou um perfil anti-inflamatório do tipo Th2, com níveis elevados de IL-4 e IL-10 [94].

Na TB, a resposta imune do tipo Th1 tem um papel de inibição do crescimento do MTB, através da expressão do IFN γ e outras citocinas, bem como ativação que promove a maturação do fagossomo, para estimular a fagocitose e a produção de intermediários reativos de nitrogênio (RNI) e oxigênio (ROS) [94]. Entretanto, este perfil inflamatório exacerbado proporciona um ambiente favorável ao crescimento intracelular do bacilo, bem como o surgimento de lesão do tecido pulmonar quando há inibição dos mediadores de apoptose pelos macrófagos infectados, aumento da ação fagocítica e atração de outras células no sítio da infecção [3,16,94,95]. Portanto, a apoptose, bem como a redução das citocinas pro-inflamatórias, tem sido apontada como mecanismo estratégico de defesa contra infecções, como a TB [15,16,30,96,97].

1.3.3 Proteção proporcionada pela vacina BCG.

Estudos relacionados à imunologia da vacina BCG são infrequentes, pois pouco se sabe sobre a interação do BCG com monócitos humanos [98]. Os parâmetros iniciais para avaliar a imunidade e eficácia, foram identificar a presença e o tamanho da cicatriz deixada pela aplicação da vacina via reação de hipersensibilidade tardia, ou tipo IV [20]. Porém, estudos divergem sobre as evidências de que esses parâmetros indiquem eficácia ou redução na proteção frente a doença [20,99]. Atualmente, a partir de uma triagem realizada em uma população estudada, foi observado que existe uma influência do teste PPD na avaliação da eficácia do BCG antes da imunização [21,24]. A maior eficácia da vacina foi obtida para recém-nascidos e indivíduos adultos que foram rastreados e negativados pelo teste com PPD [21,24]. O efeito protetor foi de 59% contra TB pulmonar em recém-nascidos, em relação a 74% de indivíduos adultos, mas a proteção média de TB pulmonar foi significativamente reduzida naqueles que apresentaram positividade na prova tuberculínica [21,24]. Esta variação da eficácia imunológica possivelmente seria pelo contato com as variantes externas e internas, como meio ambiente, localidade de moradia, fatores genéticos, antígenos das micobactérias ambientais que expressaram semelhanças e são compartilhados com os da vacina BCG, e pela formação de novas cepas da mesma vacina [34].

Por ser uma micobactéria atenuada, a vacina BCG possui padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como os principais componentes celulares de ácidos micólicos, peptidoglicanos e arabinogalactanos, que são identificados por diversos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células imunes inatas [11]. Desta forma, o sistema imunológico inato funciona como a primeira linha de defesa no enfrentamento de infecções por MTB, pois são os componentes-chave na indução das respostas imunes específicas do hospedeiro no local da infecção [11]. De fato, naquele processo de imunização subcutânea do indivíduo com a vacina BCG, uma rápida indução de resposta imunológica proporcionadas por células residentes, tais como macrófagos residentes [100], neutrófilos [101] e DCs é observada (Figura 12) [102,103].

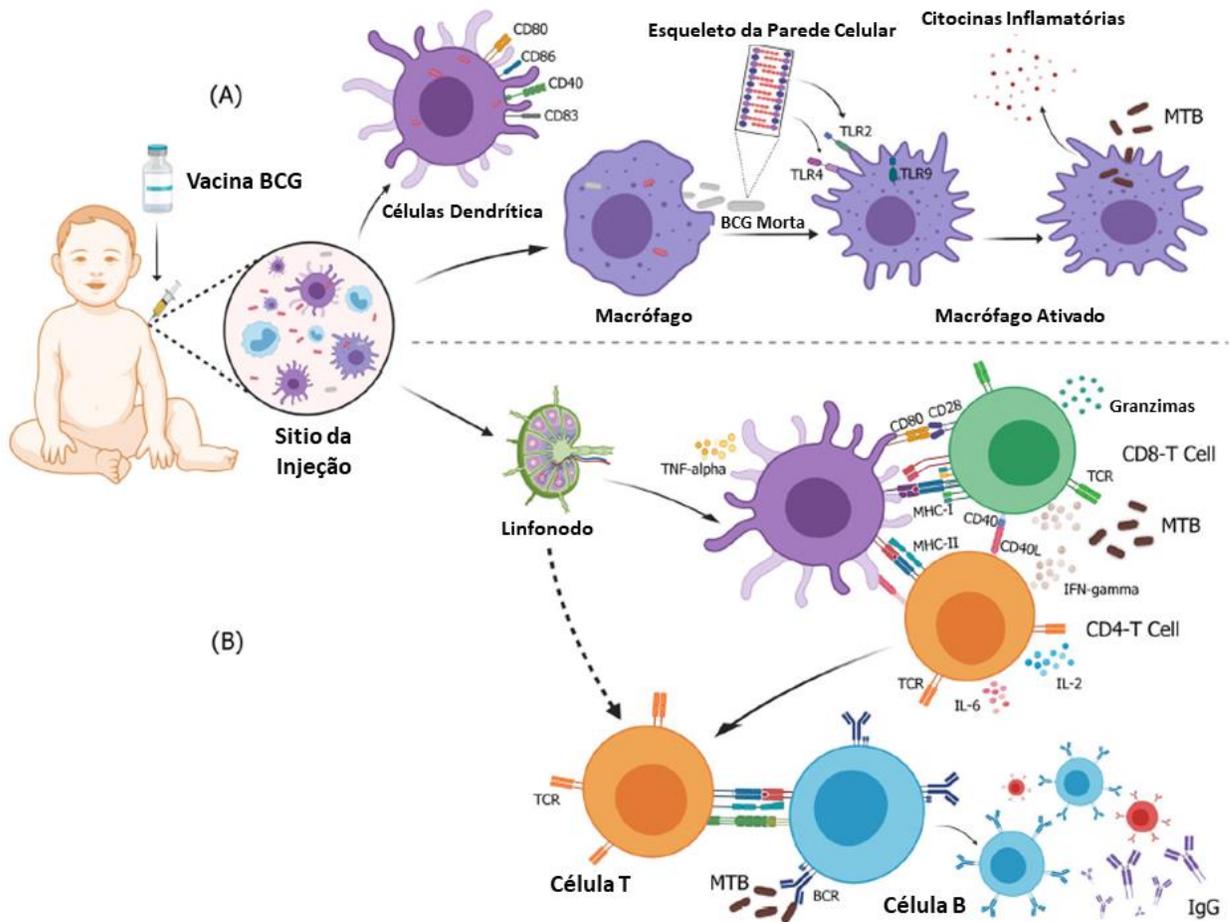


Figura 12. Resposta imune desencadeada após efeitos específicos da vacinação com BCG e pela infecção por MTB. Depois que a vacina BCG é injetada por via subcutânea, monócitos, macrófagos e DCs reconhecem o BCG no local da vacinação, e formam uma forte resposta imune. O BCG é reconhecido e internalizado por DCs ou macrófagos. A parede celular ou outros componentes do BCG atuam como PAMPs que se ligam a diferentes PRRs, regulam positivamente as moléculas coestimuladoras das células e ativam a resposta imune inata anti-TB. Plasmócitos e DCs ativados migram para os linfonodos para ativar células T CD4+ e T CD8+ específicas para micobactérias com um perfil do tipo Th1 e, posteriormente, induzir a secreção de altos níveis de citocinas, como IFN- γ e granzima. Ao mesmo tempo, os plasmócitos que respondem aos antígenos do BCG, levam à ativação de células de memória com anticorpos específicos para antígenos. Siglas: BCG=Bacilo de Calmette Guérin; BCR=Receptor de células B; CD=Grupamento de diferenciação; DC=Célula dendrítica; IFN=Interferon; IgG=Imunoglobulina G; MTB=Mycobacterium tuberculosis; TB=Tuberculose; TCR=Receptor de células T; TLR=Receptor do tipo toll; e TNF=Fator de necrose tumoral. Fonte: adaptado de [103].

Após a imunização com BCG, diversos PRRs são expressos abundantemente na população de células da imunidade inata, tais como receptores de complemento 3 (CR3) [104], TLR2/4/9 [105], receptores de manose [106], receptores de lectina dependente de Ca²⁺ (MINCLE) em macrófagos [107], receptores semelhantes ao NOD/NOD2 em monócitos, CD18, CD32e CD16 em neutrófilos, e DC-SIGN/CD209, CD11c e CD205 em

DCs, iniciando imediatamente a resposta imune inata [11,108]. Além disso, a resposta imunológica proporcionada pela vacina BCG, acarreta na geração de ROS/RNI na população de neutrófilos, induz a liberação de IL-6, TNF, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 e IL-1 α entre 1 e 3 horas [109], proporciona secreção de IL-10 e IL-4 em DCs, e que podem influenciar a resposta imune do tipo Th2, esta última podendo ser a causa da eficácia diminuída do BCG [110].

Em um contexto mais aprofundado da resposta imunológica proporcionada pela vacina BCG, estudos apontaram que a imunização apresenta expansão das células-tronco hematopoiéticas, impulsiona a mielopoiese pela via da reprogramação epigenética e aumenta as respostas imunes protetoras do hospedeiro [111]. Além disso, foi verificado um impacto da vacinação com BCG na indução de modificações de histonas em todo o genoma de monócitos treinados, com geração de IL-1 β e redução da carga do vírus da febre amarela [112]. Brook e colaboradores (2020) identificaram que a vacina BCG proporcionou a indução da granulopoiese de emergência para uma rápida proteção contra a sepse neonatal [113]. Estudos do nosso grupo também corroboraram com aqueles autores quanto ao aumento dos níveis de GS-CSF pela vacina BCG em CBMCs [114].

Até o presente momento, alguns estudos estabeleceram parâmetros para se identificar a proteção contra TB pela resposta da vacina BCG, envolvendo principalmente os perfis inflamatórios e anti-inflamatórios dos linfócitos T CD4⁺ [11]. Estes últimos possuem uma ação significativa contra infecções por MTB, após ativação por componentes da imunidade inata [11]. A indução de respostas imunes dos tipos Th1 e Th17 está ligada positivamente a proteção e melhora clínica em pacientes com TB [11]. A participação importante da resposta imune do tipo Th1 também foi demonstrada em um estudo realizado com bebês vacinados com BCG, onde o perfil Th1 prevaleceu por mais de um ano, em contraste ao perfil Th2 observado em bebês não vacinados [115]. Em estudo *in vivo* com camundongo nocaute para IFN- γ , a imunização com BCG demonstrou proteção contra a infecção por MTB, onde a mesma desapareceu após a depleção de linfócitos T CD4⁺ [116]. Em outros estudos e *in vivo* no modelo murino utilizando patógenos intracelulares, uma forma recorrente de indução das células T CD4⁺

polifuncionais produzindo IFN- γ , TNF e IL-2, revelou um possível correlato de proteção contra infecção e doença [117].

A IL-17 foi descrita como um mediador da proteção contra reinfecções, e na melhora dos resultados clínicos, após a vacinação com o BCG [118]. Além disso, uma correlação dependente da resposta imune do tipo Th1 foi observada em modelo experimental, com o aumento da liberação de IL-17A e IL-23, secretados pelas células Th17 [118]. Outro estudo com modelo de primatas não humanos e vacinação com altas doses de BCG, comparando as vias de imunização intradérmica (ID) e intravenosa, revelou uma proteção contra TB associada as respostas imunes dos tipos Th1 e Th17 [119]. Estes estudos revelaram a relevância do aumento dos perfis Th1 e Th17 na proteção contra a TB [119].

Estudos recentes apontaram que a atenuação da resposta imune das células Treg poderia influenciar no aumento dos perfis Th1 e T CD8+ e, por conseguinte, na proteção contra a TB pelo maior declínio da carga micobacteriana [120]. Entretanto, quando a depleção das células Treg foi precedida da imunização com BCG, aquela não garantiu maior proteção frente ao desafio por MTB virulento, administrado via aerossol, em modelo murino [121].

A IL-10 apresenta um perfil regulatório que, por consequência, resulta na redução da resposta pro-inflamatória contra os bacilos [122]. Isto já foi observado de forma recorrente em estudos que avaliaram a resposta imunológica da vacina BCG em modelos animais [122]. A inibição da ação da IL-10 durante a imunização com BCG, potencializou as respostas imunes protetoras ao induzir os perfis Th1 e Th17 [123]. Porém, quando é super expresso, não apresenta qualquer ação de regulação da infecção frente ao MTB [124].

Os monócitos de indivíduos sadios vacinados com BCG, produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, quando estes são estimulados *ex vivo* com outros patógenos não-relacionados [125]. Há uma reprogramação transcricional, epigenética e metabólica nessas células mielóides primadas, sugerindo que exista uma indução de memória imune inata, e que provavelmente, essas células reprogramadas

residam na medula óssea [112]. Esse mecanismo é denominado imunidade treinada, e o mesmo confere a capacidade da vacina BCG de induzir uma proteção agonística inespecífica contra outras doenças e infecções [126]. A essa característica agonística foi dado o nome de imunidade heteróloga [127].

Ensaio clínico randomizado em população de infantes evidenciaram que a taxa de mortalidade infantil causada por sepse, febre e infecções respiratórias, foi reduzida em crianças vacinadas com BCG ao nascer [128]. Assim, em um estudo comparativo em Guiné-Bissau com 772 crianças menores de cinco anos, foi verificado que aquelas não vacinadas com BCG tinham maior probabilidade de terem infecções respiratórias, as quais são as principais causas de morte neste grupo, comparadas com as crianças imunizadas, reforçando a noção de que a vacina BCG também possui efeitos cruzados ou inespecíficos significativos [129]. Já estudos *in vivo* mostraram que a vacina BCG pode apresentar proteção inespecífica também para doenças virais, como influenza [130] e herpes simplex [130]. Em outro estudo, foi visto que os indivíduos que foram imunizados com a vacina BCG apresentaram menores cargas virais para o vírus amarelo, quando comparados ao grupo placebo [131]. Recentemente, mediante a pandemia de COVID-19, foi questionada a possibilidade da vacinação com BCG promover uma proteção heteróloga contra o SARS-Cov-2, ou mesmo amenizar a sintomatologia dos casos graves da COVID-19, via redução dos níveis de interleucina (IL)-6, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-10 [132].

A vacina BCG também tem se mostrado importante no tratamento de doenças não infecciosas, como o câncer de bexiga e o melanoma, devido a ativação do Receptor do tipo *Toll* (TLR)7 e indução da apoptose em células tumorais [133]. Ademais, estudos já demonstraram que a vacina BCG pode conferir proteção contra doenças alérgicas, como asma [134], doenças autoimunes como diabetes do tipo I [135] e esclerose múltipla [136], apesar de não se saber ao certo por quais mecanismos isso aconteceria [137].

Mesmo com o enorme avanço tecnológico e científico, a pesquisa relacionada a vacina BCG enfrenta limitações pela falta de padronização entre os ensaios utilizados e de parâmetros avaliativos de resposta imunológica [2,5,24]. A variabilidade nos estudos em modelos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos, tornam difícil a determinação do real

mecanismo de proteção proporcionado pela vacina, bem como sua possível melhoria ou substituição [2,5,24].

1.3.4 Morte celular imunogênica

O equilíbrio dos mecanismos de homeostase entre o número de células recém-criadas *versus* o número de células danificadas que necessitam ser removidas é importante, visto que a exposição a danos e o constante desenvolvimento do organismo, tornam mandatório a intensa reposição celular [138]. Assim, a morte celular passou a ser mais bem compreendida quando os patologistas John Foxtan Ross Kerr, Andrew David Hamilton Wyllie e Alastair Robert Currie cunharam o termo apoptose, como uma forma de morte celular programada, com características diferentes das células necróticas [138]. Anteriormente, o padrão de morte celular se subdividia em somente duas modalidades: apoptose e necrose [139]. Na apoptose, se observa encolhimento citoplasmático, condensação da cromatina (picnose), fragmentação (cariorrexe) e formação de proeminências em formato de bolhas na membrana plasmática (*blebbing*), culminando com a formação de pequenas vesículas aparentemente intactas, também conhecidas como corpos apoptóticos [139]. Estes últimos, são fagocitados por células circundantes (eferocitose), e não proporcionam um processo pro-inflamatório exacerbado, pelo não extravasamento irregular de material intracelular [139,140].

O processo de morte celular por apoptose pode ser desencadeado por vários fatores físicos e bioquímicos, onde seu desfecho culmina em candidatos efetores, como o tempo de ativação de caspases e a liberação do citocromo C [141]. Didaticamente, seria possível dividir este processo em duas vias primárias, denominadas apoptose intrínseca e extrínseca [141]. Ao final, ambas convergem na interação mitocondrial, organela de *cross-talk* que conecta a apoptose intrínseca e extrínseca [141]. A apoptose intrínseca é muitas vezes também referida como a via mitocondrial da apoptose, pois, de acordo com sua definição [142], este é um tipo de morte celular regulada e iniciada por perturbações do microambiente extracelular ou intracelular, demarcada pela permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), e inicializada por caspases

executoras, principalmente a caspase-3 [142]. Além disso, e diferente da via extrínseca, a via intrínseca pode ser desencadeada por vários mecanismos, e apresenta como passo decisivo, a liberação do citocromo c no citosol [143–149]. Esta liberação é causada a partir da permeabilização da MOMP, e controlada por membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família das proteínas Bcl-2 [150]. De interesse, os corticoides, incluindo o glicocorticóide fosfato dissódico de dexametasona, prejudicam consideravelmente as respostas linfoproliferativas devido à redução na síntese de IL-2 [151]. Por outro lado, a atividade mitocondrial dependente de proteosoma tem um importante papel regulador na morte celular induzida pela dexametasona. Assim, dados na literatura indicam que a dexametasona, como outros corticosteróides, podem inibir a resposta imunológica T dependente [151]. Além disso, análises citofluorimétricas nestes estudos já demonstraram alterações morfológicas sugestivas de morte celular [152].

Os membros da família Bcl-2 podem ser categorizados em três grupos [153], a saber: (i) grupo composto pelas proteínas BH3, que são, por sua vez, divididas em ativadores (BID, BIM, PUMA), e que se ligam aos membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos das proteínas da família Bcl-2 contendo múltiplos domínios BH [154], e sensibilizadores (BAD, NOXA, BIK, HRK e BNIP3), que se ligam às proteínas antiapoptóticas e, assim, permitem que os ativadores de BH3 causem MOMP [155]; (ii) grupo formado pelos membros carrascos BAX, BAK ou BOK, que permeabilizam a MOMP, permitindo que as moléculas escapem do espaço intermembranar mitocondrial, para o citosol [155]; (iii) grupo com os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, compreendendo o próprio Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Mcl-1 e Bcl-2A1, que antagonizam o MOMP induzido pelos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, e suprimem tanto os ativadores de BH3, quanto as proteínas executoras [156]. A AIF é outra proteína presente no espaço intermembranar das mitocôndrias e mediada por PARP1 [157,158]. Uma vez liberada das mitocôndrias em resposta à sinalização de morte celular, a AIF se transloca para o núcleo, liga-se ao DNA, e causa condensação da cromatina e fragmentação de DNA em larga escala (cerca de 50 kbp) de maneira independente de caspase, induzindo a morte celular por apoptose, denominada *parthanatos* (do grego, 'morte') [157,158].

Com o resultado do MOMP, o citocromo c e SMAC/DIABLO [159,160] são liberados do espaço intermembranar, formam o apoptossoma responsável pela ativação da caspase-9 a partir da ligação de APAF1 e pro-caspase-9, e que quando ativada, a caspase-9 catalisa a ativação proteolítica das caspase-3 e -7 [161]. A SMAC causa apoptose conectando-se a membros da família de proteínas IAP, incluindo XIAP, uma vez que entra no citosol e passa por um processo de maturação proteolítica que libera seu domínio latente de ligação a IAP (Figura 13) [162].

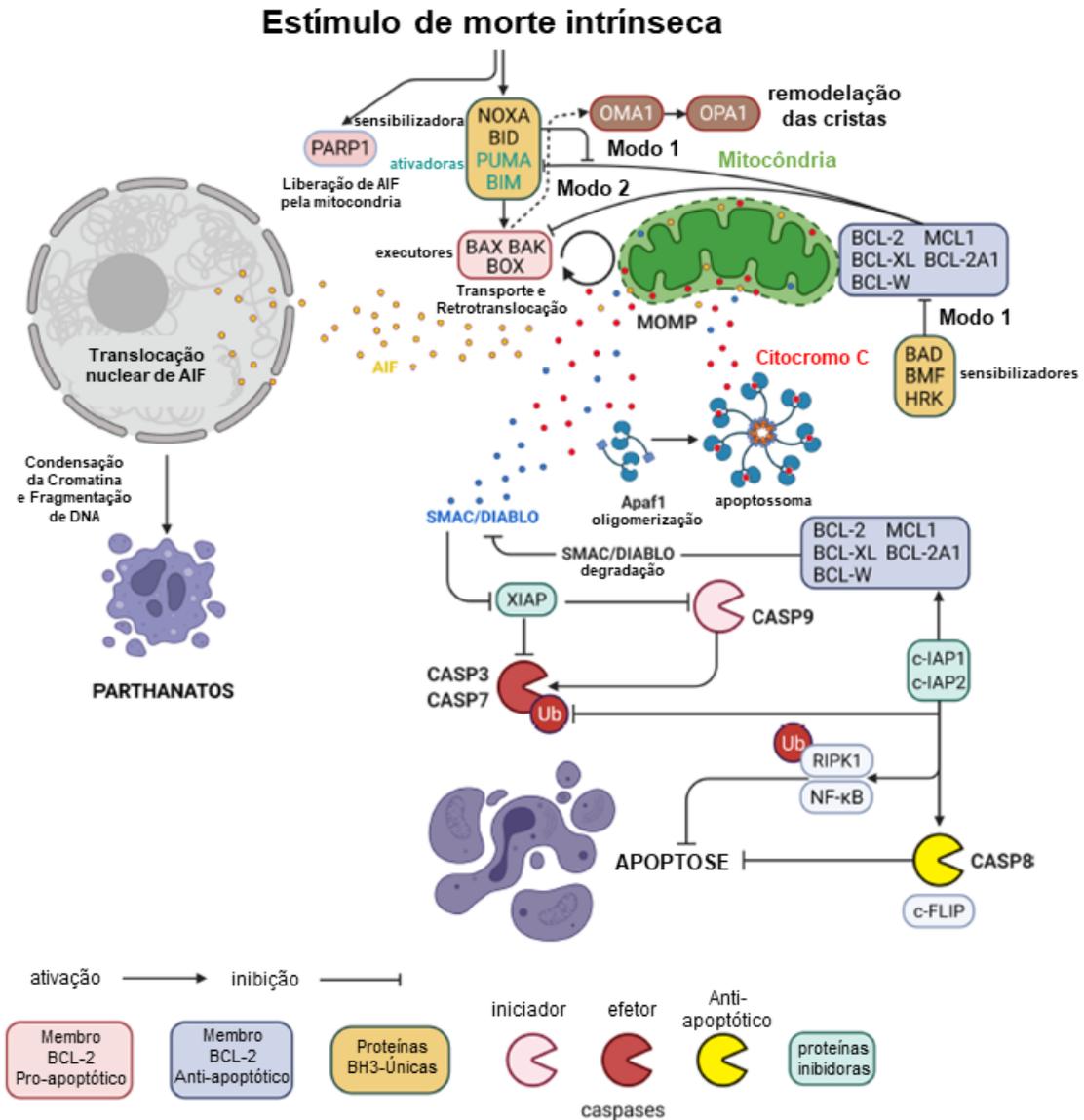


Figura 13. Via da apoptose intrínseca em células de mamíferos. A liberação do citocromo c pela mitocôndria, a partir da permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), desencadeia um dos eventos mais importantes da apoptose intrínseca: a ativação do apoptossoma. Outras proteínas liberadas no citosol por causa do MOMP são a Smac/Diablo, que promove a apoptose indiretamente pela inibição do XIAP, e a AIF, que é responsável pela morte celular por apoptose via *parthanatos*, uma forma de morte celular regulada e independente da ativação da caspase. A apoptose intrínseca é regulada negativamente por c-IAP1 e c-IAP2 por três mecanismos diferentes (no canto inferior direito). Siglas: APAF1=Fator 1 ativado por protease de apoptose; BAD=Promotor de morte associado a Bcl-XL/Bcl-2; BAK=Antagonista/*killer* homólogo de Bcl-2; BAX=Proteína X associada a Bcl-2; BCL-2=Linfoma de células B 2; BCL-2A1=Antagonizar MOMP; BCL-W=BCL-2 tipo 2 (ou BCL2L2, KIAA 0271, proteína fosfatase 1 subunidade regulatória 51, PPP1R51); BCL-XL=Linfoma de células B extra grande (ou BCL-2 tipo 1, BCL-

2L1, Bcl-X, proteína fosfatase 1 reguladora subunidade 52, PPP1R52); BH3=Homologia pró-apoptótica; BID=Agonista de morte do domínio de interação de BH3; BIM=BCL-2L11 (ou BOD, BCL-2 tipo 11, Bcl-2 tipo proteína 11); BMF=Fator modificador de BCL-2; BOX=Matador de ovário relacionado a BCL-2; CASP=Protease específica de cisteinil aspartato; c-FLIP=Proteína celular inibidora de FLICE; c-IAP=Inibidores de proteínas de apoptose; HRK=Ativador de apoptose harakiri (ou HRK, DP5, harakiri, proteína de interação BCL2); MCL-1=Leucemia de células mielóides-1; MOMP=Permeabilização da membrana externa mitocondrial; NF-Kb=Intensificador de cadeia leve do fator nuclear kappa de células B ativadas; NOXA=Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; OMA1=Proteína de metalopeptidase de zinco (ou 2010001O09Rik, DAB1, MPRP-1, YKR087C ou ZMPpeptidase); OPA1=Proteína de atrofia óptica 1; PUMA=Modulador de apoptose regulado positivamente por p53 (ou componente 3 de ligação de BC3, JFY-1, BCL-2); RIPK1=Serina/treonina quinase 1 que interage com o receptor; SMAC/DIABLO=Segundo ativador da caspase derivado da mitocôndria/inibidor direto da proteína de ligação da apoptose com baixo IP; Ub=Ubiquitinação; e XIAP=Inibidor ligado ao X da proteína apoptótica (ou API3, BIRC4, IAP-3, ILP1, MIHA, XLP2). Fonte: adaptado de [141].

A apoptose extrínseca é causada por estímulos externos que podem ativar receptores estruturalmente relacionados [163]. Existem dois tipos de receptores de membrana plasmática que desencadeiam a apoptose extrínseca, a saber: (i) os receptores de morte (DR), que são ativados pela ligação dos ligantes cognatos, e (ii) os receptores de dependência, que são ativados quando os níveis de seus ligantes específicos caem abaixo de um certo limiar [164,165]. Via de regra, os DRs são membros da Superfamília dos Receptores de TNF (TNFRSF), e que contêm um “domínio de morte” intracelular que tem como função, um sítio de ancoragem para outras proteínas pró-apoptóticas, como a proteína adaptadora FADD, formando o DISC ligado à membrana plasmática, que finalmente leva à ativação de caspases [165–169]. Bridgham e colaboradores (2003) classificaram os DRs em duas classes, com base em uma análise evolutiva realizada por eles, a saber: (i) EDAR, p75NTR e TNFRSF21 são membros da primeira classe, desempenhando predominantemente um papel nos processos de desenvolvimento, e (ii) Fas/CD95, TNFR1, TRAILR1, TRAILR2 e TNFRSF25 são membros da segunda classe, e estão amplamente envolvidos na morte celular [170]. Fas/CD95 está localizado na superfície de vários tipos de células. Mecanicamente, Fas liga-se a FasL, forma trímeros, recruta FADD em seu lado citoplasmático, e inicia uma cascata apoptótica [171]. Já TNFR1 é uma proteína que contém um domínio de morte em seu lado citoplasmático [172]. Tanto TRAILR1 quanto TRAILR2, ligam-se a TRAIL e

acoplam proteínas através de um domínio de morte conservado, levando à apoptose [173]. Por outro lado, TRAILR3 e TRAILR4 são receptores ligados à membrana plasmática e sem cauda intracitoplasmática, ou possuindo um domínio de morte intracelular truncado, respectivamente, onde previnem a apoptose mediada por TRAIL [174,175]. O TNFRSF25 interage com a Apo3L, uma proteína transmembranar do tipo II, para ativar a apoptose e o fator de transcrição NF- κ B [176]. Já TNFRSF21 é uma proteína que, quando superexpressa, causa a apoptose, e a sinalização pró-apoptótica induzida pelo TNFRSF21 é única, pois atua independente de FADD, bem como caspase-8 e BID (Figura 14) [177].

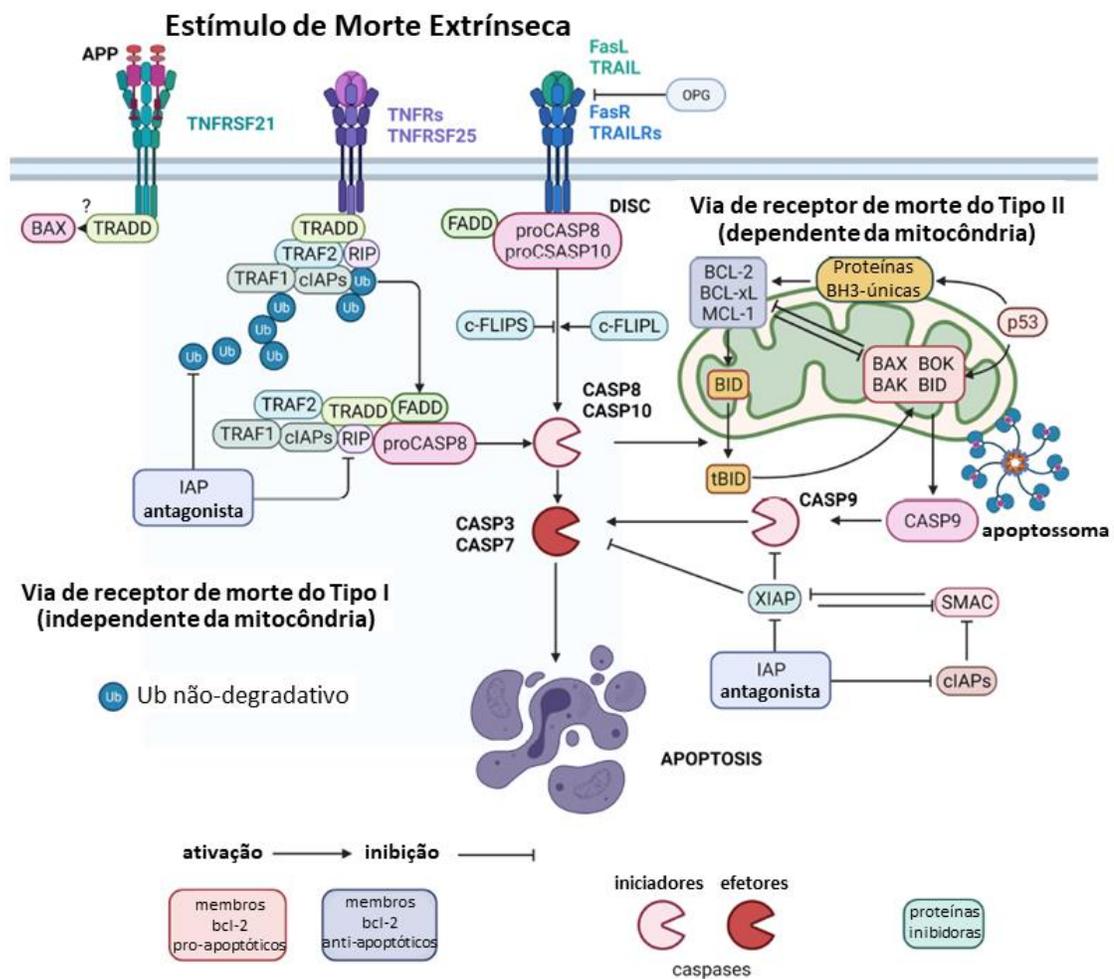


Figura 14. Via da apoptose extrínseca em células de mamíferos. De acordo com os diferentes tipos celulares, esta via segue duas rotas principais. Na via do receptor de morte do tipo I, as células sofrem

apoptose sem a intervenção mitocondrial, enquanto no tipo II, há uma convergência para a via mitocondrial após a ativação do BID pela caspase-8. Alguns membros do TNFRSF (por exemplo, Fas e TRAILRs) desencadeiam a apoptose, ligando-se diretamente à proteína adaptadora FADD, enquanto outros (por exemplo, TNFRs e TNFRSF25) inicialmente se ligam a proteína adaptadora TRADD e, portanto, a FADD é recrutada indiretamente. Em ambos os casos, a caspase-8 (ou caspase-10) iniciadora é eventualmente ativada. Siglas: APP=Proteína precursora de β amilóide; BAK=Antagonista/*killer* homólogo de Bcl-2; BAX= Proteína X associada a Bcl-2; BCL-2=linfoma de células B 2; BCL-xL=Linfoma de células B extra grande (ou BCL-2 tipo 1, BCL-2L1, Bcl-X, proteína fosfatase 1 reguladora subunidade 52, PPP1R52); BH3=Homologia pró-apoptótica; BID=Agonista de morte do domínio de interação de BH3; BOK=Matador de ovário relacionado a BCL-2; cIAPs=Inibidores de proteínas de apoptose; DISC=Complexo de sinalização indutor de morte; FADD=Proteína associada a FAS com domínio de morte; FasL=Ligante de antígeno de superfície associado a FS-7; FasR=Receptor de antígeno de superfície associado a FS-7 (ou CD95 ou APO-1); IAP=Inibidores de proteínas de apoptose; MCL-1=Leucemia de células mielóides-1; OPG=Osteoprotegerina; p53=Gene com controle do ciclo celular e reparo do material genético; proCASP=Indutor da protease específica de cisteinil aspartato; RIP=Serina/treonina-proteína quinase; SMAC=Segundo ativador da caspase derivado da mitocôndria/inibidor direto da proteína de ligação da apoptose com baixo IP; tBID=Agonista de morte do domínio de interação de BH3; TNFR=Receptor do fator de necrose tumoral 1 (ou TNFRSF1A); TNFRSF21=Superfamília de receptores do fator de necrose tumoral 21 (ou DR6); TNFRSF25=Superfamília de receptores de fator de necrose tumoral 25 (ou DR3); TRADD=TNFRSF1A associado via domínio de morte; TRAF=Fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (ou EBI6, MGC: 10353, receptor de TNF); TRAIL=Ligante indutor de apoptose relacionada a NF (ou ligante APO2); TRAILRs=Receptores de ligante indutor de apoptose relacionada ao TNF 1 (ou TNFRSF10A, DR4); Ub=Ubiquitinação; XIAP=Inibidor da proteína de apoptose ligado ao X (ou API3, BIRC4, IAP-3, ILP1, MIHA, XLP2). Fonte: adaptado de [141].

A necrose é geralmente caracterizada como a morte celular por extravasamento de membrana plasmática, e ocorre após um estresse grave, resultando em derramamento do conteúdo da célula para os tecidos circundantes e danos subsequentes [139]. A piroptose é um outro tipo de morte celular que envolve a IL-1 β e a IL-18, a partir de uma morte celular lítica e dependente de Caspase-1, induzida por sinais pró-inflamatórios associados com o inflamassoma, e caracterizado por formação de proeminências em formato de bolhas no citoplasma, ruptura da membrana plasmática e liberação de material intracelular para o meio extracelular [178]. Além disso, a Necroptose é outro tipo de morte celular, causada pela redução da integridade da membrana plasmática, com interação do receptor kinase 3 (RIPK3), mediada pela fosforilação do

domínio tipo pseudocinase (MLKL/pMLKL), onde se observa um edema celular, ruptura de membrana plasmática, retenção da integridade nucleica e citoplasma translúcido [178].

A partir de 2005, o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular se reuniu e formulou diretrizes para a definição e interpretação da morte celular a partir de perspectivas morfológicas, bioquímicas e funcionais [139,140]. Estes apontamentos definiram várias outras formas de morte celular, tais como: (i) anoikis ou morte celular acidental, (ii) autose ou morte celular dependente de autofagia, (iii) ferroptose ou morte celular entótica, (iv) morte celular dependente de lisossomo, (v) necrose dirigida por transição de permeabilidade mitocondrial, (vi) catástrofe mitótica, (vii) morte mitótica, (viii) necroptose, (ix) morte celular NETótica, (x) *parthanatos* e (xi) piroptose (Figura 15) [139,140].

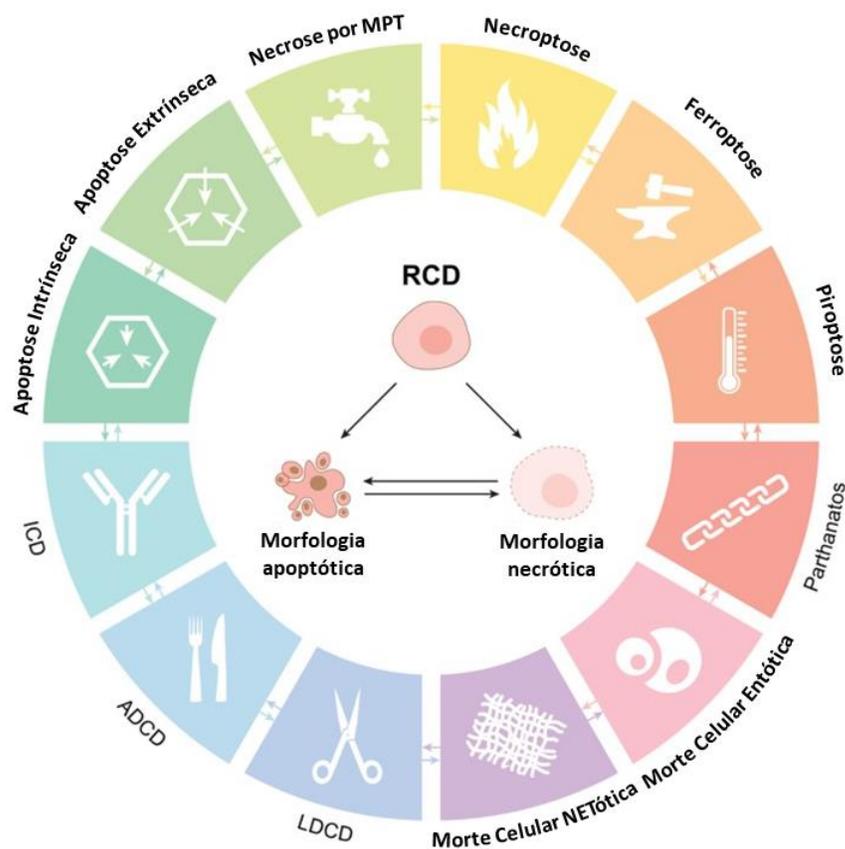


Figura 15. Principais subdivisões de morte celular. Cada um desses padrões de morte celular regulada (RCD) é iniciado e propagado por mecanismos moleculares que exibem grau de interconectividade. Além

disso, cada tipo de RCD pode se manifestar com todo um espectro de características morfológicas que variam de totalmente necrótica a totalmente apoptótica, e um perfil imunomodulador que varia de anti-inflamatório e tolerogênico a pró-inflamatório e imunogênico. Siglas: ADCD=Morte celular dependente da autofagia; ICD=Morte celular imunogênica; LDCD=Morte celular dependente de lisossomo; MPT=Transição da permeabilidade mitocondrial. Fonte: adaptado de [140].

Estudos de marcadores de padrão de morte celular regulada (RCD) têm sido comumente utilizados para a detecção de níveis de apoptose em populações mistas de células [5]. Com a utilização da citometria de fluxo, a Anexina V acoplada a fluorocromos é uma molécula que possui alta afinidade por fosfatidilserina, sendo esta encontrada no folheto interno da bicamada lipídica da membrana plasmática celular, que no momento de indução de morte celular por apoptose, é externalizada e assim, marcada [179]. O iodeto de Propídeo (PI) possui fluorescência própria, e comumente também é utilizado como marcador de padrão de morte celular por necrose pela técnica de citometria de fluxo [180]. Durante o processo de necrose, existe a perda de seletividade na membrana plasmática pela formação de poros, os quais permitem a entrada do PI e ligação no material genético, por sua alta afinidade ao se intercalar ao DNA [181].

A RD1 foi descrita como responsável pela atenuação do BCG devido a inibição da fusão do fagolisossomo e indução de morte celular por apoptose [15,20,34,59]. Esta apoptose tem o potencial de ser capaz de gerar corpos apoptóticos contendo componentes imunogênicos do bacilo processado pela fagocitose, os quais sofrerão eferocitose pelas DCs, garantindo a resposta imunológica eficaz a longo prazo via “*cross-priming*” e apresentação cruzada [51,182,183]. Portanto, o padrão de morte celular apropriado seria importante na defesa contra a micobactéria virulenta, podendo se relacionar as células infectadas em apoptose induzindo uma diminuição da viabilidade, da patogenia e o aumento da eficiência vacinal [30].

Os monócitos e os macrófagos são APCs que possuem funções críticas na indução de apoptose, assim visando a redução dos danos teciduais da TB [16,184]. A literatura relata que a apoptose de células hospedeiras infectadas com micobactérias facilita a apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T, através de MHC-I e CD1 [185]. Assim, uma vacina composta por vesículas apoptóticas purificadas de macrófagos infectados com o BCG, foi capaz de proporcionar melhor proteção contra a

TB em comparação ao BCG parental em modelo camundongo [186]. Esta melhora foi associada ao aprimoramento do *cross-priming*, mediado pela interação de DCs com células T CD8+, assim denominado “*via Detour*” [186].

Outras evidências de que a apoptose poderia estar relacionada a uma melhor proteção frente a TB, foram demonstradas em estudos que compararam a eficácia da vacina BCG em relação as cepas recombinantes, tais como: (i) o BCG recombinante Δ ureC hly +, em comparação com a cepa parental, apresentou melhor proteção contra o MTB, a partir do mecanismo de *cross-priming* [187]; (ii) a vacinação com as cepas mutantes Δ secA2 Δ lysA e Δ nuoG de MTB desencadeou níveis mais elevados de apoptose, quando comparado aos animais imunizados com BCG, resultando em melhor proteção contra a infecção por MTB [188,189]; (iii) a imunização com a vacina de DNA co-expressando o Ag85A e a caspase-3 pró-apoptótica humana, aumentou a proteção contra a infecção por MTB, quando comparada a imunização com a vacina de DNA que codifica apenas o Ag85A [190]; e (iv) a cepa rBCG que expressa a proteína pró-apoptótica humana BAX, também desencadeou a apoptose de macrófagos e induziu de forma predominante uma resposta imune do tipo Th1, quando comparado a imunização com o BCG parental [191]. Já a administração do BCG com o inibidor MK-2206, aumentou a apoptose de APCs em linfonodos, fato que permitiu a melhora das respostas imunes de células T efectoras CD4⁺ e CD8⁺ induzidas por BCG, além de reforçar a capacidade desta vacina de induzir células T de memória central [192]. Além disso, a coadministração do MK-2206 evidenciou o fortalecimento da proteção pelo BCG contra o MTB em modelo de animal infectado com aerossol, a partir da ativação de FOXO3, um fator de transcrição regulado negativamente pela treonina quinase, ativada pró-sobrevivência Akt, induz o aumento de apoptose em células hospedeiras e anulação da secreção de IL-10 [192]. Outros estudos daquele grupo, demonstraram que a IL-10 regula negativamente a resposta imune adaptativa frente à infecção por micobactérias, o que culmina no impedimento das funções de macrófagos e DCs [193,194].

A literatura evidencia que há semelhança no padrão de morte por apoptose, mas heterogeneidade nos níveis e danos teciduais do pulmão do hospedeiro na proteção proporcionada pelas vacinas com MTB avirulento [195], BCG [30] e por BCG

recombinante [196]. Estudos do nosso grupo compararam os níveis de apoptose de cepas irmãs, e revelaram que o BCG Moreau RDJ induz níveis mais elevados de apoptose, do que as cepas BCG Pasteur e BCG Dinamarquesa [30].

1.3.5 Diferença na resposta imunológica entre as cepas da vacina BCG

Em 2012, a vacina BCG Moreau RDJ foi aprovada pela OMS como uma das cepas de referência mundial, junto a Dinamarquesa, a do Japão e a Rússia, a qual vinha sendo produzida pela FAP, sendo considerada uma das cepas de BCG mais imunogênicas no mundo, e possuindo o menor índice de reações adversas [197]. Na comparação *in vitro* da vacina BCG entre as cepas Moreau RDJ, Pasteur e Dinamarquesa, divergências na indução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias [30]. Isto nos permitiu levantar a hipótese de que as variações da proteção contra a TB poderiam também estar relacionadas as diferentes formas de indução de resposta pro-inflamatória e antimicobacteriana que as cepas proporcionam. Neste sentido, em um estudo recente de comparação entre as cepas BCG Moreau RDJ e BCG Rússia, avaliou-se os níveis de citocinas pro-inflamatórias, e geração de cicatriz vacinal em grupos de recém-nascidos ao longo de 12 semanas [198]. Naquele estudo, divergências de resposta imunológica proporcionadas pelas cepas também foram comprovadas: o BCG Moreau RDJ induziu níveis elevados de IL-2, IL-10 e IL-4, sendo que o BCG Rússia induziu níveis elevados de IL-2 e IFN- γ [198]. Infelizmente, poucos dados clínicos foram coletados quanto a resposta cicatricial proporcionada por ambas as cepas, alegado pelo difícil acesso as mães responsáveis pelos recém-nascidos participantes da pesquisa [198]. Entretanto, o estudo sugeriu que o BCG Rússia apresentou cicatrizes mais leves do que o BCG Moreau RDJ nos indivíduos imunizados [198].

Um estudo sumarizou os dados da redução da taxa de mortalidade proporcionada por inúmeras vacinas, em diferentes modelos experimentais, administradas em diferentes países, com o objetivo de evidenciar mudanças no paradigma de avaliação da eficácia das vacinas [199]. Os resultados demonstraram que o BCG Rússia garantiu 2% de redução na taxa de mortalidade infantil na Índia, em 2019 [199]. Entretanto, o BCG

Dinamarquês proporcionou uma redução maior e em torno de 38% na população infantil da Guiné-Bissau, em 2017, e 64% em outro estudo de 2010 [199]. Estas diferenças de proteção também foram vistas em um estudo que mapeou, quantificou e agrupou países que apresentavam altas incidências de TB com diferentes cepas utilizadas na campanha vacinal, sendo observado o BCG Rússia com 14 países, e os BCG Dinamarquês e BCG Japão com três países cada [200].

Como um todo, as cepas da vacina BCG apresentam divergências na indução de resposta imunológica do hospedeiro. Ao longo dos anos e após a distribuição inicial em 1924, as suas características genéticas e bioquímicas adquiriram diferenças até o momento da padronização da manufatura da vacina no processo de subcultivos do lote semente até o envase. Após a autorização do MS e desde a entrada da cepa BCG Rússia no Programa Nacional de Imunização (PNI), esta nunca testada na população brasileira, abriu-se um precedente para se realizar estudos comparativos com a cepa BCG Moreau RDJ. Portanto, utilizar-se de parâmetros descritos para comparar a resposta imunológica entre as cepas da vacina BCG na mesma população de estudo, poderá proporcionar conhecimentos inéditos para área da vacinologia no combate a TB, bem como para a saúde pública e para a população de forma geral, que recebe esta imunização em recém-nascidos e nas campanhas vacinais do PNI.

1.4 Justificativa

Esta dissertação tem como meta principal a identificação *in vitro* dos parâmetros imunes entre as cepas Russia e Moreau RDJ da vacina BCG em monócitos humanos. Esta abordagem pode ajudar na concepção de novas intervenções profiláticas, bem como terapêuticas, seguras contra a TB. Desde 2007 nosso grupo vem se dedicando a estudar a resposta imune celular frente a TB em amostras clínicas humanas obtidas, principalmente, de indivíduos da região metropolitana do Rio de Janeiro. Este último é um dos estados que apresentou as maiores taxas de incidência de TB em 2019, sendo esta, de 66,3 casos/100 mil habitantes [9].

Com altas taxas de incidência, prevalência, morte e abandono ao tratamento contra a TB, a busca por entendimento do *modus operandi* e das melhorias na vacina BCG se tornam necessárias e fundamentais para o combate a essa doença [4]. Em um período de mais de dois anos, a cepa BCG Russia foi introduzida na caderneta vacinal dos recém-nascidos e nas campanhas de vacinação contra a TB e de contactantes de hanseníase [48]. Porém, mesmo sendo próxima geneticamente à cepa BCG Moreau RDJ aplicada por mais de 80 anos no Brasil, a cepa BCG Russia apresenta baixas taxas de proteção contra a TB em outros países, e nunca foi estudada na população brasileira [48].

Os parâmetros comumente vistos para determinar e comparar o nível de resposta imune proporcionado pela vacina BCG são o padrão de morte celular e os perfis Th1, Th2, Th17 e Treg [14,25,115,116,185,186]. Estudos que realizaram o mapeamento genético das cepas da vacina BCG encontraram divergências entre elas [19,21,31,34,95,201]. Estas divergências também foram evidenciadas em estudos epidemiológicos [199] e de marcadores de resposta imunológica [30,96,112,119,196]. Além disso, o mecanismo de indução de apoptose e a causa da variabilidade entre as cepas da vacina BCG ainda não são totalmente conhecidos [30].

Desvendar o mecanismo de proteção da vacina BCG e onde ocorrem divergências entre as cepas, será um importante passo para uma possível melhoria dessa vacina, garantindo uma nova perspectiva nas estratégias de combate e proteção contra a TB.

Portanto, estudos em coortes brasileiras que determinem e comparem o padrão de morte celular e os perfis de citocinas entre as cepas Moreau RDJ e Russia da vacina BCG em um modelo *in vitro* com células mononucleares humanas, se justificam como premissa de entendimento dessa vacina secular.

Assim, a hipótese do presente trabalho é que **a vacina BCG Moreau RDJ possui um perfil mais imunomodulador que a vacina BCG Russia, a partir da determinação dos níveis de indução de morte por apoptose, por necrose e por secreção de citocinas.**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar e comparar parâmetros relacionados à resposta imunológica entre as cepas Russia e Moreau RDJ da vacina BCG em um modelo *in vitro* em células mononucleares humanas de culturas primária e de linhagem.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar os níveis de padrão de morte celular por apoptose e necrose das células mononucleares humanas pós ensaio de infecção com diferentes cepas da vacina BCG, através do método de citometria de fluxo.
- Detectar os níveis de citocinas em sobrenadante das células mononucleares humanas pós ensaio de infecção com diferentes cepas da vacina BCG, através dos métodos de ELISA e/ou de Luminex.
- Analisar comparativamente por correlação os níveis de padrão de morte celular por apoptose e necrose, com aqueles de citocinas em sobrenadante das células mononucleares humanas, pós ensaio de infecção com diferentes cepas da vacina BCG.
- Padronizar a quantificação a nível molecular, dos principais componentes das vias de apoptose intrínseca (BAD, BID, BAX, BIM, BAK, Bcl-xL, MCL-1, NOXA, PUMA e TRAF-2) em células mononucleares humanas pós ensaio de indução de morte celular com dexametasona, através do método de qRT-PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

As amostras clínicas deste estudo foram compostas de subprodutos do sangue venoso periférico na forma de 50mL de “*buffy-coat*” (bolsas de sangue total anticoagulado, contendo na maior parte leucócitos e plaquetas) de indivíduos adultos saudáveis (>18 anos), via doações anônimas, espontâneas e voluntárias. As amostras foram processadas e cedidas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (SH-HUCFF). Todas as amostras biológicas disponibilizadas receberam um código de rastreabilidade interno do SH-HUCFF após a testagem para patologias descritas pelo MS, e foram disponibilizadas à equipe de pesquisa sem o compartilhamento de informações referentes a dados pessoais e demográficos, mediante ao termo estabelecido e assinado pelo participante da pesquisa no ato da coleta.

Este projeto conta com as aprovações dos Comitês de Ética em Pesquisa do SH-HUCFF (protocolo # 357750145.0.0000.5258) e do IOC-Fiocruz (protocolo # 357755014.0.00005248). Todas as amostras, informações e resultados dos participantes, bem como sua coleta, armazenamento, manuseio e divulgação de resultados, seguirão os aspectos éticos que envolvem seres humanos descritos na Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012.

3.2 Cultivo de células de linhagem THP-1

A linhagem celular da leucemia monocítica aguda humana THP1 utilizada no estudo foi comercializada pelo *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA), e foi provida do acervo e estoque em nitrogênio líquido do Laboratório de Imunologia Clínica (LIC) para seu descongelamento e cultivo (TIB-202, ATCC). Para manter a integridade celular durante as mudanças agressivas de temperatura (de 37°C para -196°C), as células foram comumente armazenadas com soro fetal bovino (SFB - Sigma

Immunochemicals, EUA) e 10% Dimetilsulfóxido (DMSO - Thermofisher, EUA). Assim, após retirar os criotubos (Corning, EUA) de dentro do nitrogênio líquido, as células foram descongeladas de forma natural, em temperatura ambiente (TA), até conter ~70% de sua composição líquida, apresentando uma pedra de gelo para manter a temperatura mediana. Após o descongelamento, as células de linhagem THP-1 foram passadas para um tubo de 15 mL (Falcon, EUA) contendo o dobro de seu volume em SFB, dentro de uma cabine de segurança biológica do tipo NB-2, para evitar a contaminação da cultura. Após centrifugação em 25°C, 350 x G, por 10 minutos, as células foram lavadas em meio RPMI-1640 (Sigma Immunochemicals, EUA), formando por fim o pellet no fundo do tubo. Após o descarte do meio, as células no fundo do tubo foram ressuspensas para soltar o pellet, e assim, livre do DMSO e totalmente em TA, o meio com o suplemento de 10% SFB foi adicionado, no volume final de 10 mL. As células de linhagem THP-1 foram passadas para uma garrafa de cultura de 50 mL (Corning, EUA) e deixadas na estufa, com o ambiente úmido de 37°C, em 5% de CO₂, até o momento do ensaio de infecção.

3.3 Purificação e cultura das células mononucleares humanas de sangue periférico (PBMC)

A partir do recebimento da amostra biológica do adulto sadio, o processo de separação do anel leucocitário do restante dos constituintes foi realizado. Dentro da cabine de segurança biológica do tipo NB-2, cerca de 20 mL da amostra foi passada para um tubo de 50 mL, e acrescentado 20 mL de PBS estéril (LGC-Biotecnologia). Em outro tubo vazio, 10 mL de Ficoll-Histopaque (Sigma Immunochemicals, EUA) foi adicionado, para que de forma delicada, os 40 mL da amostra diluída com PBS fossem adicionados, a fim de não haver mistura entre o Ficoll e a amostra diluída. Logo de imediato, o tubo foi centrifugado em 25°C, 400 x G, por 25 minutos, sem freio, para separar o anel leucocitário dos demais componentes, e este posteriormente ser retirado com o uso da Pipeta Pasteur. Após a retirada do anel leucocitário, com o uso da Pipeta Pasteur, este foi ressuspensado e lavado duas vezes com PBS a 4°C, 350 x G, por 10 minutos.

3.4 Manutenção, contagem e determinação da viabilidade das culturas THP-1 e PBMC

A THP-1 é uma linhagem celular não aderente, e por isso sua passagem para um novo meio ocorre diretamente pela transferência de célula de uma garrafa para outra ou após centrifugação. O meio RPMI-1640 usado para o cultivo, possui um indicador de pH, que apresenta cor rosada em meio fisiológico, pelo vermelho de fenol. Porém, quando as células já metabolizaram os nutrientes, o meio de cultura apresenta um pH acidificado, de cor laranja-amarelada, sendo indicativo de alta proliferação celular, com a necessidade de ser renovado. Desta forma, a linhagem THP-1 foi transferida da garrafa de cultura, para um tubo de 50 mL, e centrifugada a 25°C, 350 x G, por 10 minutos, para formação do pellet. O tubo apresentou uma solução heterogênea, com as células na parte inferior e o meio de cor amarelada, na parte superior. Assim, o meio foi descartado, e depois as células foram ressuspensas com meio suplementado RPMI-1640/SFB no volume final de 10 mL.

Para a determinação da concentração e viabilidade das culturas, as células foram colocadas em um microtubo na mesma proporção de 20 µL com Azul de Tripán (Sigma Immunochemicals, EUA) e adicionada na Câmara de Neubauer. No microscópio óptico, as células coradas (não viáveis) e as não coradas (viáveis) foram visualizadas. Os quatros campos laterais foram contados, o valor resultante da soma dos campos foi dividido por quatro para determinação da média, o valor final foi multiplicado por dois (fator de diluição) e, por fim, incluído no fator de correção da câmara de Neubauer de 10⁴/mL.

3.5 Ensaio de infecção de células mononucleares com as cepas da vacina BCG

As cepas Russia (Ambulatório Souza Araujo – ASA, Brasil) ou Moreau RDJ lote #1 e lote #2 (FAP, Brasil) da vacina BCG foram (i) descongelada do acervo e estocada em glicerol a -80°C, ou (ii) reconstituída em PBS, para os ensaios de infecção das células mononucleares humanas em cultura. As PBMCs foram separadas em tubos de polipropileno (Corning, EUA), na concentração de 1x10⁶ células/mL, em meio RPMI-

1640 com 10% de SFB, onde ocorreram ambas as infecções em MOI 2:1 pelo BCG Russia ou pelo BCG Moreau RDJ, nos tempos de 16 e 48 horas, na estufa úmida com 37°C e CO₂, a 5.0%.

As células de linhagem THP-1 sofreram uma abordagem diferente, devido a sua capacidade proliferativa. Estas células foram separadas em tubos de polipropileno na concentração de 4x10⁵ células/mL em meio RPMI-1640/SFB, sendo que os tubos foram infectados com o MOI 2:1 pelo BCG Russia ou pelo BCG Moreau RDJ, nos tempos de 16 e 48 horas, na estufa úmida com 37°C e CO₂ a 5.0%. A escolha do MOI e tempo de incubação partiram de estudos realizados anteriormente, resultantes em melhores valores representativos para o experimento corrente [30]. Os tubos controles negativo e positivo foram compostos de células apenas, nas condições descritas acima, ou células aquicidas em banho maria, a 100°C, para indução de morte por necrose, respectivamente. Para o controle positivo de morte celular por apoptose, o glicocorticóide fosfato dissódico de dexametasona (Hypofarma, Brasil) foi utilizado na concentração de 100 µM, onde as culturas permaneceram estimuladas por 16 e 48 horas.

Após o estímulo, as culturas foram centrifugadas a 25°C, 350 x G, por 10 minutos, e os sobrenadantes foram retirados, aliquotados e congelados a -20°C, visando os ensaios de detecção de citocinas, o pellet prosseguiu para os ensaios de detecção de expressão gênica por qRT-PCR, e avaliação do padrão de morte celular por citometria de fluxo.

3.6 Detecção de níveis de apoptose e necrose a partir da marcação das células para a citometria de fluxo

As células mononucleares, após o ensaio de infecção por 48 horas previamente descrito, foram lavadas em PBS e marcados com o tampão de cálcio diluído 10 vezes em água destilada, para a detecção de níveis de padrão de morte celular de apoptose Anexina V-FITC⁺ e necrose PI⁺ com o kit comercial, seguindo o protocolo do fabricante (Becton Dickinson, EUA). Brevemente, as células foram marcadas, por 15 minutos, com 5 µL de Anexina-V e 5 µL de PI. Posteriormente, as células marcadas foram adquiridas

no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, EUA), disponível na Plataforma Multiusuários de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

3.7 Estratégia de região para análise das populações monocíticas marcadas

Após a leitura e a aquisição das células marcadas pelo kit de avaliação de morte celular, as regiões para a aquisição das populações de interesse foram desenhadas com o auxílio do *software* Flowjo, para seguir com a análise dos níveis de morte celular, padronizado pelo grupo e publicado em estudos anteriores [30,96]. Inicialmente, a exclusão dos *doublets* na THP-1 e PBMC foi realizada (Figura 16A). Porém, somente na PBMC a exclusão da população de linfócitos encontrados, dentro dos eixos *Forward Scatter* (FSC, tamanho celular) e *Side Scatter* (SSC, granulosidade e complexidade), foi realizada (Figura 16B). Posteriormente, a análise dos fluorocromos lidos nos filtros FL1 (Anexina-V conjugada com FITC) e FL3 (PI) foi realizada (Figura 16C-F).

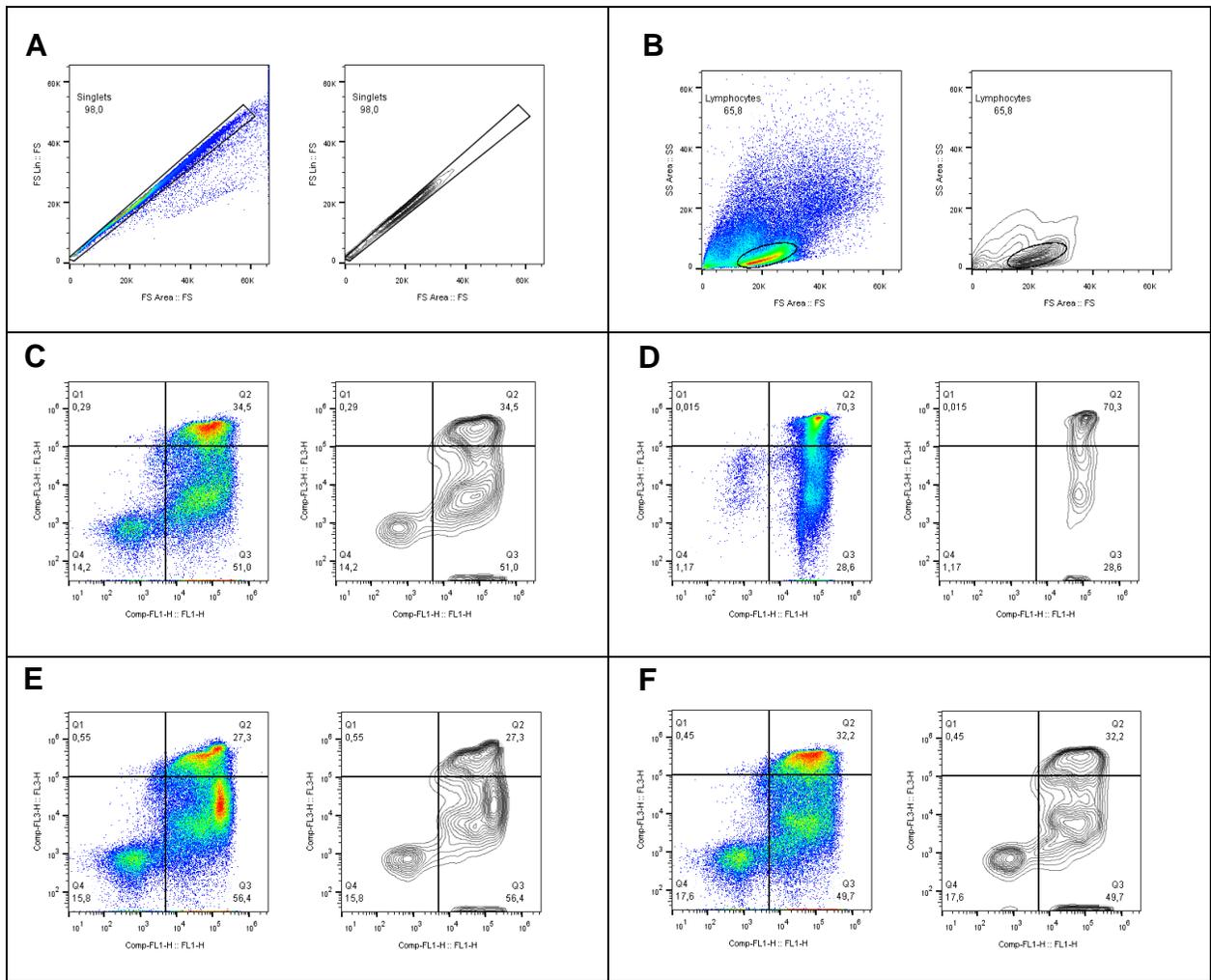


Figura 16. Gráficos *dotplot* (coloridos) e zebra (pretos) representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo para identificar os níveis de expressão (porcentagem) das populações de células com morte por apoptose (Anexina-V+/PI-) e por necrose (Anexina-V+/PI+). (A) Exclusão de *doublets*, (B) Região excluída com a população de linfócitos obtidos a partir de seu tamanho (FSC) e granulidade (SSC), (C) Controle negativo, (D) Controle positivo, (E) Infecção com BCG Russia e (F) Infecção com BCG Moreau RDJ.

3.8 Detecção de citocinas pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Todos os sobrenadantes do estudo foram utilizados para os ensaios de detecção de citocinas por ELISA, a partir dos kits comerciais, para dosagens de IL-1 β , IL-17, IL-27, IL-23, TIMP-1 e TGF- β , seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems®,

Minnesota, EUA). De modo geral, os anticorpos de captura específicos foram diluídos em PBS e as placas de 96 poços (Corning®) foram sensibilizadas, sendo aplicados 100 µL por poço. A placa foi coberta e incubada de um dia para o outro, em TA. No dia seguinte, a aspiração do conteúdo de todos os poços foi realizada e, em seguida, três lavagens com 400 µL de solução tampão (PBS/0,05% Tween-20) foram feitas. Removeu-se completamente o líquido dos poços por aspiração ou inversão da placa, e o bloqueio com 300 µL por poço de solução tampão bloqueadora (PBS/ BSA 4%) foi realizado com incubação por 1 a 2 horas, em TA. A cada poço foram adicionados 100 µL das amostras, assim como 100 µL naqueles poços da curva padrão feita por diluição seriada, seguindo incubação por 2 horas. Os anticorpos de detecção foram administrados no volume de 100 µL, e a placa foi coberta com um selador e incubada por 2 horas em TA. Em seguida, 100 µL de estreptavidina peroxidase foram adicionados por poço, por 20 minutos, em TA, evitando a luz direta sobre a placa. Após esse período, 100 µL de solução tampão substrato tetrametilbenzidina (TMB)) foram adicionados por poço, incubando em TA por 20 a 30 minutos. Uma vez verificada a mudança de coloração nos poços, 50 µL da solução de parada (ácido sulfúrico 2N) foram adicionados. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas (Spectra Max M2—Molecular Devices®, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. Os limites de mínimos e máximos de detecção estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Limites de detecção das citocinas avaliadas pela técnica de ELISA.

Citocina	Limite de Detecção (pg/mL)	
	Mínimo	Máximo
IL-1 β	3,9	250,000
IL-23	0,1	8,000
TGF- β	31,2	2,000
IL-17	15,6	1,000
IL-27	156,0	10,000
TIMP-1	46,9	3,000

3.9 Detecção de citocinas pelo Luminex

Os sobrenadantes congelados também foram utilizados em paralelo para o ensaio de detecção de citocinas por Luminex, utilizando um kit comercial para dosagens de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17F, IL-31, IL-4, IL-33, IFN- γ , SCD-40L, TNF, IL-17^a, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-25 humanos, seguindo as instruções do fabricante (Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Panel, Bio-Rad®, EUA). De modo geral, 200 μ L de tampão de lavagem foram adicionados por poço sob agitação por 10 minutos em TA. Depois de aspirada a placa, 25 μ L de cada padrão, em diluição seriada, foram adicionados, nos poços apropriados. Conforme indicado, 25 μ L das amostras de sobrenadantes diluídas 1:4 e 25 μ L das microesferas magnéticas foram adicionadas, e a placa foi deixada, então, 2 horas sob agitação. Após mais duas lavagens, 25 μ L de anticorpos de detecção foram adicionados, incubados por 1 hora, e 25 μ L de Estreptavidina-PE adicionados a cada poço. Passados 30 minutos e, após mais duas lavagens, 150 μ L de tampão foram adicionados em todos os poços. As microesferas foram ressuspensas em um agitador de placas por 5 minutos, uma quantidade mínima de 50 microesferas/analito foi adquirida, e o ensaio foi analisado no leitor de Luminex (xPONENT, EUA), disponível na Plataforma Tecnológica Multiusuários Institucional de Luminex do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, onde a intensidade média de fluorescência foi observada usando uma curva logística de 5 parâmetros (ou método *spline curve-fitting*) para calcular as concentrações de citocinas nas amostras. Os limites de mínimos e máximos de detecção estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Limite de detecção das citocinas avaliadas pela técnica de Luminex.

<i>Citocinas</i>	<i>Limite de Detecção (pg/mL)</i>	
	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
IL-1 β	0,4	2,877
IL-4	1,9	7,861
IL-6	3,1	2,539
IL-10	3,1	25,399
IL-17 ^a	1,2	6,631
IL-17F	7,5	30,743
IL-21	15,3	250,446
IL-22	2,5	41,572
IL-23	10,7	132,017
IL-25	1,3	21,804
IL-31	3,6	58,723
IL-33	6,8	55,852
IFN- γ	0,7	11,377
sCD-40L	7,7	126,350
TNF α	0,3	4,678

3.10 Extração, quantificação de RNA, geração de cDNA e comparação dos níveis de expressão dos genes candidatos das vias de apoptose pelo PCR quantitativo (qRT-PCR)

As amostras das induções de morte celular com dexametasona na linhagem THP-1 por 16 horas foram congeladas em Trizol e submetidas ao método de extração de RNA com um kit comercial (QIAamp, Qiagen, Hilden, Alemanha), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Amilcar Tanuri (UFRJ), e seguindo o protocolo do fabricante [202]. Em seguida, o RNA foi armazenado a -70°C. Após obtido o RNA, as amostras foram quantificadas por Nanodrop presente na Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos de Nova Geração (IOC/Fiocruz). Depois de quantificado e devidamente estocado, o mRNA foi convertido a DNA complementar (cDNA) pela reação da transcriptase reversa, por meio do kit SuperScript VILO cDNA (Invitrogen, EUA), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Posteriormente, as amostras foram diluídas e utilizadas na reação qRT-PCR em Tempo Real. Assim, baseado nas sequências de nucleotídeos correspondentes à BAD, BID, BAX, BAK, BIM, BCL-xL, MCL 1, NOXA, PUMA e TRAF 2 (Applied Biosystems,

EUA), estes iniciadores abaixo foram usados para os ensaios de qRT-PCR em Tempo Real:

Alvo 01 *GAPDH*

fwd: 5'- ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT – 3'

rev: 5'- GAG TCC TTC CAC GAT ACC AAA G –3'

Alvo 02 *BAD*

fwd: 5'- GACGAGTTTGTGGACTCCTTTA – 3'

rev: 5'- CAAGTTCCGATCCCACCAG –3'

Alvo 03 *BID*

fwd: 5'- CCTACCCTAGAGACATGGAGAA – 3'

rev: 5'- GGTGCGTAGGTTCTGGTTAATA –3'

Alvo 04 *BAX*

fwd: 5'- TTCTGACGGCAACTTCAACT – 3'

rev: 5'- CAGCCCATGATGGTTCTGAT –3'

Alvo 05 *BCL-xL*

fwd: 5'- GGTGGTTGACTTTCTCTCCTAC – 3'

rev: 5'- TCTCCGATTCAGTCCCTTCT –3'

Alvo 06 *NOXA*

fwd: 5'- GTGCTACTCAACTCAGGAGATTT – 3'

rev: 5'- AACTCTTCTGCTCAGGAACC –3'

Alvo 07 *BAK*

fwd: 5'- AGGGGTGGCTGGGTGG – 3'

rev: 5'- TTAAGTCCAGGCAGGGGTCT –3'

Alvo 08 *BIM*

fwd: 5'- ATGGCAAAGCAACCTTCTGA – 3'

rev: 5'- CTTGTGGCTCTGTCTGTA –3'

Alvo 09 MCL 1

fwd: 5'- TGGGTTTGTGGAGTTCTTCCA – 3'

rev: 5'- ACACCTGCAAAAGCCAGCA –3'

Alvo 10 PUMA

fwd: 5'- ATGGCGGACGACCTCAAC – 3'

rev: 5'- AGTCCCATGAAGAGATTGTACATGAC –3'

Alvo 11 TRAF 2

fwd: 5'- CAGTTCGGCCTTCCCAGATAA – 3'

rev: 5'- TCGTGGCAGCTCTCGTATTCTT –3'

Além desses alvos para identificação das vias intrínsecas de apoptose, o alvo endógeno GAPDH foi usado como controle da reação. Esta técnica foi utilizada para comparar, através da quantificação relativa de seu mRNA, os níveis de expressão dos genes destes candidatos nas condições desejadas. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um sistema *ABI Prism 7500 Fast* (Applied Biosystems, EUA). Os candidatos acima selecionados foram baseados em estudos anteriores realizados por nosso grupo [30,203].

3.11 Análise estatística dos resultados

Para a análise comparativa dos resultados, os valores *outliers* inicialmente foram determinados e removidos, para posterior análise de normalidade das amostras. Os testes: One-Way ANOVA, para os valores normais, Kruskal-Wallis, para os valores não normais, teste de correlação não paramétrico Spearman, para a correlação dos dados foram utilizados, sendo todos os testes com 95% de intervalo de confiança, com nível de significância menor ou igual a 0,05. A partir dos testes realizados, os valores de produção de citocinas e os níveis de morte celular foram relatados como mediana e intervalo interquartil (IQR), ou média e Desvio Padrão (SD). A análise estatística dos resultados foi realizada na ferramenta GraphPad Prism 8 (GraphPad 8 Software®, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do Perfil e Nível de Morte Celular

4.1.1 Linhagem celular THP-1

O nível e o padrão de morte celular induzidos pela vacina BCG são considerados os principais mecanismos de proteção contra a TB [5,30,183]. A linhagem humana THP-1 é uma célula monocítica que possui a capacidade de fagocitose [204]. Sendo assim, a mesma tende a ser utilizada como uma ótima ferramenta para se avaliar a resposta imunológica induzida pela vacina BCG, devido à ausência de pré-exposição a vacina, a mimetização da utilização em modelo humano e o fácil manuseio pela sua capacidade proliferativa.

No presente estudo, dados preliminares foram publicados e determinaram o nível de indução e o padrão de morte celular entre as cepas Moreau RDJ e Russia da vacina BCG, em modelo *in vitro* com a linhagem THP-1 ($n = 7$), para seguirmos com a comparação desta com a PBMC humana [96]. Assim, maiores níveis de apoptose induzidos pela vacina BCG Moreau RDJ foram observados, quando comparado com a vacina BCG Russia, com mediana de 12,4% (intervalo interquartil [IQR] 10,7–14,0) no controle negativo vs. 27,2% (IQR 26,5–29,3) pelo BCG Moreau RDJ e 10,2% (IQR 10,1–12,1) pelo BCG Russia, em 48 horas ($P \leq 0,002$, em todas as comparações com o BCG Moreau RDJ) (Figura 17A). Em paralelo e como esperado, no ensaio de determinação do nível de necrose, os dados demonstraram aumento de necrose induzida pelo BCG Moreau RDJ e BCG Russia quando comparada ao controle positivo aquecido, com mediana de 85% (IQR 82,45–88,15) neste último vs. 13,7% (IQR 6,2–19,7) pelo BCG Moreau RDJ e 8,4% (IQR 4,0–9,8) pelo BCG Russia, em 48 horas (Figura 17B).

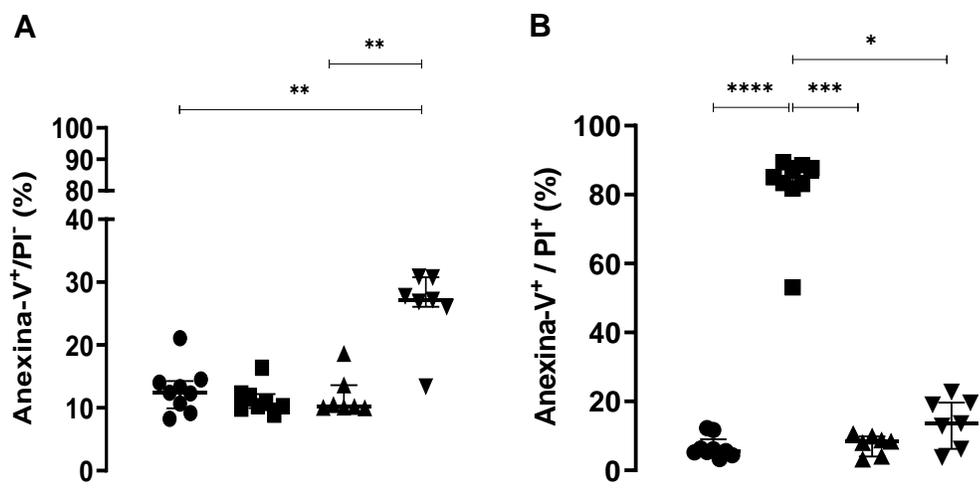


Figura 17. Níveis (%) de (A) apoptose (Anexina-V⁺/PI⁻) e (B) necrose (Anexina-V⁺/PI⁺) das células monocíticas de linhagem THP1 (n=9). Representados como controle negativo (Círculo), controle positivo - aquecido (Quadrado), BCG Russia (Triângulo) e BCG Moreau RDJ (Triângulo invertido). Ensaio de infecção em células de linhagem THP-1, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1. * p valor ≤ 0.05, ** p valor ≤ 0.01, *** p valor ≤ 0.001, **** p valor ≤ 0.0001.

Complementar aos achados supracitados, outra avaliação preliminar foi realizada com a linhagem THP-1, agora para avaliar se existem diferenças no padrão de morte celular, quando há formas diferentes de estocagem da vacina. De forma comparativa, os experimentos foram realizados com dois lotes vacinais do BCG Moreau RDJ provenientes da FAP. O lote #1 foi liofilizado e quando reconstituído, pronto para ser utilizado na imunização da população, enquanto que o lote #2 se manteve reconstituído e congelado a -70°C, com glicerol e 10% do suplemento composto por glicose, albumina e cloreto de sódio (Figura 18). Ainda nesta avaliação preliminar, um controle positivo de morte celular por apoptose com dexametasona foi utilizado, para assim validar a marcação do kit nas células frescas, além da melhor aquisição da população celular na citometria de fluxo. Os dados confirmaram que este corticoide é um excelente indutor de níveis elevados de apoptose na linhagem THP-1 (Figura 18A).

A

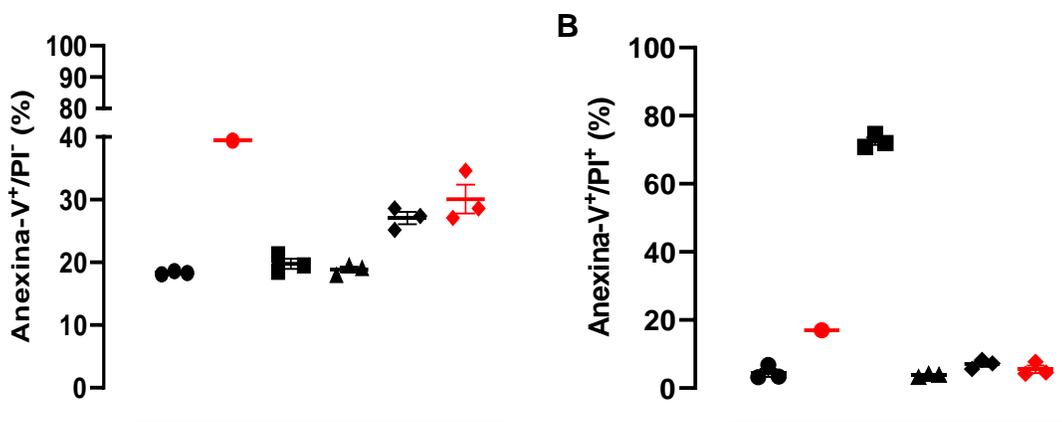


Figura 18. Níveis (%) de (A) apoptose e (B) necrose das células monocíticas de linhagem THP-1 (n=3). Representados como linha basal (Círculo), dexametasona (Círculo vermelho), controle positivo - aquecido (Quadrado), BCG Russia (Triângulo) e lote #1 BCG Moreau RDJ - Liofilizada (Losango) e lote #2 BCG Moreau RDJ - Congelada (Losango Vermelho). Ensaio de infecção em células de linhagem THP-1, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1.

4.1.2 Células mononucleadas de sangue periférico (PBMC)

Com a determinação do perfil e do nível de morte celular em uma linhagem sem pré-exposição a vacina BCG, idealizou-se um outro ensaio similar, para se averiguar como se comportaria a cultura primária de PBMC, obtidas a partir das amostras de indivíduos adultos, que possuem uma exposição prévia a micobactérias ambientais e foram imunizados com a vacina BCG Moreau RDJ ao seu nascimento. Devido a coorte recrutada (n = 19) ser uma população adulta pré-exposta à vacina BCG, e potencialmente apresentar uma resposta imune diferente da linhagem que não teve uma pré-exposição, repetimos os ensaios de infecção *in vitro* com as duas cepas da vacina BCG. Nesta abordagem, o controle negativo foi composto de células frescas apenas, e o controle positivo, constou de células frescas elevadas a 100°C, a fim de garantir o maior nível de necrose (controle positivo aquecido). Assim, uma maior indução de morte por apoptose ($P \leq 0,001$) foram vistas nas cepas da vacina BCG Moreau RDJ e Russia, quando comparada ao controle positivo aquecido (Figura 19A). Porém, não foram observadas diferenças relevantes na necrose quando as duas cepas da vacina BCG foram

comparadas (Figura 19B). Conforme esperado, o controle positivo revelou níveis elevados e significativos de necrose ($P \leq 0,0001$).

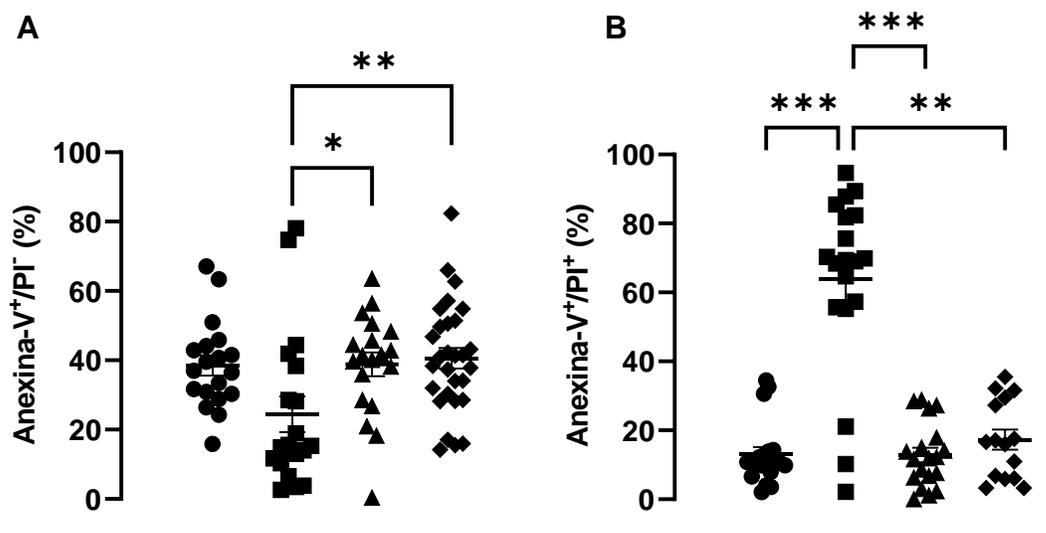


Figura 19. Níveis (%) de (A) apoptose (Anexina-V⁺/PI⁻) e (B) Necrose (Anexina-V⁺/PI⁺) das Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) de adultos saudáveis participantes da pesquisa (n=19). Representados como linha basal (Círculo), controle positivo - aquecido (Quadrado), BCG Russia (Triângulo) e BCG Moreau RDJ (Losango). Ensaio de infecção em PBMCs, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1. * p valor $\leq 0,01$, ** p valor $\leq 0,001$ e *** p valor $\leq 0,0001$.

4.2 Avaliação do perfil de citocinas

As citocinas pró-inflamatórias estão diretamente relacionadas com apoptose e por isso, são importantes na resposta imunológica proporcionada pela vacina BCG [6]. A indução de citocinas anti-inflamatórias foi descrita como um dos principais mecanismo de proteção contra a TB, por proporcionar uma regulação no processo inflamatório no sítio da infecção [2]. Estudos de comparação entre cepas da vacina BCG identificaram diferentes perfis de indução de citocinas [7]. Como existem divergências entre as respostas imunológicas proporcionadas pelas cepas da vacina BCG, nós avaliamos se

essas divergências também ocorrem nos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias entre as vacinas BCG Russia e BCG Moreau RDJ. Além disso, com os níveis e o padrão de morte celular determinado no modelo PBMC, seria de relevância também evidenciar em paralelo, os perfis de citocinas induzidas por ambas as cepas, na tentativa de averiguar quais perfis estariam relacionadas ao padrão de morte celular induzido.

Nesta etapa, algumas citocinas, como IL-1 β e IL-17 (n = 14); IL-23, IL-27, TGF- β e TIMP1 (n = 5) foram dosadas por ELISA, enquanto outras citocinas, como IFN γ , IL-10, IL-17A, IL17F, IL-1 β , IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IL-4, IL6, SCD-40L e TNF, foram dosadas por Luminex (n = 10).

4.2.1 Avaliação do perfil de citocinas dosados por Luminex em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC)

A cepa BCG Moreau RDJ induziu um aumento significativo ($p < 0,0001$) nos níveis dosados pelo Luminex de IFN γ , SCD-40L, TNF, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-25, quando comparada a cepa BCG Russia e a linha basal (Figura 20A-H). Já para as citocinas também dosadas pelo Luminex IL-1 β , IL-6 e IL-17F, níveis in vitro aumentados e significativos ($P < 0,001$) pelo BCG Moreau RDJ foram observados, quando comparado a linha basal (Figura 20I-L). Entretanto, na comparação com a cepa BCG Russia, estes aumentos observados não foram significativos.

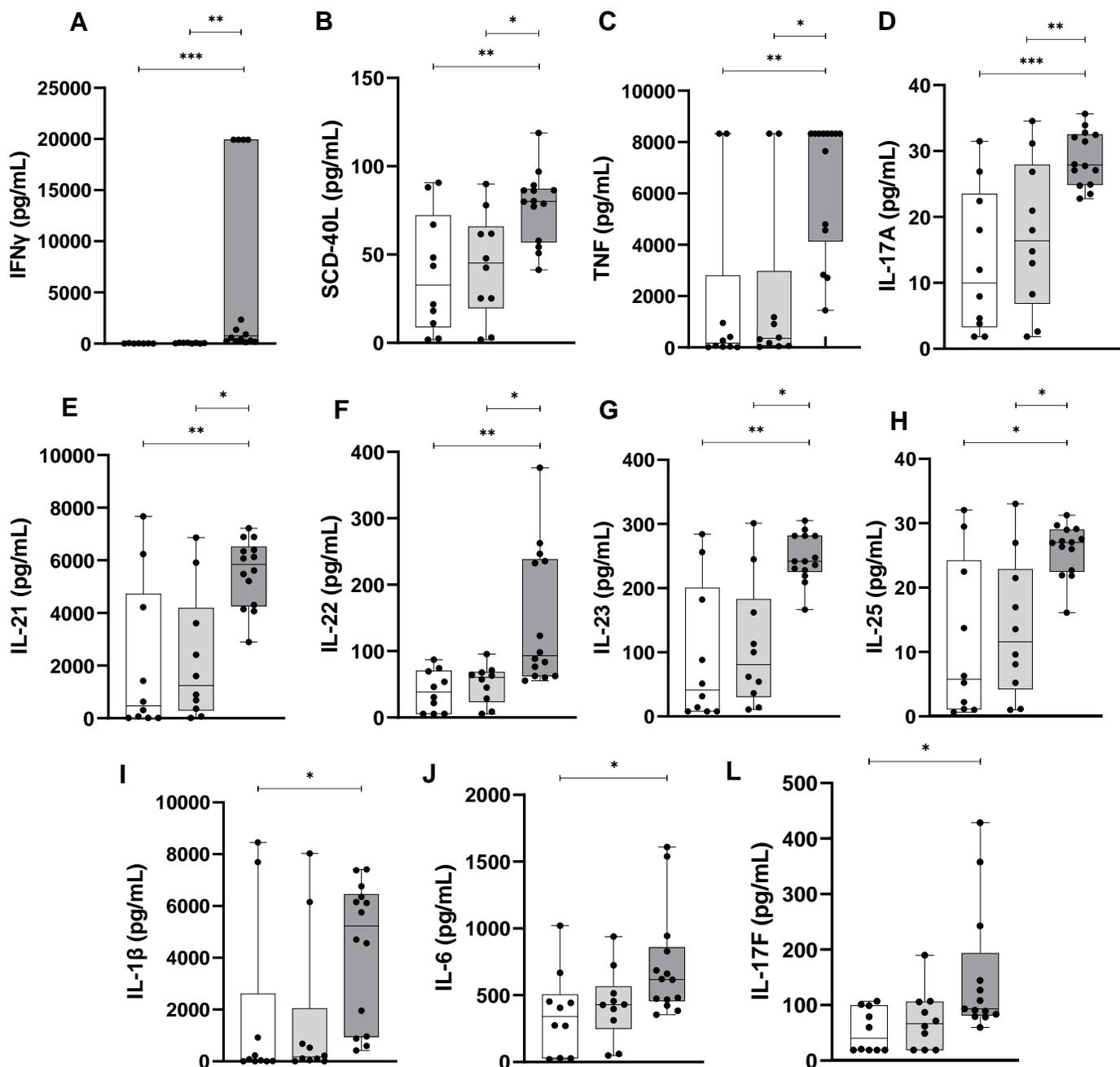


Figura 20. Níveis (pg/mL) de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelas vacinas BCG Moreau RDJ (cinza escuro) e BCG Russia (cinza claro), e na linha basal (branca) nas Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) de adultos saudáveis participantes da pesquisa (n=14). (A) IFN γ , (B) SCD-40L, (C) TNF, (D) IL-17A, (E) IL-21, (F) IL-22, (G) IL-23, (H) IL-25, (I) IL-1 β , (J) IL-6 e (L) IL-17F. Resultados adquiridos pela técnica de Luminex. Sobrenadantes gerados a partir do ensaio de infecção em PBMCs, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1. Dados representados das dosagens em mediana & IQR, * p valor ≤ 0.01 , ** p valor ≤ 0.001 , *** p valor ≤ 0.0001 .

Ao se avaliar o perfil anti-inflamatório induzido nas culturas de PBMC, aumentos de alta significância estatística ($P < 0,001$) foram observados na indução das citocinas IL-4 e IL-33 pela cepa BCG Moreau RDJ, quando comparados a cepa BCG Russia e a linha basal (Figura 21A-B). A IL-31 e IL-10 apresentaram aumento significativo ($P < 0,01$) na indução pelo BCG Moreau RDJ, apenas quando comparado a linha basal (Figura 21C-D).

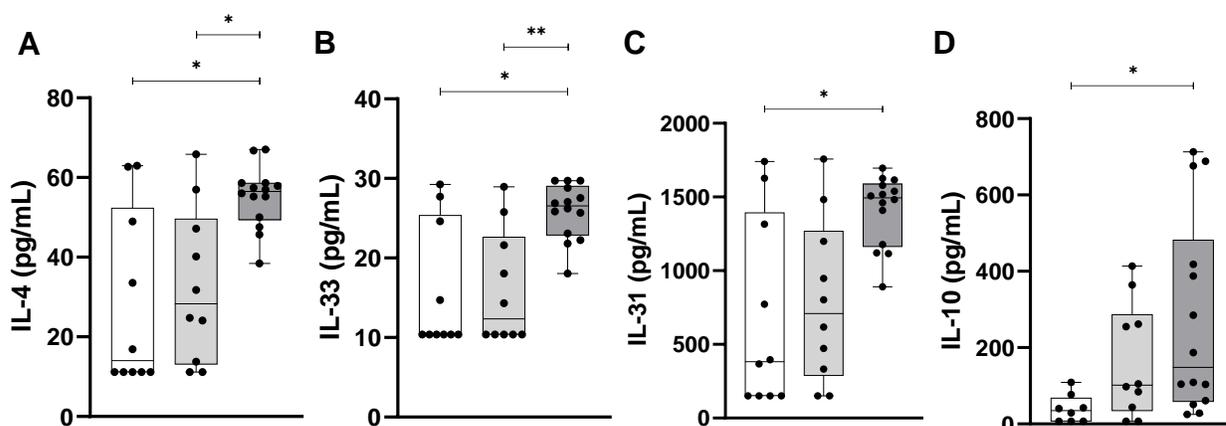


Figura 21. Níveis (pg/mL) de citocinas anti-inflamatórias induzidas pelas vacinas BCG Moreau RDJ (cinza escuro) e BCG Russia (cinza claro), e na linha basal (branca) nas Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) de adultos saudáveis participantes da pesquisa (n=14). (A) IL-4, (B) IL-33, (C) IL-31 e (D) IL-10. Resultados adquiridos pela técnica de Luminex. Sobrenadantes gerados a partir do ensaio de infecção em PBMCs, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1. Dados representados das dosagens em mediana & IQR, * p valor ≤ 0.01 , ** p valor ≤ 0.001 .

4.2.2 Avaliação do perfil de citocinas dosados por ELISA células mononucleadas de sangue periférico (PBMC)

A cepa BCG Moreau RDJ induziu um aumento no nível dosados pelo ELISA de IL-27, quando comparada a cepa BCG Russia e a linha basal (Figura 22A). Já para as citocinas também dosadas por ELISA TGF- β e TIMP-1, níveis *in vitro* diminuídos pelo BCG Moreau RDJ foram observados, quando comparado a linha basal (Figura 22I-L). Entretanto, estes valores observados não foram significativos.

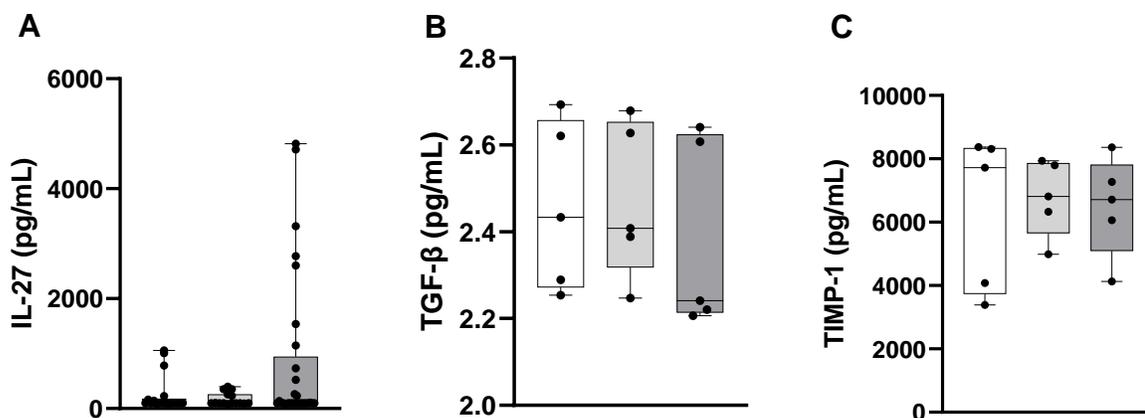


Figura 22. Níveis (pg/mL) de citocinas induzidas pelas vacinas BCG Moreau RDJ (cinza escuro) e BCG Russia (cinza claro), e na linha basal (branca) nas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos saudáveis participantes da pesquisa ($19 \leq n \leq 5$). (A) IL-27 ($n=19$), (B) TGF- β ($n=5$) e (C) TIMP-1. Resultados adquiridos pela técnica de ELISA. Sobrenadantes gerados a partir do ensaio de infecção em PBMCs, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1. Dados representados das dosagens em mediana & IQR.

4.2.3 Avaliação do perfil de citocinas dosados por ELISA em modelo THP-1

O estudo do padrão e nível de morte celular realizado nos modelos THP-1 e PBMC, permitiu visualizar o comportamento diferenciado entre as cepas BCG Moreau RDJ e BCG Russia, frente as células sem pré-exposição (THP-1), e com pré-exposição a vacina (PBMC). Neste contexto, uma avaliação posterior dos níveis *in vitro* de IL-1 β e IL-27 induzidos pelas cepas BCG Moreau RDJ e BCG Russia na THP-1 foi realizada ($n = 9$), para averiguar a relação destes perfis, com a indução do nível de morte determinado em nosso resultado preliminar [96] e obtido no presente estudo em PBMC. Observamos que a cepa BCG Moreau RDJ induziu um aumento significativo ($P < 0,005$) nos níveis de IL-1 β , quando comparada a cepa BCG Russia (Figura 23A) nas culturas de células THP-1. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para IL-27 (Figura 23B).

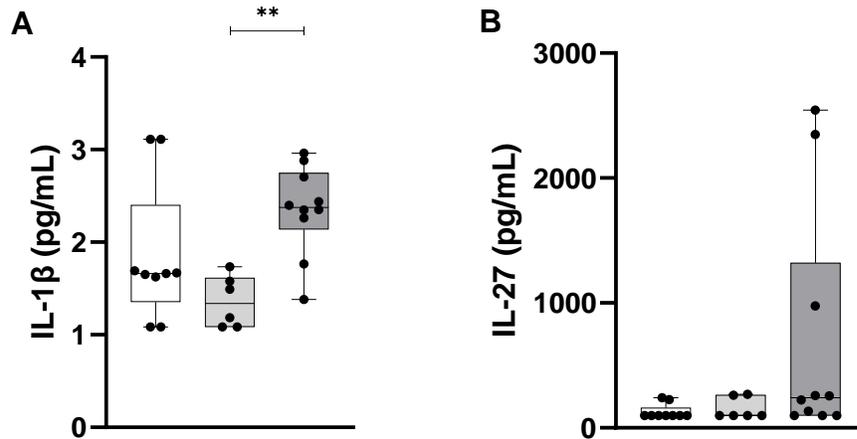


Figura 23. Níveis (pg/mL) de citocinas induzidas pelas cepas BCG Moreau RDJ (cinza escuro) e BCG Russia (cinza claro), e na linha basal (branca) nas células de linhagem THP-1 (n=19). (A) IL-1 β e (B) IL-27. Resultados adquiridos pela técnica de ELISA. Sobrenadantes gerados a partir do ensaio de infecção em THP-1, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1. Dados representados das dosagens em mediana & IQR, ** p valor \leq 0.001.

Os dados numéricos completos de todas as citocinas dosadas no presente estudo, foram incluídos no anexo I, tabela 5.

4.3 Avaliação da correlação entre os níveis e perfis de morte celular e de citocinas

No processo de morte celular, existe uma complexidade de fatores intra e extra celulares, e dentre eles, destaca-se a relevância de citocinas pro e anti-inflamatórias, as quais tem um papel importante na indução ou na regulação da apoptose [205]. Após a obtenção dos dados de morte celular e níveis de citocina, a suposição que se segue versa em possíveis correlações entre estes parâmetros, e que potencialmente seriam divergentes entre as cepas da vacina BCG e as células mononucleares. Para identificar se existe esta conexão, testes de correlação entre os níveis de Anexina-V e PI *versus* as citocinas detectadas em paralelo, foram realizados.

4.3.1 Linhagem celular THP-1

Na linhagem THP-1, a vacina BCG Moreau RDJ se correlacionou forte e positivamente entre a população apoptótica (Anexina-V⁺/PI⁻) e a IL-1 β (Figura 24A), e entre a população necrótica (Anexina-V⁺/PI⁺) e a IL-1 β (n = 7) (Figura 24B). Assim, quanto maior os níveis de IL-1 β secretados pela linhagem THP-1 infectada com o BCG Moreau RDJ, maior os níveis de morte celular.

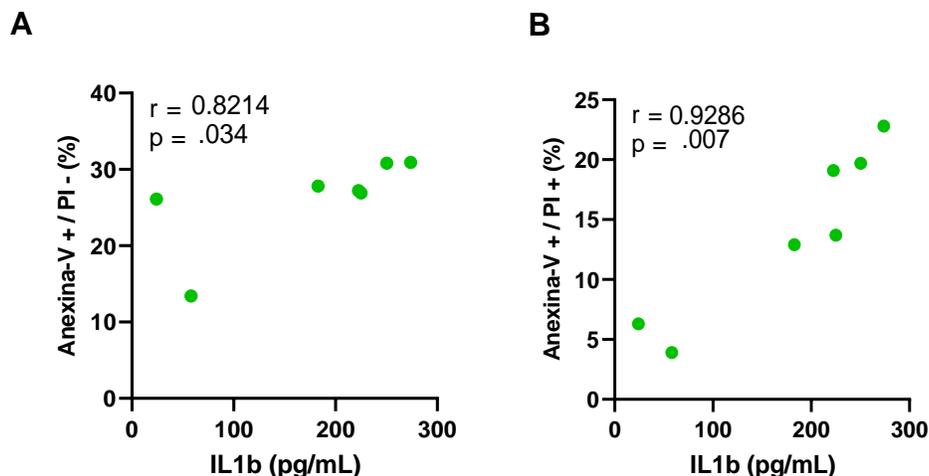


Figura 24. Correlação entre os níveis e padrão de morte celular e citocina induzidas pela vacina BCG Moreau RDJ em células de linhagem THP-1 (n=7). (A) Correlação forte e positiva entre os níveis de Anexina-V+/PI- e IL-1 β em THP-1; e (B) Correlação muito forte e positiva entre os níveis de necrose Anexina-V+/PI+ e IL-1 β em THP-1. Os gráficos representam os valores de correlação entre os níveis de porcentagem de apoptose (Anexina-V+/PI-) e necrose (Anexina-V+/PI+) no eixo de Y, e níveis de citocinas eixo de X, de acordo com o teste pareado de Spearman. Resultados adquiridos pela técnica de Luminex e citometria de fluxo. Sobrenadantes gerados a partir do ensaio de infecção em THP-1, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1.

4.3.2 Células mononucleadas de sangue periférico (PBMC)

Em relação as PBMC, foi possível verificar que a vacina BCG Moreau RDJ se correlacionou forte e negativamente na população apoptótica (Anexina-V+/PI-), com IL-1 β , IL-22, IL-10 e IL-6 (n = 9) (Figura 25A-G). Isto reforça que, quanto maior os níveis destas citocinas, menor os níveis de apoptose.

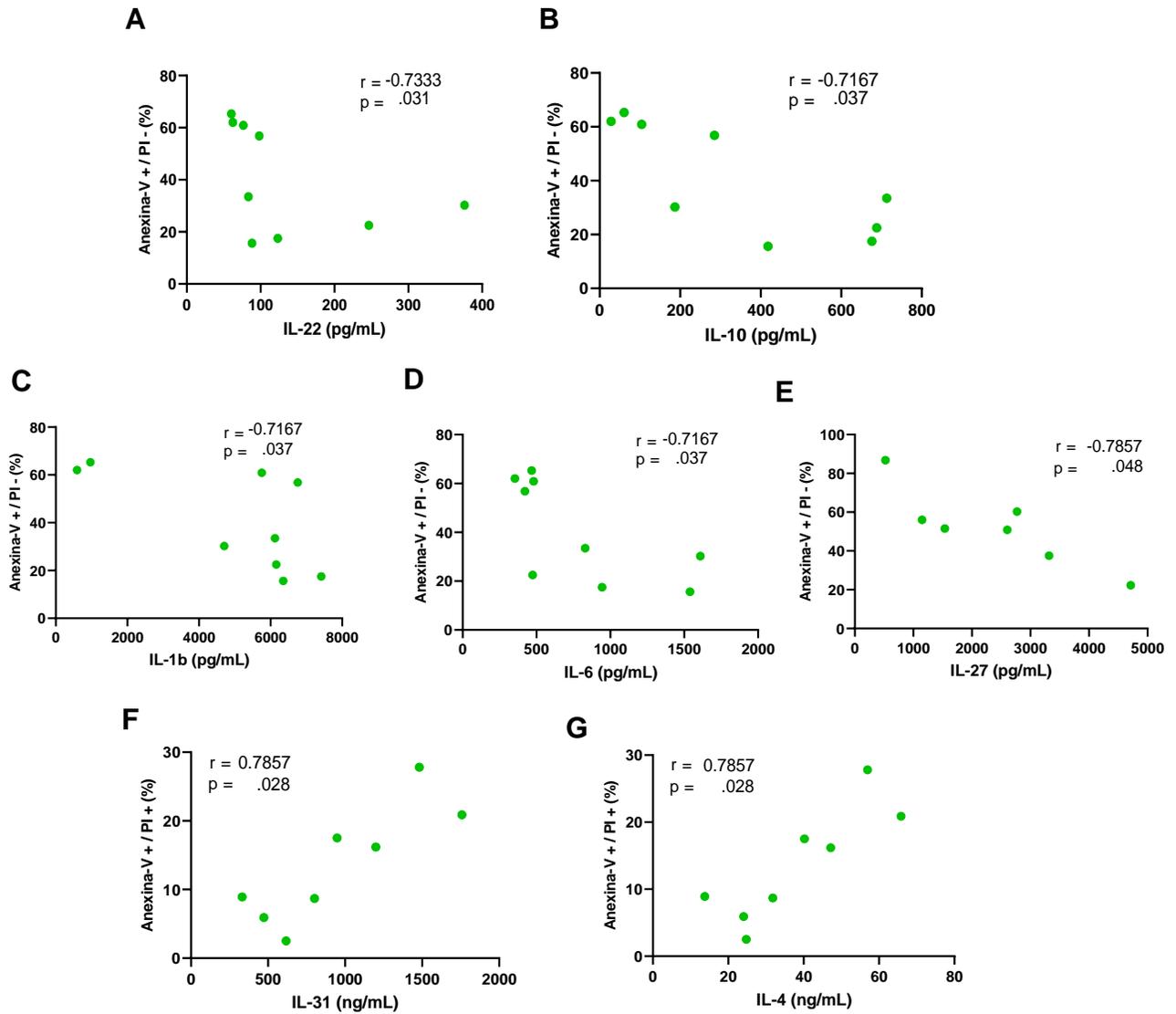


Figura 25. Correlação entre os níveis e padrão de morte celular e citocina induzidas pela vacina BCG Moreau RDJ em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos saudáveis participantes da pesquisa (n=9). Correlação forte e negativa entre os níveis da população Annexina-V⁺/PI⁻ e (A) IL-22, (B) IL-10, (C) IL-1 β , (D) IL-6 e (E) IL-27; Correlação forte e positiva entre os níveis de Annexina-V⁺/PI⁺ e (F) IL-31 e (G) IL-4. Os gráficos representam os valores de correlação entre os níveis de porcentagem de apoptose (Annexina-V⁺/PI⁻) e necrose (Annexina-V⁺/PI⁺) no eixo de Y, e níveis de citocinas eixo de X, de acordo com o teste pareado de Spearman. Resultados adquiridos pela técnica de Luminex e citometria de fluxo. Sobrenadantes gerados a partir do ensaio de infecção em PBMCs, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1.

Os dados numéricos completos de todas as correlações no presente estudo, foram incluídos no anexo I, tabelas 6 e 7.

4.3.3 Análise da correlação entre IL-22 e IL-1 β

A IL-1 β e a IL-22 são citocinas pro-inflamatórias e apresentaram níveis aumentados nas culturas de PBMC, quando estimuladas pelo BCG Moreau RDJ (Figuras 19I e 19F, respectivamente). A IL-1 β está ligada diretamente a indução de apoptose/piroptose [206] e a IL-22 possui a capacidade de potencializar a atividade da IL-1 β [207]. Portanto, o teste de correlação foi realizado para se averiguar se existe esta conexão após os estímulos pelos BCG Moreau RDJ e BCG Russia em PBMC (n = 13). Uma correlação forte e positiva foi observada entre a linha basal e os BCG Russia e BCG Moreau RDJ (Figura 26A-C). Assim, quanto maior os níveis de IL-22 secretados pela PBMC infectada com ambas as vacinas BCG, maior os níveis da IL-1 β .

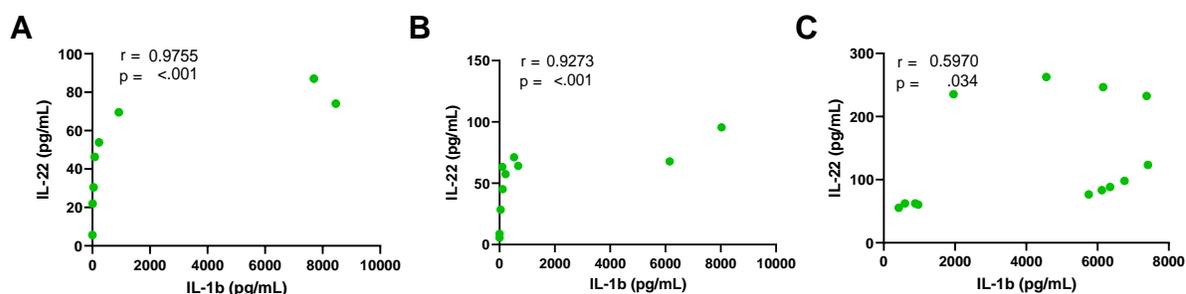


Figura 26. Correlação entre os níveis de IL-1 β e IL-22 induzidos pela vacina BCG em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos sadios participantes da pesquisa (n=13). (A) Correlação muito forte e positiva na linha basal, (B) correlação muito forte e positiva pelo BCG Russia e (C) Correlação forte e positiva pelo BCG Moreau RDJ. Os gráficos representam os valores de correlação entre os níveis de citocinas nos eixos Y (IL-22), e X (IL-1 β), de acordo com o teste pareado de Spearman. Resultados adquiridos pela técnica de Luminex e citometria de fluxo. Sobrenadantes gerados a partir do ensaio de infecção em PBMCs, no tempo de 48 horas, com MOI 2:1.

4.4 Padronização dos iniciadores para avaliação da expressão gênica

Nesta etapa de padronização, utilizou-se novamente a dexametasona para estimular a linhagem THP-1, e a mesma foi cultivada por 16 horas. Em seguida e após a extração do RNA e geração do cDNA, a massa das amostras foi igualada para 200 ng e a qRT-PCR em tempo real para os alvos BAD, BID, BAX, BAK, BIM, BCL-xL, MCL 1, NOXA, PUMA e TRAF 2, bem como para o alvo endógeno GAPDH, foi feita. As reações de qRT-PCR para o cálculo de eficiência foram realizadas em triplicata, seguindo um protocolo já publicado [208]. Com isso, as curvas de amplificação para checar a eficiência foram geradas (Figura 27A-B).

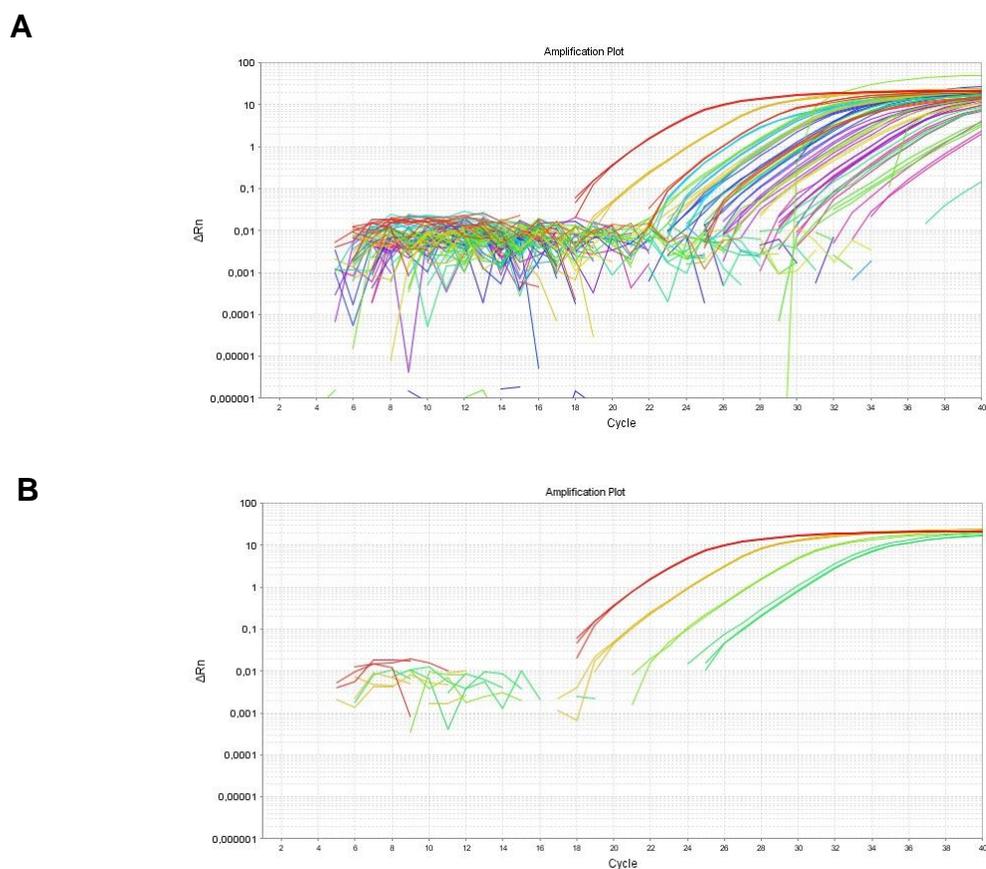


Figura 27. As curvas de amplificação em (A) representam os alvos BAD, BID, BAX, BAK, BIM, BCL-xL, MCL 1, NOXA, PUMA e TRAF 2, e em (B) representam o alvo endógeno GAPDH.

Com o que restou depois da reação anterior, uma eletroforese em gel de agarose foi feita (Figura 28). Os tamanhos dos produtos amplificados (*amplicons*) seriam 123 bp para GAPDH, 123 bp para BAD, 143 bp para BID, 117 bp para BAX, 124 bp para BIM-2, 110 bp para BCL-XL, 89 bp para NOXA, 117 bp para TRAF-2, 75 bp para MCL-1, 104 bp para PUMA e 168 bp para BAK. Desta forma, os resultados se mostraram satisfatórios, com os *amplicons* de pesos moleculares fidedignos e similares, exceto para BAK.

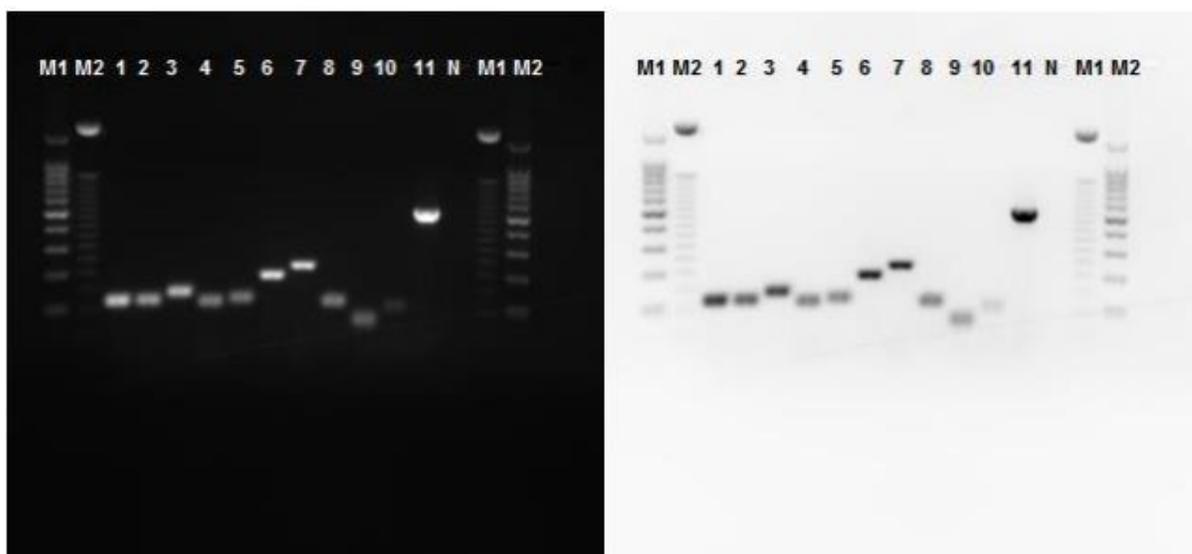


Figura 28. Poços M1 (marcador de peso molecular 100 bp); M2 (marcador de peso molecular 50 bp); 1 GAPDH; 2 BAD; 3 BID; 4 BAX; 5 BIM-2; 6 BCL-XL; 7 NOXA; 8 TRAF-2; 9 MCL-1; 10 PUMA; e 11 BAK.

Para cada par de iniciadores, um gráfico com base no valor das diferentes diluições do cDNA (eixo X) e pelos ΔC_t 's (eixo Y) foi construído (dados não mostrados). Ao final, as curvas de *melting* foram elaboradas (Figura 29A-L), onde apenas o alvo BID mostrou excesso de iniciadores, provavelmente resultando na geração de dímeros (Figura 29C).

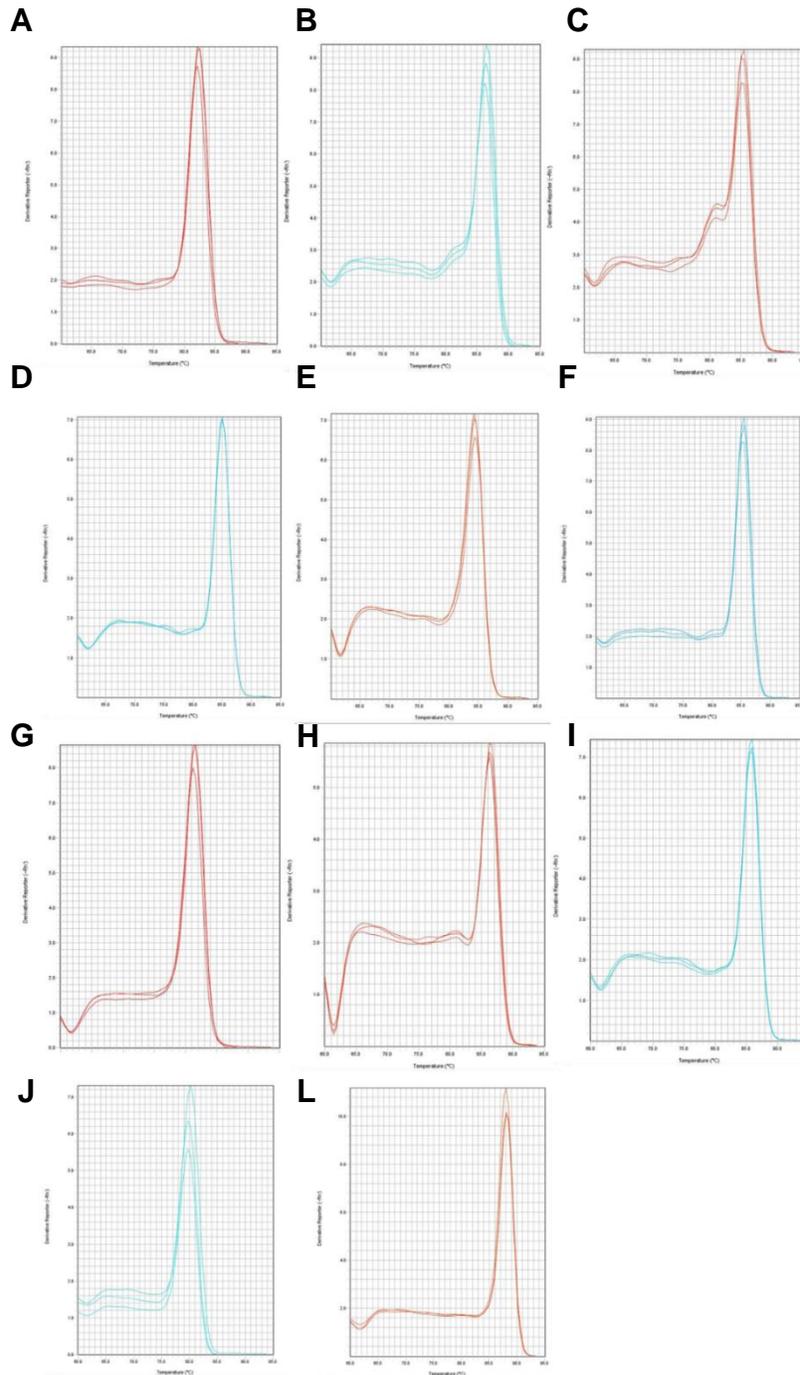


Figura 29. As curvas de *melting* em A GAPDH; B BAD; C BID; D BAX; E BIM-2; F BCL-XL; G NOXA; H PUMA; I TRAF-2; J MCL-1; e L BAK.

Desta forma, os resultados mostraram que a metodologia foi padronizada, aguardando as demais extrações de mRNA para termos resultados comparativos entre as cepas da vacina BCG.

5 DISCUSSÃO

Por exatos 100 anos, a vacina BCG continua sendo a única medida profilática contra a TB licenciada pela OMS, e mesmo sendo utilizada há tanto tempo, pouco se sabe sobre seu mecanismo de proteção. Assim, o mecanismo de indução de apoptose, bem como toda a resposta imune contra a TB proporcionada pela vacina BCG, ainda não é de amplo conhecimento. Alguns parâmetros, tais como o nível de apoptose e o perfil de citocinas entre as cepas de BCG, podem ser um bom marcador comparativo de resposta imunológica nas células provenientes da população estudada. Ao longo dos anos, após o início da sua produção em massa, a vacina BCG passou a ser distribuída pelo mundo, e a falta de padronização na forma de transporte, armazenamento e cultivo, propiciou variabilidade genética e bioquímica, seguido do surgimento de variadas cepas da vacina BCG [20,34].

Por mais de 80 anos, o Brasil sempre utilizou a cepa BCG Moreau RDJ em suas campanhas de imunização, sendo ofertada, inclusive, nas primeiras 48 horas aos recém-nascidos [48,49]. Entretanto, por medidas governamentais do MS e da ANVISA, estes órgãos optaram por retirar da FAP o fornecimento da vacina BCG Moreau RDJ, o que acarretou na alteração para vacina BCG Russia, provinda do SII [48]. Mesmo que de maneira tardia, esta alteração permitiu que estudos clínicos fossem realizados na comparação entre as cepas BCG Moreau RDJ e BCG Russia na população brasileira [198].

Por se tratar de uma vacina atenuada composta por uma micobactéria viva, estudos observaram que esta, quando fagocitada por macrófagos, induz um perfil de apoptose com citocinas pró-inflamatórias [30,209]. Este mecanismo induzido pela micobactéria atenuada, proporciona a indução de “*cross-priming*” e apresentação cruzada, para ativação de células T responsáveis pela memória imunológica [183].

No presente estudo, as respostas imunológicas entre duas cepas do BCG do mesmo grupo I, descritas como “Precoces” e mais próximas geneticamente da cepa-mãe, foram avaliadas e comparadas. Após um ensaio de infecção *in vitro* com a linhagem THP-1 sem pré-exposição, e com as PBMCs da população adulta, que provavelmente já foi

imunizada em seus primeiros dias de vida, determinamos qual cepa BCG apresentou o perfil mais imunomodulatório. Os principais achados apontaram que existem divergências grandes nas respostas imunológicas entre estas cepas irmãs, onde o BCG Moreau RDJ apresentou perfis mais pro-inflamatório, anti-inflamatório e de regulação, em relação ao BCG Russia. As diferenças estatísticas na comparação da indução do perfil de morte celular por apoptose e necrose entre as cepas da vacina BCG não foram observadas. Porém, observamos uma tendência à indução de morte celular por apoptose pelo BCG Moreau RDJ, em comparação ao BCG Russia.

Um estudo preliminar de ensaio de infecção e determinação de nível e padrão de morte celular em linhagem THP-1, mostrou que a vacina BCG Moreau RDJ apresentou um nível de indução de apoptose superior, quando comparada a vacina BCG Russia [96]. Os achados recentes neste nosso estudo, falharam em demonstrar diferenças na população apoptótica (Anexina-V⁺/PI⁻) e necrótica (Anexina-V⁺/PI⁺) pelo BCG Moreau RDJ, em comparação ao BCG Russia, na PBMC. Diferente da THP-1, uma linhagem celular proveniente de somente um indivíduo, a PBMC apresentou heterogeneidade nos resultados, espelhando possíveis variabilidade epigenética, presente em cada amostra estudada dos diferentes indivíduos.

Em estudo anterior e de modo pioneiro pelo nosso grupo, o ensaio de infecção no modelo PBMC por 24 horas e 48 horas foi realizado, e se identificou um aumento significativo de indução por apoptose pela vacina BCG Moreau RDJ [97]. Por outro lado, no modelo de CBMC onde as células ainda não tiveram um contato prévio com micobactérias ambientais, nem com a vacinação pelo BCG, o perfil de indução de morte celular por necrose foi observado, e este estava significativamente aumentado pela vacina BCG Moreau RDJ [97]. Em outro estudo para identificar divergências nos perfis de indução de morte celular por apoptose e necrose entre as cepas da vacina BCG Moreau RDJ, Dinamarquesa e Pasteur, o mesmo modelo ensaio de infecção por 48 horas foi realizado [30]. Com isso, a vacina BCG Moreau RDJ apresentou uma indução no nível de apoptose na PBMC, e indução de necrose na CBMC em comparação as cepas Dinamarquesa e Pasteur [30]. Estes dados de avaliação da indução do nível e do perfil de morte celular pela vacina BCG Moreau RDJ corroboram com os nossos achados

recentes, pois além de proporcionar níveis superiores da população apoptose (Anexina-V⁺/PI⁻) e necrose (Anexina-V⁺/PI⁺) em relação a linha basal, a vacina BCG Moreau RDJ apresentou um perfil imunomodulatório, em comparação a vacina BCG Russia.

Novas plataformas de vacinas compostas por vesículas geradas de corpos apoptóticos, vem sendo descritas na literatura como candidatas excelentes para ensaios clínicos, por garantirem uma memória imunológica duradoura via ativação de células T efectoras [210]. Estas vesículas vêm sendo estudadas como mecanismos de transporte de antígenos, que podem ser manipulados para incorporar outras moléculas potencializadoras da resposta imunológica frente a patógenos [210].

Giri e colaboradores (2008) pontuam a importância do macrófago no processo de ativação das DCs por apresentação cruzada para as células T. Porém, aqueles autores descrevem que esse mecanismo poderia ser mais eficiente à medida que essas vesículas fossem isoladas e concentradas, o que permitiria maior ativação e geração de memória imunológica [183]. Com a imunização pelas vias ID e intranasal (IN), com exossomos derivados de macrófagos contendo antígenos da vacina BCG, foi verificado uma maior ativação das DCs, células T CD4⁺ e T CD8⁺ e citocinas pró-inflamatórias no baço, pulmão e linfonodos mediastinais [183].

Este mesmo grupo seguiu com um estudo semelhante, que investigou a resposta imune proporcionada por exossomos derivados de macrófagos pulsados com proteínas purificadas de MTB, para imunização IN por aerossol em modelo murino [51]. Os resultados foram semelhantes ao estudo anterior com a vacina BCG, onde grupos de animais imunizados pela via ID apresentaram alta indução de perfis Th1 e Tc1 específicos, e uma resposta imune de reforço excelente quando os animais foram imunizados novamente por via IN por aerossóis. Porém, os autores observaram a indução de um perfil Th2 mais limitado do que com a vacina BCG [51].

Na comparação direta entre a imunização com BCG e outra vacina contendo vesículas com antígenos de MTB, ambos os grupos de animais imunizados apresentaram fortes respostas imunes humoral e celular aos componentes da membrana plasmática e da parede celular de MTB [211]. Os animais vacinados com vesículas contendo

antígenos de MTB foram protegidos, assim como o grupo de imunização com BCG. Porém, a imunização com BCG não gerou uma ativação com perfil Th1 tão robusta [211]. Como descrito anteriormente, a coadministração da vacina BCG com o inibidor MK-2206 apresentou uma melhor resposta imunológica quando comparada a vacina original, pois sua potencialização com o MK-2206 acarretou em maior indução de apoptose de APC em linfonodos de drenagem de camundongos imunizados e diminuição da citocina IL-10, descrita como um fator limitante da vacina BCG por regular a diferenciação do perfil Th1 e Th17 [192]. Além disso, a administração de MK-2206 melhorou as respostas de células T efetoras CD4⁺ e CD8⁺ induzidas por BCG e sua capacidade de induzir células T efetoras e de memória central [192]. De fato, o modelo de resposta imunológica proporcionado por vesículas compostas por antígenos específicos de MTB, BCG ou adjuvantes, mostra ser diferente do modelo utilizando o *M. bovis* atenuado, pois não se observa uma indução de vesículas, manipulação e purificação do material imunoestimulante. Entretanto, o modelo de resposta imunológica proporcionado por esta plataforma de imunização por vesículas, evidencia a importância da apresentação cruzada dos corpos apoptóticos, a partir da indução de morte celular imunogênica proporcionada pela infecção.

Nossos dados sugeriram a diferença na resposta imunológica, em relação a indução da população apoptótica (Anexina-V⁺/PI⁻) entre o BCG Moreau RDJ e o BCG Rússia, e corroboraram com os achados de estudos anteriores, onde o BCG Moreau RDJ aparentou ser mais imunogênico, em relação as cepas Dinamarquesa as e Pasteur [30]. Brosch e colaboradores (2016) realizaram um mapeamento genético entre as cepas da vacina BCG, e também encontraram diferenças em suas estruturas genéticas [36]. Pela proximidade genômica do grupo I com a cepa-mãe BCG Pasteur original, os autores sugerem que estas cepas “Precoces”, poderiam apresentar uma maior imunogenicidade, em relação as cepas “Tardias” [34].

Até o presente momento, o BCG Moreau RDJ apresentou imunogenicidade superior, em relação a algumas cepas do BCG [30]. Além disso, nossos dados sugerem que também existem diferenças importantes entre as cepas do grupo I, e uma avaliação comparativa posterior entre os BCG Moreau RDJ, Rússia e Japão da vacina BCG, se

torna necessária. Quando se observa o material genético das cepas irmãs que compõem o grupo I, parece possível identificar que mesmo próximas da cepa-mãe, existem alterações específicas, como a RD16 específica do BCG Moreau RDJ [21,31,34]. Além disso, outro estudo de mapeamento genético sugeriu que o BCG Russia poderia ser mais próximo da cepa-mãe BCG Pasteur original, pois também possui uma mutação na RecA [26].

Além dessas divergências, outro estudo anterior do nosso grupo também encontrou discrepâncias na indução de citocinas de perfil Th1 entre o BCG Moreau RDJ, e os BCG Pasteur e Dinamarquês nos grupos adulto e neonato [30]. Em ambas as coortes estudadas, o BCG Moreau RDJ apresentou indução de IL-2, IFN γ , IL-6 e IL-8, além de IL-17, GM-CSF e G-CSF, em comparação as cepas Pasteur e Dinamarquesa, com uma diminuição de IL-18 em todas as cepas, a exceção do TNF, que somente foi observado aumentado na PBMC [30]. Por outro lado, o TGF- β apresentou uma diminuição significativa pelo BCG Moreau RDJ [30]. Em estudo prévio, esta alta indução de citocinas pró-inflamatórias pela vacina BCG Moreau RDJ também foi observada, com um aumento significativo de IL-1 β e TNF, porém sem expressão de metaloproteinase-9, uma enzima envolvida na degradação da matriz extracelular no processo de resposta imunológica exacerbada [97].

Analogamente, outro estudo prévio do nosso grupo também avaliou a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, a modulação de células Treg, além de indução de perfis Th1 e regulatório, a partir do ensaio de infecção e estímulo por 48 horas pela vacina BCG Moreau RDJ e PPD nos grupos adulto e neonato [212]. Os resultados contundentes mostraram uma maior ativação de células Treg, e perfis Th1 e regulatório através de IL-10, nos adultos *versus* neonatos [212]. Em paralelo a este estudo anterior, também já observamos que o estímulo proporcionado pela vacina BCG Moreau RDJ em tempos de incubação diferentes com meio condicionado (MC) autólogo ou em THP-1 nas coortes de adultos e neonatos, apresentaram diferenças significativas na indução de apoptose e necrose, citocinas e produção de RNA [213]. Nas 120 horas de incubação com o MC, os maiores níveis de indução de apoptose foram vistos em todos os grupos estudados, e onde em um ensaio em modelo THP-1, aqueles dados foram espelhados, com maiores

níveis de necrose somente na coorte de neonatos [213]. Além disso, o BCG Moreau RDJ desencadeou níveis elevados de prostanóide PGE₂, LTB₄ e IFN- β em macrófagos na coorte de neonatos, enquanto PGE₂ e TGF- β 1 tiveram um padrão oposto na coorte de adultos [213].

No presente estudo, os achados corroboram com esses dados, pois observamos que a vacina BCG Moreau RDJ apresentou um perfil imunomodulatório potente, tanto na indução de citocinas pró-inflamatórias, quanto de anti-inflamatórias e de regulação, em linhagem THP-1 e PBMC. Além disso, nós também observamos que o BCG Moreau RDJ induziu aumento de IL-1 β e IL-27, em comparação ao BCG Russia na linhagem THP1. Semelhantemente, as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , SCD-40L, TNF, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-25, e imunomodulatório IL-27, apresentaram aumento pela vacina BCG Moreau RDJ, em comparação a vacina BCG Russia, em PBMC. Em contrapartida, as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, IL-31 e IL-33 também foram induzidos pelo BCG Moreau RDJ, quando comparado ao BCG Russia.

Curiosamente, o TGF- β e o TIMP-1 apresentaram diminuição pelo BCG Moreau RDJ, em comparação ao BCG Russia e a linha basal. O TGF- β possuiu um papel de inibição de diferenciação do perfil Th17, bem como inibição de macrófagos [214], e o TIMP-1 possui um papel de modulação da apoptose [215]. Recentemente, e em suporte aos nossos achados, um estudo avaliou as respostas imunes *ex vivo* das vacinas BCG Moreau RDJ e BCG Russia, em uma coorte de neonatos imunizados na Bahia, e a acompanhou ao longo de 12 semanas [198]. Aumentos significativos das produções de IL-2, IL-10 e IL-4 pelo BCG Moreau RDJ foram encontrados, sem diferença significativa destas citocinas induzidas pelo BCG Russia, mas em ambas as cepas, aumentos significativos de IL-6, TNF e IL-10 [198]. Além disso, o estudo também avaliou a indução do perfil de citocinas em ambas as cepas de BCG após um desafio *in vitro* com MTB H37Rv morto pelo calor, no qual somente um aumento significativo de IL-2 pelo BCG Moreau RDJ foi observado [198].

De modo geral e em diferentes modelos de estudo, a avaliação do perfil de citocinas induzidas pela vacina BCG tem sido discutida de forma contínua na literatura. Entretanto, estudos que descrevem a cepa BCG utilizada, bem como suas comparações,

são infrequentes, sendo os fatores limitantes para a identificação de uma vacina BCG com potencial mais imunomodulador. Além disso, não tem sido possível se aprofundar no conhecimento das divergências entre as cepas da vacina BCG, seja para determinar a cepa BCG ideal para uma recombinação visando a melhor plataforma de imunização, ou uma mudança na via de administração. Neste contexto, um estudo similar ao nosso mostrou que a vacina BCG Dinamarquesa induziu perfis de citocinas pró e anti-inflamatória divergentes, pois foram observados aumentos significativos de IL-6 em monócitos de neonatos e adultos após a reestimulação com LPS, enquanto o β -glucano induziu aumento de produção de IL-6, IL-10 e TNF [216].

Em um ensaio clínico de voluntários que foram imunizados pela vacina BCG, se observou um aumento significativo de IL-1 β , TNF e IFN γ [217]. Já em outro ensaio clínico randomizado de neonatos vacinados com o BCG Dinamarquês e frente ao reestímulo *in vitro* com PPD, um aumento dos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF e IFN- γ foram observados, mas nenhum efeito significativo foi detectado nos níveis de IL-10 [218]. Com a vacina BCG Moreau utilizada na Polónia, esta divergente geneticamente da vacina BCG Moreau RDJ, um outro estudo foi concebido para avaliar as reações adversas em pacientes com doenças hereditárias e defeitos imunológicos associados [219]. Foi observada na população estudada uma baixa taxa de reações adversas causada pelo BCG, com confirmação da alta proteção relacionada ao perfil Th1, direcionada por células NK [219].

Para confirmar a suposição de que a vacina BCG Moreau RDJ possui um perfil mais imunomodulatório do que as outras cepas da vacina BCG, nosso grupo concebeu um estudo recente que comparou as respostas imunes *in vitro*, das cepas Moreau RDJ, Rússia, Pasteur e Dinamarquesa, a partir da indução de diferentes perfis de citocinas e suas correlações, no modelo PBMC [220]. Os resultados mostraram que a vacina BCG Moreau RDJ gerou um perfil de citocinas inflamatórias mais alto, com níveis de TGF- β mais baixos em paralelo, em comparação com as cepas Rússia, Pasteur e Dinamarquesa [220]. Além de termos observado uma correlação positiva entre os níveis de IFN- γ *versus* de IL-1 β , IL-17 e IL-6, quando relacionados ao BCG Rússia, também encontramos uma correlação positiva entre os níveis de IFN- γ e IL-17, bem como IL-6 e ambos os níveis de

IFN- γ e IL-17 pelas vacinas BCG Moreau RDJ, Pasteur e Dinamarquesa, exceto para os níveis de IL-17 pela cepa Rússia [220].

Nesse estudo, as correlações entre as populações apoptótica e necrótica e as citocinas em modelos de linhagem THP-1 e PMBC também foram avaliadas. Nós julgamos importante traçar uma relação entre a morte celular induzida pela vacina BCG, e as citocinas secretadas, haja visto que existe uma relação direta entre algumas citocinas indutoras da via extrínseca de apoptose [221]. Assim, foi visto que na THP-1, houve uma correlação muito forte e positiva entre a população necrótica (Anexina-V⁺/PI⁺) e os níveis de IL-1 β induzidos pela vacina BCG Moreau RDJ, sugestivo de piroptose, e uma correlação forte e positiva entre a população apoptótica (Anexina-V⁺/PI⁻) e a mesma citocina. Por outro lado, a vacina BCG Moreau RDJ induziu uma correlação forte e negativa nos níveis de IL-1 β , IL-22, IL-10 e IL-6 e a população de células apoptóticas nas culturas de PBMC.

Nossos achados evidenciaram uma alta indução de perfil pró-inflamatório, com redução dos níveis de TGF- β e TIMP-1 pela vacina BCG Moreau RDJ, em comparação a vacina BCG Russia. Porém, também observamos níveis elevados de perfis anti-inflamatórios, com SCD40L e IL-27 secretados por ambas as cepas de BCG, e em maior quantidade pelo BCG Moreau RDJ, em comparação ao BCG Russia. A IL-27 foi vista em níveis elevados na CBMC, o que afeta diretamente a resposta imunológica em camundongos [222]. A IL-27 permaneceu em níveis elevados durante o período de desmame até a fase adulta em camundongos, e seu bloqueio proporcionou um aumento na liberação de IFN- γ , após a imunização com a vacina BCG [222].

A IL-1 β foi encontrada em altos níveis em estudos anteriores do nosso grupo utilizando a vacina BCG Moreau RDJ [97]. Em paralelo e preliminarmente a este estudo, a inibição da IL-1 β no MC regulou a indução de apoptose em PBMC (dados não publicados). Curiosamente, na linhagem THP-1 houve uma correlação entre a apoptose e a IL-1 β no presente estudo. Porém, houve uma correlação negativa na PBMC. Além disso, também houve uma correlação positiva entre a IL-1 β e a IL-22 na PBMC. Assim, estes dados sugerem que em cultura ou no MC, a IL-1 β acarreta na indução de necrose/piroptose. Porém, esta atividade é regulada na PBMC, com a presença de

células T. A vacina BCG Russia também regulou positivamente IL-1 β e a IL-22. Entretanto, não observamos correlação entre os níveis de IL-1 β e a população de células apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻), tanto na linhagem THP-1, quanto na PBMC. Contudo, a PBMC da população brasileira apresenta potencialmente uma memória imunológica ao BCG Moreau RDJ, e esta poderia também influenciar na regulação das células T. Já a vacina BCG Russia até agora, apresentou um perfil semelhante entre a PBMC e a linhagem THP-1.

Em outro estudo utilizando a vacina BCG Moreau RDJ, nós observamos níveis elevados de IL-1 β e caspase-1, bem como a expressão transcriptômica de caspase-1 e BCL-2, na PBMC e na CBMC [203]. Porém, os níveis de IL-18 não se alteraram. Entretanto, houve um aumento do nível do inflamassoma NLRP3 somente na CBMC [203]. Esses dados corroboraram com os nossos achados anteriores, onde também foram observados altos níveis de IL-1 β e de células apoptóticas (Anexina-V⁺/PI⁻) induzidas pelo BCG Moreau RDJ, mas ausência de IL-18, na CBMC [30]. Neste contexto, seria possível sugerir que além da indução de diversos perfis de citocinas, o BCG Moreau RDJ poderia induzir diferentes tipos de RCDs na PBMC e na CBMC. À medida que os níveis elevados de Caspase-1, IL-1 β e NLRP3 presentes na piroptose foram observados na CBMC, também não poderíamos descartar uma morte celular relacionada a necroptose. Portanto, futuros estudos com a utilização de marcadores de morte celular mais específicos se tornam necessários, para melhor entendimento deste fenômeno.

Uma limitação deste estudo seria a falta de dados demográficos das amostras obtidas dos doadores adultos saudáveis, dos quais não há informações disponíveis sobre a positividade do teste com PPD, devido a política de doações anônimas, o que impossibilita registros de características clínicas. A única informação segura seria a de que esses indivíduos brasileiros foram vacinados apenas com a cepa Moreau RDJ da vacina BCG RDJ em seu nascimento.

Em resumo, estes achados comprovam que a cepa BCG Moreau RDJ apresentou um padrão mais imunoestimulante, pela maior indução do perfil pro-inflamatório de citocinas, quando comparada a cepa BCG Russia. Entretanto, mesmo que a cepa BCG Moreau RDJ tenha apresentado maior estímulo que a cepa BCG Russia, ambas as cepas

apresentaram perfis semelhantes de indução de citocinas anti-inflamatórias e TIMP-1. Estudos evidenciaram que citocinas pró-inflamatórias tem o papel importante na indução de apoptose [205]. Sendo assim, os perfis de citocinas induzidas por ambas as cepas podem estar relacionados com o processo de apoptose proporcionado pela fagocitose da micobactéria, visto que ambas as cepas apresentaram maior indução no ensaio de detecção do nível do padrão de morte pela população apoptótica (Anexina-V⁺/PI⁻).

Tanto a linhagem THP-1, quanto a PBMC, apresentaram perfis de resposta imune *in vitro* semelhantes frente as cepas da vacina BCG. Entretanto, cada uma possui diferenças quanto ao caráter de pré-exposição a vacina BCG. A THP1 é uma célula de linhagem monocítica, com capacidade proliferativa [204]. Já PBMC são provenientes dos participantes da pesquisa, indivíduos adultos saudáveis brasileiros, que pela política de vacinação nacional, foram expostos a vacina BCG em seus nascimentos [49]. Desta forma, como garantia de um modelo *in vitro* com potencial ausência de pré-exposição a qualquer micobactéria, as células de cordão umbilical humana, provenientes de mães saudáveis brasileiras, serão avaliadas futuramente, para seguir com a comparação entre coortes estimuladas com a vacina BCG Moreau RDJ e Russia. Além disso, para comparar as respostas de indução de citocinas e morte celular, entre os monócitos da linhagem THP-1 e da coorte PBMC, será realizado um estudo de purificação de monócitos da PBMC, com ensaio de infecção pela vacina BCG Moreau RDJ e BCG Russia, para confirmar se a interação entre outros tipos celulares presentes na PBMC poderiam influenciar nas divergentes respostas entre a PBMC e THP-1, observadas nos dados do presente estudo.

6 CONCLUSÕES

- Houve um aumento da população apoptótica (Anexina-V⁺/PI⁻) e necrótica (Anexina-V⁺/PI⁺), ambas induzidas pela vacina BCG Moreau RDJ, quando comparada a vacina BCG Russia e linha basal, na THP-1. Além disso, ambas as cepas apresentaram aumento de Anexina-V⁺/PI⁻ e de Anexina-V⁺/PI⁺, quando comparada ao controle positivo aquecido, na PBMC.
- Houve um aumento significativo nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IFN γ , SCD-40L e TNF, e anti-inflamatórias IL-4 e IL-33, induzidos pela vacina BCG Moreau RDJ, quando comparada a vacina BCG Russia e linha basal na PBMC. Também houve um aumento significativo nos níveis de IL-1 β induzidos na linhagem THP1 pela vacina BCG Moreau RDJ, quando comparada a vacina BCG Russia.
- Houve uma correlação forte e positiva entre os níveis de Anexina-V⁺/PI⁻ e a IL-1 β , e uma correlação muito forte e positiva entre os níveis de Anexina-V⁺/PI⁺ e a IL-1 β , na linhagem THP-1 estimulada pela vacina BCG Moreau RDJ. Entretanto, houve uma correlação forte e negativa entre os níveis de Anexina-V⁺/PI⁻, e IL-1 β , IL-22, IL-10 e IL-6, na PBMC estimulada pela vacina BCG Moreau RDJ. Além disso, houve uma correlação forte e positiva, entre IL-1 β e IL-22, na linha basal e nos BCG Russia e BCG Moreau RDJ.
- Houve uma padronização satisfatória do qRT-PCR com resultados fidedignos para BAD, BID, BAX, BIM, BCL-xL, MCL 1, NOXA, PUMA e TRAF 2, e que se mostraram reprodutíveis, com os *amplicons* de pesos moleculares similares, exceto para BAK.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar a purificação dos monócitos presentes na PBMC para identificar se há uma resposta imune semelhante a linhagem THP-1 estimulada com o BCG Moreau RDJ e o BCG Russia, além da comparação com a CBMC.
- Determinar a resposta imunológica proporcionada pelo grupo “Precoce” das cepas da vacina BCG, a partir da inclusão do BCG Japão na comparação entre o BCG Moreau RDJ e o BCG Russia, avaliados no presente estudo;
- Determinar as vias de sinalização de morte celular a partir da ativação de cascatas de proteínas fosforiladas, induzidas por diferentes cepas da vacina BCG, na mesma população de estudo.
- Quantificar a concentração de mRNA dos indutores de morte celular da via intrínseca, para determinar e comparar a existência de processos de regulação de morte celular entre as diferentes cepas da vacina BCG.
- Avaliar e comparar a concentração das vesículas endocíticas liberadas pelas células infectadas por diferentes cepas da vacina BCG, além de determinar a força da resposta imunológica induzida na população de linfócitos em contato com essas vesículas purificadas.
- Determinar e correlacionar os dados demográficos da população estudada em futuros ensaios de resposta imunológica pela vacina BCG, para revelar os padrões de heterogeneidade encontrados nos estudos realizados com a população de PBMC.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *The Lancet* 2019;393:1642–56. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3).
- [2] Pezzella AT. History of Pulmonary Tuberculosis. *Thorac Surg Clin* 2019;29:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.09.002>.
- [3] Natarajan A, Beena PM, Devnikar A v., Mali S. A systemic review on tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis* 2020;67:295–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.02.005>.
- [4] GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021. 2021.
- [5] Luca S, Mihaescu T. History of BCG Vaccine. *Maedica (Bucur)* 2013;8:53–8.
- [6] Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci* 2020;252:117594. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117594>.
- [7] Costa DC. Comentários sobre a tendência secular da tuberculose. *Cad Saude Publica* 1988;4:398–406. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1988000400005>.
- [8] World Health Organization. WHO 2022. <https://www.who.int/> (accessed July 28, 2022).
- [9] Ministério da Saúde. Tuberculose | 2022. Brasília: 2022.
- [10] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2022. World Health Organization; 2022.
- [11] Negi K, Bhaskar A, Dwivedi VP. Progressive Host-Directed Strategies to Potentiate BCG Vaccination Against Tuberculosis. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.944183>.
- [12] Harkin TJ, Rurak KM, Martins J, Eber C, Szporn AH, Beasley MB. Delayed diagnosis of COVID-19 in a 34-year-old man with atypical presentation. *Lancet Respir Med* 2020;8:644–6. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30232-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30232-0).
- [13] Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:620–30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>.
- [14] Yoshimura FK, Borstel GCC von, Zaura C, Marcelino VMR, Garcia ICM, Nunes PLP, et al. Tuberculose: revisão de literatura/ Tuberculosis: a review of the

- literature. *Brazilian Journal of Health Review* 2021;4:14223–31. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n3-354>.
- [15] Mendoza-Coronel E, Castã M, On-Arreola ´. Comparative evaluation of in vitro human macrophage models for mycobacterial infection study 2016;74:52. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw052>.
- [16] Divangahi M, Behar SM, Remold H. Dying to Live: How the Death Modality of the Infected Macrophage Affects Immunity to Tuberculosis. *Adv Exp Med Biol* 2013;783:103–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_6.
- [17] Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasil; 2022.
- [18] Ministério da Saúde. Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Brasil; 2014.
- [19] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science (1979)* 1999;284:1520–3. <https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1520>.
- [20] Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:821–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00118.x>.
- [21] Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology*, 2017, p. 155–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_8.
- [22] Martinez L, Cords O, Liu Q, Acuna-Villaorduna C, Bonnet M, Fox GJ, et al. Infant BCG vaccination and risk of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis throughout the life course: a systematic review and individual participant data meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2022;10:e1307–16. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(22\)00283-2](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00283-2).
- [23] Ministério da Saúde. Prevenção da tuberculose no Brasil e no mundo. Ministério Da Saúde 2023. [https://bvsmms.saude.gov.br/01-7-dia-da-vacina-bcg-](https://bvsmms.saude.gov.br/01-7-dia-da-vacina-bcg-90)

- [35] Li J, Zhao A, Tang J, Wang G, Shi Y, Zhan L, et al. Tuberculosis vaccine development: from classic to clinical candidates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2020;39:1405–25. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03843-6>.
- [36] Bottai D, Brosch R. The BCG Strain Pool: Diversity Matters. *Molecular Therapy* 2016;24:201–3. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.18>.
- [37] Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 2003;9:533–9. <https://doi.org/10.1038/nm859>.
- [38] Ritz N, Dutta B, Donath S, Casalaz D, Connell TG, Tebruegge M, et al. The Influence of Bacille Calmette-Guérin Vaccine Strain on the Immune Response against Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:213–22. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0714OC>.
- [39] Dreyer G, Vollum RL. MUTATION AND PATHOGENICITY EXPERIMENTS WITH B C G. *The Lancet* 1931;217:9–15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)40633-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)40633-1).
- [40] Milstien JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bull World Health Organ* 1990;68:93–108.
- [41] WIKER HG, NAGAI S, HEWINSON RG, RUSSELL WP, HARBOE M. Heterogenous Expression of the Related MBP70 and MPB83 Proteins Distinguish Various Substrains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Scand J Immunol* 1996;43:374–80. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1996.d01-61.x>.
- [42] Schwarz MGA, Corrêa PR, Malaga W, Guilhot C, Mendonça-Lima L. *Mycobacterium bovis* BCG moreau is naturally deficient in homologous recombination. *Tuberculosis* 2020;123:101956. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101956>.
- [43] Kozak R, Behr MA. Divergence of immunologic and protective responses of different BCG strains in a murine model. *Vaccine* 2011;29:1519–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.012>.

- [44] Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. *Rev Saude Publica* 2007;41:59–66. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102007000800009>.
- [45] DataSus. Ministério Da Saúde 2022. http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?bd_pni/cpnibr.def (accessed August 18, 2022).
- [46] Ministério de Saúde. Cobertura Vacinal do Brasil pelo Programa Nacional de Imunização. Programa Nacional de Imunização Do Ministério Da Saúde 2022. http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?bd_pni/cpnibr.def (accessed September 3, 2022).
- [47] Antas PRZ, Flores-Valdez M, Shann F. An opportunity to compare the effects of BCG-Moreau and BCG-Russia in Brazil. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2018;22:1108–9. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0271>.
- [48] MS. Boletim Epidemiológico da Tuberculose 2018. Brasília: 2018.
- [49] MS. Nota Técnica N° 66/CGPNI/DEVEP/SVS/MS: Suspensão do uso da segunda dose da vacina BCG-ID do calendário de vacinação. Ministério Da Saúde 2019. <http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/132090/DLFE-2555.pdf/1.0> (accessed August 13, 2022).
- [50] Rakshit S, Ahmed A, Adiga V, Sundararaj BK, Sahoo PN, Kenneth J, et al. BCG revaccination boosts adaptive polyfunctional Th1/Th17 and innate effectors in IGRA+ and IGRA– Indian adults. *JCI Insight* 2019;4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130540>.
- [51] Cheng Y, Schorey JS. Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Europea Journal Immunology* 2013;43:2379–3290. <https://doi.org/10.1002/eji.201343727>.
- [52] Bitencourt J, Sarno A, Oliveira C, Souza RA de, Lima CC, Takenami I, et al. Comparing cytokine production and clinical response following vaccination with BCG Moreau and BCG Russia strains in a Brazilian infant population. *Vaccine* 2021;39:3189–96. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.028>.
- [53] Yong Kim S, Nair MG, Meera Nair CG. SPECIAL FEATURE REVIEW Macrophages in wound healing: activation and plasticity n.d. <https://doi.org/10.1111/imcb.12236>.

- [54] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets 2011. <https://doi.org/10.1038/nri3073>.
- [55] Zafrilla P, Marhuenda J, Cerdá B, Pérez S, Rius-Pérez S. Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation: A Redox Perspective 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11071394>.
- [56] Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* 2020;877. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.
- [57] Lee KY. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Medical Biological Science and Engineering* 2019;2:1–5. <https://doi.org/10.30579/mbse.2019.2.1.1>.
- [58] Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol* 2019;97:258–67. <https://doi.org/10.1111/imcb.12236>.
- [59] Haoues M, Refai A, Mallavialle A, Ridha Barbouche M, Laabidi N, Deckert M, et al. Forkhead box O3 (FOXO3) transcription factor mediates apoptosis in BCG-infected macrophages 2014. <https://doi.org/10.1111/cmi.12298>.
- [60] Ara A, Ahmed KA, Xiang J. Multiple effects of CD40–CD40L axis in immunity against infection and cancer. *Immunotargets Ther* 2018;Volume 7:55–61. <https://doi.org/10.2147/ITT.S163614>.
- [61] Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 2018;281:8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>.
- [62] Xuan X, Zhang L, Tian C, Wu T, Ye H, Cao J, et al. Interleukin-22 and connective tissue diseases: emerging role in pathogenesis and therapy. *Cell Biosci* 2021;11:2. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00504-1>.
- [63] Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8485–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8485>.
- [64] Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol* 2019;16:634–43. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6>.
- [65] Read KA, Powell MD, Sreekumar BK, Oestreich KJ. In vitro differentiation of effector CD4+ T helper cell subsets. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1960, Humana Press Inc.; 2019, p. 75–84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9167-9_6.
- [66] Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev* 2021;10. <https://doi.org/10.12703/r/10-30>.

- [67] Pan H, Gazarian A, Dubernard J-M, Belot A, Michallet M-C, Michallet M. Transplant Tolerance Induction in Newborn Infants: Mechanisms, Advantages, and Potential Strategies. *Front Immunol* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00116>.
- [68] Smithgall MD, Comeau MR, Park Yoon B-R, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol* 2008;20:1019–30. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn060>.
- [69] Shevryev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100>.
- [70] McAleer JP, Kolls JK. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J Leukoc Biol* 2011;90:263–70. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211099>.
- [71] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015;74:5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>.
- [72] Chen J, Guan L, Tang L, Liu S, Zhou Y, Chen C, et al. T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases n.d. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4729>.
- [73] Jiang Y, Chen J, Bi E, Zhao Y, Qin T, Wang Y, et al. TNF- α enhances Th9 cell differentiation and antitumor immunity via TNFR2-dependent pathways. *J Immunother Cancer* 2019;7:28. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0494-8>.
- [74] Ma CS, Tangye SG, Deenick EK. Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21. *Immunol Cell Biol* 2010;88:621–3. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.73>.
- [75] Jabeen R, Goswami R, Awe O, Kulkarni A, Nguyen ET, Attenasio A, et al. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *Journal of Clinical Investigation* 2013;123:4641–53. <https://doi.org/10.1172/JCI69489>.
- [76] Ramming A, Druzd D, Leipe J, Schulze-Koops H, Skapenko A. Maturation-related histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development. *Blood* 2012;119:4665–74. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-392589>.
- [77] Chang H-C, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* 2010;11:527–34. <https://doi.org/10.1038/ni.1867>.

- [78] Vyas SP, Goswami R. A Decade of Th9 Cells: Role of Th9 Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01139>.
- [79] Goswami R, Kaplan MH. Gcn5 Is Required for PU.1-Dependent IL-9 Induction in Th9 Cells. *The Journal of Immunology* 2012;189:3026–33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201496>.
- [80] Chapoval S, Dasgupta P, Dorsey NJ, Keegan AD. Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6. *J Leukoc Biol* 2010;87:1011–8. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209772>.
- [81] Benevides L, Costa RS, Tavares LA, Russo M, Martins GA, da Silva LLP, et al. B lymphocyte–induced maturation protein 1 controls TH9 cell development, IL-9 production, and allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2019;143:1119-1130.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.046>.
- [82] Dumoutier L, Louahed J, Renauld J-C. Cloning and Characterization of IL-10-Related T Cell-Derived Inducible Factor (IL-TIF), a Novel Cytokine Structurally Related to IL-10 and Inducible by IL-9. *The Journal of Immunology* 2000;164:1814–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.1814>.
- [83] Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells. *Nat Immunol* 2009;10:864–71. <https://doi.org/10.1038/ni.1770>.
- [84] Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;10:857–63. <https://doi.org/10.1038/ni.1767>.
- [85] Jia L, Wu C. *The Biology and Functions of Th22 Cells*, 2014, p. 209–30. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9487-9_8.
- [86] Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. Cxc Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. *Journal of Experimental Medicine* 2000;192:1553–62. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1553>.
- [87] Breitfeld D, Ohi L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and

- Support Immunoglobulin Production. *Journal of Experimental Medicine* 2000;192:1545–52. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1545>.
- [88] Alonso GT, Fomin DS, Rizzo LV. Human follicular helper T lymphocytes critical players in antibody responses. *Einstein (São Paulo)* 2021;19. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021RB6077.
- [89] Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *The Journal of Immunology* 2008;181:1767–79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1767>.
- [90] Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 2010;11:535–42. <https://doi.org/10.1038/ni.1877>.
- [91] Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of Inflammation, Cytokine Expression, and Germinal Center Formation by BCL-6. *Science* (1979) 1997;276:589–92. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.589>.
- [92] Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:22–33. <https://doi.org/10.1038/nri2217>.
- [93] Saraav I, Singh S, Pandey K, Sharma M, Sharma S. Mycobacterium tuberculosis MymA is a TLR2 agonist that activate macrophages and a TH1 response. *Tuberculosis* 2017;106:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.05.005>.
- [94] Zeng Y, Wang L, Zhou H, Qi Y. A meta-analysis of Th1 and Th2 cytokine profiles differentiating tuberculous from malignant pleural effusion. *Scientific Reports |* 2022;12:2743. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06685-8>.
- [95] Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan H, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol* 2011;4. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.3>.
- [96] Silva A, Ponte C, Antas PRZ. What a difference a strain makes! *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2019;23:874–874. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0820>.
- [97] Simas CJA, Silva DPH, Ponte CGG, Castello-Branco LRR, Antas PRZ. Patterns of in vitro cell-death, metalloproteinase-9 and pro-inflammatory cytokines in human

- monocytes induced by the BCG vaccine, moreau strain. *Vaccine* 2011;29:6446–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.093>.
- [98] Ponte C, Hacker M, Moraes M, Castello-Branco L, Silva F, Antas P. The patterns of in vitro cell-death and inflammatory cytokines induced by distinct BCG vaccine strains are differentially induced in human mononuclear cells. *Hum Vaccin Immunother* 2018;14:28–35. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1382788>.
- [99] Benn CS, Roth A, Garly M -L., Fisker AB, Schartz-Buchholzer F, Timmermann A, et al. BCG scarring and improved child survival: a combined analysis of studies of BCG scarring. *J Intern Med* 2020;288:614–24. <https://doi.org/10.1111/joim.13084>.
- [100] Bickett TE, McLean J, Creissen E, Izzo L, Hagan C, Izzo AJ, et al. Characterizing the BCG Induced Macrophage and Neutrophil Mechanisms for Defense Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01202>.
- [101] Abadie V, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJM, Tanguy M, et al. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 2005;106:1843–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1281>.
- [102] Khader SA, Divangahi M, Hanekom W, Hill PC, Maeurer M, Makar KW, et al. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. *Journal of Clinical Investigation* 2019;129:3482–91. <https://doi.org/10.1172/JCI128877>.
- [103] Li J, Zhan L, Qin C. The double-sided effects of *Mycobacterium Bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccine. *Npj Vaccines* 2021;6:14. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00278-0>.
- [104] Sendide K, Reiner NE, Lee JSI, Bourgoin S, Talal A, Hmama Z. Cross-Talk between CD14 and Complement Receptor 3 Promotes Phagocytosis of Mycobacteria: Regulation by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Cytohesin-1. *The Journal of Immunology* 2005;174:4210–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4210>.
- [105] Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol* 2003;74:277–86. <https://doi.org/10.1189/jlb.0103026>.

- [106] Linehan SA. The Mannose Receptor is Expressed by Subsets of APC in non-Lymphoid Organs. *BMC Immunol* 2005;6:4. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-6-4>.
- [107] Bugarcic A, Hitchens K, Beckhouse AG, Wells CA, Ashman RB, Blanchard H. Human and mouse macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) bind *Candida albicans*. *Glycobiology* 2008;18:679–85. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn046>.
- [108] Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Immune Responses to *Bacillus Calmette–Guérin* Vaccination: Why Do They Fail to Protect against *Mycobacterium tuberculosis*? *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00407>.
- [109] Sugisaki K, Dannenberg AM, Abe Y, Tsuruta J, Su W-J, Said W, et al. Nonspecific and immune-specific up-regulation of cytokines in rabbit dermal tuberculous (BCG) lesions. *J Leukoc Biol* 1998;63:440–50. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.4.440>.
- [110] Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984–93. <https://doi.org/10.1038/nri1246>.
- [111] Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonça LE, Pacis A, et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 2018;172:176-190.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.031>.
- [112] Arts RJW, Moorlag SJCFM, Novakovic B, Li Y, Wang S-Y, Oosting M, et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe* 2018;23:89-100.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.010>.
- [113] Brook B, Harbeson DJ, Shannon CP, Cai B, He D, Ben-Othman R, et al. BCG vaccination–induced emergency granulopoiesis provides rapid protection from neonatal sepsis. *Sci Transl Med* 2020;12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax4517>.
- [114] Antas P, Silva A, Pereira E, Ponte C. Technical comment on: BCG vaccination-induced emergency granulopoiesis provides rapid protection from neonatal sepsis (eLetter). *Sci Transl Med* 2021;12:1.
- [115] Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, de Groote D, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin* vaccination. *J Immunol* 1999;163:2249–55.

- [116] Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Immune Responses to Bacillus Calmette–Guérin Vaccination: Why Do They Fail to Protect against Mycobacterium tuberculosis? *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00407>.
- [117] Lewinsohn DA, Lewinsohn DM, Scriba TJ. Polyfunctional CD4+ T Cells As Targets for Tuberculosis Vaccination. *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01262>.
- [118] Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 2007;8:369–77. <https://doi.org/10.1038/ni1449>.
- [119] Darrah PA, Zeppa JJ, Maiello P, Hackney JA, Wadsworth MH, Hughes TK, et al. Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. *Nature* 2020;577:95–102. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1817-8>.
- [120] Jaron B, Maranghi E, Leclerc C, Majlessi L. Effect of Attenuation of Treg during BCG Immunization on Anti-Mycobacterial Th1 Responses and Protection against Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* 2008;3:e2833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002833>.
- [121] Quinn KM, Rich FJ, Goldsack LM, de Lisle GW, Buddle BM, Delahunt B, et al. Accelerating the secondary immune response by inactivating CD4+CD25+ T regulatory cells prior to BCG vaccination does not enhance protection against tuberculosis. *Eur J Immunol* 2008;38:695–705. <https://doi.org/10.1002/eji.200737888>.
- [122] Madura Larsen J, Stabell Benn C, Fillie Y, van der Kleij D, Aaby P, Yazdanbakhsh M. BCG stimulated dendritic cells induce an interleukin-10 producing T-cell population with no T helper 1 or T helper 2 bias in vitro. *Immunology* 2007;121:276–82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02575.x>.
- [123] Pitt JM, Stavropoulos E, Redford PS, Beebe AM, Bancroft GJ, Young DB, et al. Blockade of IL-10 Signaling during Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Enhances and Sustains Th1, Th17, and Innate Lymphoid IFN- γ and IL-17 Responses and Increases Protection to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology* 2012;189:4079–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201061>.

- [124] Ferreira CM, Micheli C, Barreira-Silva P, Barbosa AM, Resende M, Vilanova M, et al. IL-10 Overexpression After BCG Vaccination Does Not Impair Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.946181>.
- [125] Covián C, Fernández-Fierro A, Retamal-Díaz A, Díaz FE, Vasquez AE, Lay MK, et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02806>.
- [126] Fritschi N, Curtis N, Ritz N. Bacille Calmette Guérin (BCG) and new TB vaccines: Specific, cross-mycobacterial and off-target effects. *Paediatr Respir Rev* 2020;36:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2020.08.004>.
- [127] Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13:217–33. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.22>.
- [128] Moorlag SJCFM, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clinical Microbiology and Infection* 2019;25:1473–8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.020>.
- [129] Fritschi N, Curtis N, Ritz N. Bacille Calmette Guérin (BCG) and new TB vaccines: Specific, cross-mycobacterial and off-target effects. *Paediatr Respir Rev* 2020;36:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2020.08.004>.
- [130] Anderson FD, Ushijima RN, Larson CL. Recurrent herpes genitalis. Treatment with Mycobacterium bovis (BCG). *Obstetrics and Gynecology* 1974;43:797–805.
- [131] Moorlag SJCFM, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clinical Microbiology and Infection* 2019;25:1473–8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.020>.
- [132] Sharma A. Epidemiological transcriptomic data supports BCG protection in viral diseases including COVID-19. *Gene* 2021;783:145574. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145574>.
- [133] Han J, Gu X, Li Y, Wu Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020;129:110393. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110393>.

- [134] El-Zein M, Conus F, Benedetti A, Menzies D, Parent M-E, Rousseau M-C. Association Between Bacillus Calmette-Guérin Vaccination and Childhood Asthma in the Quebec Birth Cohort on Immunity and Health. *Am J Epidemiol* 2017;186:344–55. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx088>.
- [135] Doupis J, Kolokathis K, Markopoulou E, Efthymiou V, Festas G, Papandreopoulou V, et al. The Role of Pediatric BCG Vaccine in Type 1 Diabetes Onset. *Diabetes Therapy* 2021;12:2971–6. <https://doi.org/10.1007/s13300-021-01163-2>.
- [136] Nakken O, Holmøy T, Stigum H, Myhr K-M, Dahl J, Heldal E, et al. Strong tuberculin response after BCG vaccination is associated with low multiple sclerosis risk: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol* 2022;51:1637–44. <https://doi.org/10.1093/ije/dyac039>.
- [137] Kowalewicz-Kulbat M, Loch C. BCG and protection against inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines* 2017;16:699–708. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1333906>.
- [138] D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019;43:582–92. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- [139] D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019;43:582–92. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- [140] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25:486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- [141] Lossi L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochemical Journal* 2022;479:357–84. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210854>.
- [142] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25:486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- [143] Nuñez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990;144:3602–10.

- [144] Nuñez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994;4:399–403. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90053-1).
- [145] Brumatti G, Salmanidis M, Ekert PG. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67:1619–30. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0288-8>.
- [146] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>.
- [147] Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 2016;16:20–33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>.
- [148] Vitale I, Manic G, de Maria R, Kroemer G, Galluzzi L. DNA Damage in Stem Cells. *Mol Cell* 2017;66:306–19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.006>.
- [149] Pihán P, Carreras-Sureda A, Hetz C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ* 2017;24:1478–87. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.82>.
- [150] Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:621–32. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>.
- [151] Stock P, Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Respiratory Tolerance Is Inhibited by the Administration of Corticosteroids. *The Journal of Immunology* 2005;175:7380–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7380>.
- [152] Miller TA, Schaefer FW. Changes in mouse circulating leukocyte numbers in C57BL/6 mice immunosuppressed with dexamethasone for *Cryptosporidium parvum* oocyst production. *Vet Parasitol* 2007;149:147–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.017>.
- [153] Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2018;25:65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>.

- [154] Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu H-C, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ-D, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 2006;8:1348–58. <https://doi.org/10.1038/ncb1499>.
- [155] Certo M, Moore VDG, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 2006;9:351–65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.027>.
- [156] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>.
- [157] Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *The FASEB Journal* 2000;14:729–39. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.5.729>.
- [158] Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;14:1237–43. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>.
- [159] Chai J, Du C, Wu J-W, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;406:855–62. <https://doi.org/10.1038/35022514>.
- [160] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* 2000;102:43–53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00009-X).
- [161] Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie* 2017;135:111–25. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.001>.
- [162] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* 2000;102:43–53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00009-X).
- [163] Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the Nervous System. *J Neurochem* 2001;74:1–20. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740001.x>.

- [164] Gibert B, Mehlen P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Res* 2015;75:5171–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3652>.
- [165] Wajant H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science* (1979) 2002;296:1635–6. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>.
- [166] von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2017;17:352–66. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.28>.
- [167] Zhou X, Jiang W, Liu Z, Liu S, Liang X. Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses* 2017;9:316. <https://doi.org/10.3390/v9110316>.
- [168] Marchetti L, Bonsignore F, Gobbo F, Amodeo R, Calvello M, Jacob A, et al. Fast-diffusing p75^{NTR} monomers support apoptosis and growth cone collapse by neurotrophin ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019;116:21563–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902790116>.
- [169] Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, et al. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ* 2011;18:948–58. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.162>.
- [170] Bridgham J, Wilder J, Hollocher H, Johnson A. All in the family: evolutionary and functional relationships among death receptors. *Cell Death Differ* 2003;10:19–25. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401174>.
- [171] Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal* 2009;23:1625–37. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>.
- [172] Morgan M, Thorburn J, Pandolfi PP, Thorburn A. Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *Journal of Cell Biology* 2002;157:975–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204039>.
- [173] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang C-P, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673–82. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90057-8](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90057-8).
- [174] Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang C-P, DuBose RF, et al. Cloning and Characterization of TRAIL-R3, a Novel Member of the Emerging TRAIL

- Receptor Family. *Journal of Experimental Medicine* 1997;186:1165–70. <https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1165>.
- [175] Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity* 1997;7:813–20. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80399-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80399-4).
- [176] Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol* 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00091>.
- [177] Zeng L, Li T, Xu DC, Liu J, Mao G, Cui M-Z, et al. Death Receptor 6 Induces Apoptosis Not through Type I or Type II Pathways, but via a Unique Mitochondria-dependent Pathway by Interacting with Bax Protein. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:29125–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362038>.
- [178] Hu X, Li Z, Lin R, Shan J, Yu Q, Wang R, et al. Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Front Cell Dev Biol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634690>.
- [179] Demchenko AP. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* 2013;65:157–72. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9481-y>.
- [180] Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016;2016:pdb.prot087163. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163>.
- [181] Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006;1:1458–61. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>.
- [182] Bakhru P, Sirisaengtaksin N, Soudani E, Mukherjee S, Khan A, Jagannath C. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. *Cell Immunol* 2014;287:53–61. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.11.007>.
- [183] Giri PK, Schorey JS, Bishai W, Hopkins J. Exosomes Derived from *M. Bovis* BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4 + and CD8 + T Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 2008;18:2461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002461>.

- [184] Jeevan A, Majorov K, Sawant K, Cho H, McMurray DN. Lung macrophages from bacille Calmette–Guérin-vaccinated guinea pigs suppress T cell proliferation but restrict intracellular growth of *M. tuberculosis* after recombinant guinea pig interferon- γ activation. *Clin Exp Immunol* 2007;149:387–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03425.x>.
- [185] Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 2003;9:1039–46. <https://doi.org/10.1038/nm906>.
- [186] Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et al. Apoptotic Vesicles Crossprime CD8 T Cells and Protect against Tuberculosis. *Immunity* 2006;24:105–17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.001>.
- [187] Farinacci M, Weber S, Kaufmann SHE. The recombinant tuberculosis vaccine rBCG Δ ureC::hly+ induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine* 2012;30:7608–14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.031>.
- [188] Hinchey J, Jeon BY, Alley H, Chen B, Goldberg M, Derrick S, et al. Lysine auxotrophy combined with deletion of the SecA2 gene results in a safe and highly immunogenic candidate live attenuated vaccine for tuberculosis. *PLoS One* 2011;6:e15857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015857>.
- [189] Gengenbacher M, Nieuwenhuizen N, Vogelzang A, Liu H, Kaiser P, Schuerer S, et al. Deletion of *nuoG* from the Vaccine Candidate *Mycobacterium bovis* BCG Δ ureC::hly Improves Protection against Tuberculosis. *MBio* 2016;7. <https://doi.org/10.1128/mBio.00679-16>.
- [190] Gartner T, Romano M, Suin V, Kalai M, Korf H, de Baetselier P, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine co-expressing pro-apoptotic caspase-3. *Vaccine* 2008;26:1458–70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.056>.
- [191] Li G, Liu G, Song N, Kong C, Huang Q, Su H, et al. A novel recombinant BCG-expressing pro-apoptotic protein BAX enhances Th1 protective immune responses in mice. *Mol Immunol* 2015;66:346–56. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.003>.
- [192] Bouzeyen R, Chugh S, Gosain TP, Barbouche M-R, Haoues M, Rao KVS, et al. Co-Administration of Anticancer Candidate MK-2206 Enhances the Efficacy of BCG

- Vaccine Against *Mycobacterium tuberculosis* in Mice and Guinea Pigs. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645962>.
- [193] Sendide K, Deghmane A-E, Pechkovsky D, Av-Gay Y, Talal A, Hmama Z. *Mycobacterium bovis* BCG Attenuates Surface Expression of Mature Class II Molecules through IL-10-Dependent Inhibition of Cathepsin S. *The Journal of Immunology* 2005;175:5324–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5324>.
- [194] Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology* 2008;180:5771–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>.
- [195] Lau GW, Zhu L, Paula Junqueira-Kipnis A, Adriana Mata-Espinosa D, Hernández-Pando R, la Rosa-Velázquez DI, et al. Evidence for the Effect of Vaccination on Host-Pathogen Interactions in a Murine Model of Pulmonary Tuberculosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Immunology | WwwFrontiersinOrg* 2020;1:930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00930>.
- [196] Pedroza-Roldán C, Guapillo C, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D, Aceves-Sánchez M de J, Marquina-Castillo B, et al. The BCG Δ BCG1419c strain, which produces more pellicle in vitro, improves control of chronic tuberculosis in vivo. *Vaccine* 2016;34:4763–70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.035>.
- [197] Dagg B, Hockley J, Rigsby P, Ho MM. The establishment of sub-strain specific WHO Reference Reagents for BCG vaccine. *Vaccine* 2014;32:6390–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.065>.
- [198] Bitencourt J, Sarno A, Oliveira C, Souza RA de, Lima CC, Takenami I, et al. Comparing cytokine production and clinical response following vaccination with BCG Moreau and BCGRussia strains in a Brazilian infant population. *Vaccine* 2021;39:3189–96. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.028>.
- [199] Benn CS, Fisker AB, Rieckmann A, Sørup S, Aaby P. Vaccinology: time to change the paradigm? *Lancet Infect Dis* 2020;20:e274–83. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30742-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30742-X).
- [200] Ritz N, Curtis N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. *Tuberculosis* 2009;89:248–51. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.03.002>.

- [201] Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan H, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol* 2011;4. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.3>.
- [202] ThermoFisher Scientific. PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit. Carlsbad: 2016.
- [203] Antas PRZ, Ponte CGG, Almeida MR, Albuquerque LHP, Sousa-Vasconcelos PS, Pedro T, et al. The in vitro *Mycobacterium bovis* BCG Moreau infection of human monocytes that induces Caspase-1 expression, release and dependent cell death is mostly reliant upon cell integrity. *J Inflamm* 2019;16:18. <https://doi.org/10.1186/s12950-019-0223-1>.
- [204] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980;26:171–6. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>.
- [205] Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997;65:298–304. <https://doi.org/10.1128/iai.65.1.298-304.1997>.
- [206] Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991;88:8485–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8485>.
- [207] Xuan X, Zhang L, Tian C, Wu T, Ye H, Cao J, et al. Interleukin-22 and connective tissue diseases: emerging role in pathogenesis and therapy. *Cell Biosci* 2021;11:2. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00504-1>.
- [208] Pfaffl MW. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:36e–36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- [209] Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, et al. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol* 1999;66:763–4. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.763>.
- [210] Mehaffy C, Ryan JM, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Extracellular Vesicles in *Mycobacteria* and Tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.912831>.

- [211] Prados-Rosales R, Weinrick BC, Piqué DG, Jacobs WR, Casadevall A, Rodriguez GM. Role for Mycobacterium tuberculosis Membrane Vesicles in Iron Acquisition. *J Bacteriol* 2014;196:1250–6. <https://doi.org/10.1128/JB.01090-13>.
- [212] Ponte C, Peres L, Marinho S, Lima J, Siqueira M, Pedro T, et al. In vitro T-cell profile induced by BCG Moreau in healthy Brazilian volunteers. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11:450–7. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.970954>.
- [213] Lima J, Siqueira M, Pedro T, Ponte C, Peres L, Marinho S, et al. The role of host soluble inflammatory mediators induced by the BCG vaccine for the initiation of in vitro monocyte apoptosis in healthy Brazilian volunteers. *J Inflamm* 2015;12:60. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0105-0>.
- [214] Mcaleer JP, Kolls JK. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J Leukoc Biol* 2011;90:263–70. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211099>.
- [215] Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014;71:659–72. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1457-3>.
- [216] Lozza L, Farinacci M, Faé K, Bechtle M, Stäber M, Dorhoi A, et al. Crosstalk between human DC subsets promotes antibacterial activity and CD8⁺ T-cell stimulation in response to bacille Calmette-Guérin. *Eur J Immunol* 2014;44:80–92. <https://doi.org/10.1002/eji.201343797>.
- [217] Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LAB, Ifrim DC, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:17537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109>.
- [218] Jensen KJ, Larsen N, Biering-Sørensen S, Andersen A, Eriksen HB, Monteiro I, et al. Heterologous Immunological Effects of Early BCG Vaccination in Low-Birth-Weight Infants in Guinea-Bissau: A Randomized-controlled Trial. *J Infect Dis* 2015;211:956–67. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu508>.
- [219] Bernatowska E, Pac M, Heropolitańska-Pliszka E, Pietrucha B, Dąbrowska-Leonik N, Skomska-Pawliszak M, et al. BCG Moreau Polish Substrain Infections in Patients With Inborn Errors of Immunity: 40 Years of Experience in the Department of Immunology, Children’s Memorial Health Institute, Warsaw. *Front Pediatr* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.839111>.

- [220] da Silva ASM, Albuquerque LHP, de Ponte CGG, de Almeida MR, de Faria SER, Ribeiro M da S, et al. Time to face the proofs: the BCG Moreau vaccine promotes superior inflammatory cytokine profile *in vitro* when compared with Russia, Pasteur, and Danish strains. *Hum Vaccin Immunother* 2022;18. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1989913>.
- [221] Showalter A, Limaye A, Oyer JL, Igarashi R, Kittipatarin C, Copik AJ, et al. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine* 2017;97:123–32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.024>.
- [222] Kraft JD, Horzempa J, Davis C, Jung J-Y, Peña MMO, Robinson CM. Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses. *Immunology* 2013;139:484–93. <https://doi.org/10.1111/imm.12095>.

ANEXO I

Tabela 5. Níveis de citocinas induzidas pelos BCG Moreau RDJ e Russia após infecção de 48 horas no grupo de células de linhagem THP-1 e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) .IL-1 β e IL-17 para THP-1 (n = 9) e PBMC (n = 14), IL-23, IL-27, TGF- β e TIMP1 para PBMC (n = 5) pela técnica ELISA, e as citocinas IFN γ , IL-10, IL-17A, IL17F, IL-1 β , IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IL-4, IL6, sCD-40L e TNF para PBMC (n = 10) pela técnica Luminex. Valores de mediana, intervalo interquartil (IQR).

	<i>Controle Negativo</i>		<i>BCG Russia</i>		<i>BCG Moreau RDJ</i>	
	<i>Mediana</i>	<i>IQR</i>	<i>Mediana</i>	<i>IQR</i>	<i>Mediana</i>	<i>IQR</i>
Luminex PBMC						
IL-1 β	60,34	1,13 - 2612,00	167,30	31,82 - 2046,00	5229,00	944,30 - 6456,00
IL-4	14,06	11,19 - 52,40	28,27	13,12 - 49,64	56,51	49,40 - 58,63
IL-6	340,60	28,80 - 505,60	429,40	249,10 - 566,50	617,90	455,60 - 857,80
IL-10	34,91	6,97 - 68,37	101,40	34,65 - 287,30	148,00	58,31 - 482,60
IL-17A	9,97	3,31 - 23,53	16,38	6,86 - 27,92	27,87	24,88 - 32,53
IL-17F	40,41	18,91 - 99,36	66,49	18,91 - 106,10	92,92	81,39 - 193,60
IL-21	467,30	10,22 - 4727,00	1249,00	293,20 - 4189,00	5843,00	4264,00 - 6520,00
IL-22	38,36	5,60 - 70,66	60,37	23,58 - 68,65	93,21	62,40 - 238,30
IL-23	41,32	7,68 - 200,70	80,87	30,58 - 182,80	241,90	225,60 - 281,40
IL-25	5,75	1,12 - 24,23	11,58	4,21 - 22,84	27,00	22,49 - 29,01
IL-31	381,80	150,90 - 1394,00	709,70	286,90 - 1270,00	1495,00	1163,00 - 1588,00
IL-33	10,39	10,39 - 25,38	12,36	10,39 - 22,65	26,55	22,86 - 29,04
IFN- γ	14,55	2,54 - 35,80	59,95	9,85 - 81,24	753,90	238,40 - 19926,00
sCD-40L	32,69	8,89 - 72,25	45,19	19,64 - 65,84	80,10	56,96 - 87,17
TNF α	168,90	25,39 - 2800,00	354,00	61,36 - 2968,00	8330,00	4130,00 - 8330,00
ELISA PBMC						
IL-1 β	670,00	191,80 - 1058,00	712,20	293,40 - 1321,00	1057,00	1015,00 - 1147,00
IL-23	35,00	13,15 - 59,85	6,50	1,40 - 58,55	5,00	3,95 - 6,55
TGF- β	2,43	2,27 - 2,66	2,41	2,318 - 2,65	2,24	2,21 - 2,62
IL-17	4,20	1,70 - 6,60	4,40	0,45 - 13,25	5,00	3,95 - 6,55
IL-27	98,00	98,00 - 178,10	98,00	98,00 - 256,80	98,00	98,00 - 941,20
TIMP-1	7720,00	3735,00 - 8340,00	6816,00	5658,00 - 7866,00	6714,00	5093,00 - 7816,00
ELISA THP-1						
IL-1 β	1,66	1,35 - 2,40	1,34	1,09 - 1,62	2,37	2,14 - 2,75
IL-27	98,00	98,00 - 161,50	98,00	98,00 - 262,80	240,50	98,00 - 1320,00

Tabela 6. Correlação entre os níveis e padrão de morte celular e citocina dosadas pelo ELISA partir dos estímulos com BCG Moreau RDJ e BCG Russia após infecção por 48 horas em linhagem THP1 e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). IL-1 β , IL-17, IL-23, IL-27, TGF β e TIMP-1 para PBMC (n=9), IL-1 β e IL-27 para THP-1 (n = 7). p * \leq 0,05, p ** \leq 0,005, de acordo com o teste pareado de Spearman.

Citocinas PBMC		BCG Russia		BCG Moreau	
		Anexina-V+/PI+	Anexina-V+/PI-	Anexina-V+/PI+	Anexina-V+/PI-
IL-1 β	rho	0,16	0,51	0,03	0,25
	p value	0,573 (ns)	0,067 (ns)	0,94 (ns)	0,451 (ns)
IL-17	rho	-0,10	0,00	-0,21	-0,31
	p value	0,95 (ns)	>,999 (ns)	0,767 (ns)	0,667 (ns)
IL-23	rho	0,50	0,60	0,90	0,90
	p value	0,45 (ns)	0,35 (ns)	0,083 (ns)	0,083 (ns)
IL-27	rho	-0,49	-0,40	-0,28	-0,79
	p value	0,032 (ns)	0,092 (ns)	0,318 (ns)	0,048 (*)
TGF β	rho	0,10	0,30	-0,80	-0,30
	p value	0,95 (ns)	0,683 (ns)	0,133 (ns)	0,683 (ns)
TIMP-1	rho	0,2	0,1	-0,6	-0,1
	p value	0,783 (ns)	0,95 (ns)	0,35 (ns)	0,95 (ns)
Citocinas THP-1					
IL-1 β	rho	-0,49	0,29	0,93	0,82
	p value	0,273 (ns)	0,513 (ns)	0,007 (**)	0,034 (*)
IL-27	rho	-0,08	0,17	-0,18	-0,23
	p value	0,867 (ns)	0,705 (ns)	0,701 (ns)	0,613 (ns)

Tabela 7. Correlação entre os níveis e padrão de morte celular e citocinas dosadas pelo Luminex partir dos estímulos com BCG Moreau RDJ e BCG Russia após infecção por 48 horas em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). IFN γ , IL-10, IL-17A, IL17F, IL-1 β , IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IL-4, IL-6, sCD-40L, IMP-1 (n = 9). p * \leq 0,05, de acordo com o teste pareado de Spearman.

Citocinas PBMC		BCG Russia		BCG Moreau	
		Anexina-V+/PI+	Anexina-V+/PI-	Anexina-V+/PI+	Anexina-V+/PI-
IFN γ	rho	0,37	0,15	0,33	-0,33
	p value	0,296 (ns)	0,682 (ns)	0,385 (ns)	0,385 (ns)
IL-10	rho	0,29	0,09	-0,67	-0,72
	p value	0,42 (ns)	0,804 (ns)	0,059 (ns)	0,037 (*)
IL-17A	rho	0,32	0,08	-0,17	-0,55
	p value	0,368 (ns)	0,838 (ns)	0,666 (ns)	0,128 (ns)
IL-17F	rho	0,08	-0,18	-0,03	-0,67
	p value	0,835 (ns)	0,627 (ns)	0,948 (ns)	0,059 (ns)
IL-1 β	rho	0,37	0,15	-0,35	-0,72
	p value	0,296 (ns)	0,682 (ns)	0,359 (ns)	0,037 (*)
IL-21	rho	0,37	0,15	0,13	-0,62
	p value	0,296 (ns)	0,682 (ns)	0,744 (ns)	0,086 (ns)
IL-22	rho	0,35	0,09	0,02	-0,73
	p value	0,33 (ns)	0,811 (ns)	0,982 (ns)	0,031 (*)
IL-23	rho	0,32	0,13	0,20	-0,53
	p value	0,368 (ns)	0,733 (ns)	0,613 (ns)	0,148 (ns)
IL-25	rho	0,32	0,13	0,10	-0,50
	p value	0,368 (ns)	0,733 (ns)	0,81 (ns)	0,178 (ns)
IL-31	rho	0,79	0,14	-0,10	-0,53
	p value	0,028 (*)	0,699 (ns)	0,81 (ns)	0,148 (ns)
IL-33	rho	0,59	0,37	-0,17	-0,51
	p value	0,08 (ns)	0,296 (ns)	0,668 (ns)	0,169 (ns)
IL-4	rho	0,79	0,14	0,10	-0,49
	p value	0,028 (*)	0,699 (ns)	0,8 (ns)	0,187 (ns)
IL-6	rho	-0,22	-0,56	0,07	-0,72
	p value	0,537 (ns)	0,096 (ns)	0,88 (ns)	0,037 (*)
sCD-40L	rho	0,24	0,13	-0,48	-0,57
	p value	0,507 (ns)	0,725 (ns)	0,194 (ns)	0,121 (ns)
TNF α	rho	0,44	0,19	0,55	-0,05
	p value	0,199 (ns)	0,599 (ns)	0,13 (ns)	0,898 (ns)

ANEXO II

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

RELATÓRIO DAS ATIVIDADES REALIZADAS EM TRABALHO DE CAMPO

Discente: Andreon Santos Machado da Silva

Vínculo: Mestrado no Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do IOC

Projeto: Avaliação *in vitro* do padrão de morte celular, expressão e níveis de citocinas inflamatórias por diferentes cepas da vacina BCG em células mononucleares humanas

Orientador: Dr. Paulo Renato Zuquim Antas do Laboratório de Imunologia Clínica (IOC)

Coorientadora: Dra. Tatiana Pereira da Silva do Laboratório de Hanseníase (IOC)

Supervisores das Atividades: Dr. Lucas de Lima Nogueira, Dra. Soraya de Oliveira Sancho, Discentes Paulo Rafael Cardoso de Sousa e Thales Alves Campelo.

Laboratório Alocado: Laboratório de Pesquisa em Micobactérias (UFC).

Período das Atividades de Campo: 27/06/2022 até 1º/07/2022.

Rio de Janeiro

2022

RESUMO DAS ATIVIDADES

Os integrantes deste projeto de pesquisa, formado pelo discente Andreon Santos Machado da Silva, aluno de mestrado no Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical (PGMT), matrícula 20.02.2.7.003, orientado pelo Dr. Paulo Renato Zuquim Antas do Laboratório de Imunologia Clínica (LIC) e coorientado pela Dra. Tatiana Pereira da Silva do Laboratório de Hanseníase (LAHAN), além daqueles colaboradores da UFC, viram a necessidade de um treinamento do discente no aprendizado da técnica de qRT-PCR em tempo-real. Assim, foi solicitada uma ajuda de custo a PGMT para um trabalho de campo, realizado no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias (LabMico) na Universidade Federal do Ceará (UFC), supervisionado pelo Dr. Lucas de Lima Nogueira, no período de 26 de junho de 2022 a 02 de julho de 2022.

Inicialmente, foi realizada uma rodada de apresentação de toda a equipe do LabMico, bem como toda a sua infraestrutura, explicação de cada ferramenta e aparelhos utilizados para biologia molecular, tais como: micropipetas específicas para cada etapa do processo, kit de extração de RNA, biorrepositório de amostras, vórtex, centrífuga ajustada para ultra centrifugação, *Nanodrop* para quantificação da concentração e pureza do RNA extraído, sala de realização da PCR convencional, local de realização da corrida de gel de eletroforese, reagentes para síntese do gel de eletroforese, fonte de voltagem para corrida do gel de eletroforese, descarte de materiais pós utilização da corrida do gel de eletroforese, Transiluminador-UV, programa utilizado para leitura do gel de eletroforese, local de realização da PCR quantitativo em tempo-real, programa para a análise das curvas de amplificação. Todos os processos de manipulação de RNA, do DNA, PCR Convencional, Eletroforese e PCR quantitativo em tempo-real são realizados em ambientes específicos, separados, para evitar contaminação cruzada.

Para entender todo o processo da biologia molecular, um treinamento e simulação da síntese dos *primers* pela ferramenta *Integrated DNA Technologies* (IDT) foi realizado com auxílio do banco de genes do *National Library of Medicine* (NIH) para sua identificação, em relação aos alvos específicos de nosso estudo. Para validação do kit de extração de RNA, a extração de RNA e quantificação da sua concentração e pureza pelo *Nanodrop*, em amostras já utilizadas, foi realizada com todos os parâmetros conhecidos. A partir disso, seguimos com os cálculos, reconstituição, diluição e alíquotagem dos *primers* anteriormente sintetizados daqueles alvos do estudo.

Para validar a amplificação e tamanho de pares de bases do *primer* controle positivo GAPDH sintetizado anteriormente, seguimos com a PCR convencional e eletroforese de amostras clínicas já conhecidas. Assim, sua amplificação e tamanho de pares de bases na eletroforese foi confirmada, utilizando a banda de marcador de peso molecular como parâmetro.

Com as etapas anteriormente validadas, a síntese do cDNA do GAPDH foi realizada, para posterior amplificação na PCR quantitativa em tempo-real e avaliação de sua curva de eficiência.

METODOLOGIA E RESULTADOS REALIZADOS NO TRABALHO DE CAMPO

- Validação do kit de extração de RNA

Para a validação do novo kit de extração de RNA (Invitrogen - Pure Link - Cat. 12280-050), a extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo do fabricante, em dois grupos de amostras que foram extraídas anteriormente usando de um outro kit de extração de RNA alternativo (QIAGEN - QIAamp - Cat. No. 52904). Neste, os valores de contração e pureza de RNA foram satisfatórios para a futura síntese de cDNA. Como pode ser visto abaixo em 1.1, a concentração e a pureza das amostras de RNA extraídas foram avaliadas no Nanodrop (ThermoScientific NanoDrop 1000).

- Valores de concentração e pureza das amostras em RNA

Mapa da Quantificação 28/06/2022

ID	Amostra	ng/uL	260/280	260/230
1	G180	9,5	0,78	0,71
2	02 C465	4,8	1,13	0,6
3	02 G338	4,1	0,85	0,63
4	02 G122	3,0	2,12	0,42
5	02 A349	5,4	0,96	0,49
6	02 G25	6,6	1,24	0,71
7	02 C488	6,8	1,43	0,72
8	02 C476	1,6	-1,54	10,87
9	02 C530	8,2	2,09	1,33
10	02 C221	6,6	1,61	0,61

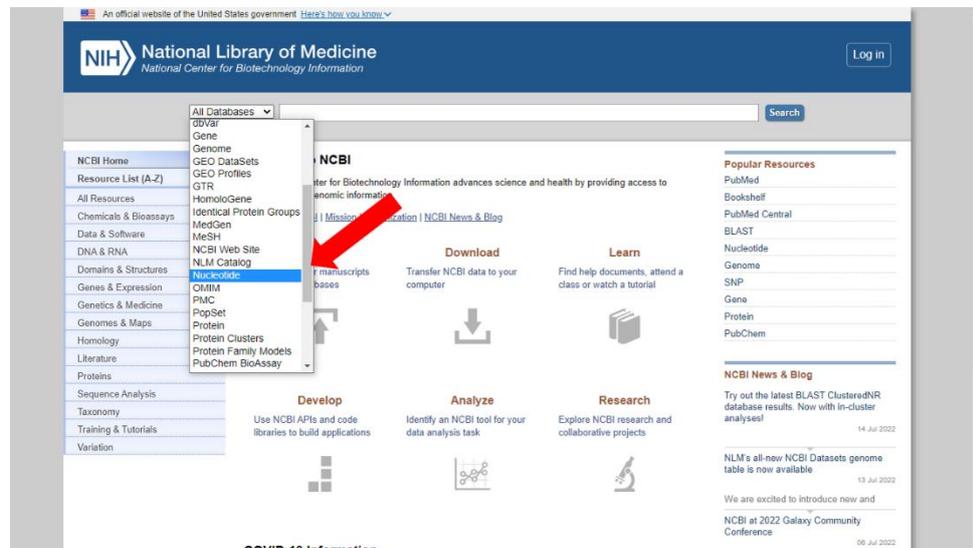
- Validação do kit de síntese de cDNA

A fim de validar o novo kit de síntese de cDNA (Invitrogen - MASTER MIX SUPERScrip IV VILO - Cat. 11766500), um grupo de amostras foi utilizado, onde nestas já foram realizadas a síntese de cDNA por outro kit análogo (Qiagen – Reverse Transcription – Cat. 205311), seguindo o protocolo do fabricante. Deste modo, procedemos na comparação cabeça-a-cabeça.

- Levantamento dos primers no genbank do NIH e síntese no IDT

Inicialmente, um mapeamento do código dos alvos para identificar o mRNA total e a sua região de codificação de gene (CDS) no *genbank* do NIH foi realizado. Posteriormente, para a síntese dos *primers*, o programa *online Integrated DNA Technologies* (IDT) foi utilizado, onde o mesmo determinou a localização exata dos alvos a serem sintetizados dentro do CDS, bem como os seus parâmetros de tamanho ideal, tamanho total pós leitura da enzima RNA polimerase, concentração e sua temperatura de anelamento (TM) comum aos outros alvos, sendo possível suas utilizações simultaneamente.

- Etapas da busca *in silico* da região CDS no NIH genbank do primer GAPDH



NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide search for GAPDH. A red arrow points to the search bar. A dropdown menu is open showing various filters like Species, Molecule types, Source databases, etc. A second red arrow points to the 'D' button in the 'RefSeq Sequences' section.

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

GenBank search for Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), RefSeqGene on chromosome 12. A red arrow points to the 'FASTA' link.

FASTA sequence for GAPDH. A red arrow points to the 'CDS' label. The sequence is shown in a monospaced font.

PRODUCTS & SERVICES ▾ APPLICATIONS & SOLUTIONS ▾ SUPPORT & EDUCATION ▾ TOOLS ▾ COMPANY ▾

ORDER MENU You are using the Sintese-Brazil IDT portal.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Sequence Entry

Enter sequence(s) manually

```
ACAGCTCTCTCTACATCAACCAAGACAAACAGACAGAGAGCCCTGTGGAAGCTGTGTCAAGCGTTCCGACATCCCGAAGTGAAGCGG
CAGCAGGAGAGCCCTGCTACTGTGTGTACAGCTGCCCTCACAGAGGAGGCGCTCCGTAAGATGCTTGAACAATTTGACTGTTTTGAGAG
CAAGCTCTCAGATGAGTCCATCTTCAGTGTCTTTTGTCTCAGTTGTAGCAAGCTGGGAGCTGGGGCCAAAGCTGAGGGCAAGGCTATAATAGA
TGMATTTTACAGCAAGGCTTGGGGCTGTCTACAGAGGTTTGGATGATTCAGAGGATTCAGATTTGGCCAGAGAGGTTGGCCAGAGAGGGC
CATCAGCCAGAGAACATCCACTGCTTGTAGTACAGCCCTTGGCTCTCAGAGCTCAGACATGACTTTGTACAGCAGAGCCCGCCGCTA
CTACGGCTGCGATGCAAGCAGAGAGGAGGCTTCCAAAAGAGAGCCAGGTTGTTGTTCAAGTGTAGTCCAGTGGAGGAGATCTTT
CAGCAGAGATGACAGAGAGAGACCCAAAGAAACACTCCACTTCTCAGAGCATGCGCTCCAGAGCCACAGATCTAG
```

Hints

- Paste your sequence into the Textbox
- Add up to 50 sequences in FASTA format
- Sequence length must be greater than 80 bases
- PrimerQuest accepts only nucleic acid bases

Sequence Name: CLEAR SEQUENCE ENTRY

Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

Upload sequence in an Excel file

Choose Your Assay Design

PCR (Primer) qPCR (Primer + Probe) qPCR (Primer + Intercalating Dye) SHOW CUSTOM DESIGN PARAMETERS

Chat ao vivo

SARS-CoV-2. Don't let us. We'll help.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

GET HELP | EN ANDREON SANTOS MACHADO DA SILVA 0 ITEMS R\$ 0.00 BRL

PRODUCTS & SERVICES ▾ APPLICATIONS & SOLUTIONS ▾ SUPPORT & EDUCATION ▾ TOOLS ▾ COMPANY ▾

ORDER MENU You are using the Sintese-Brazil IDT portal.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Assay Set Locations for Sequence 1

ADD TO ORDER - DOWNLOAD ASSAYS CUSTOMIZE ASSAY DESIGN SHOW CUSTOM TARGET REGIONS

Set 1 Sequence 1

Amplicon Length: 128 View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	309	330	21	62	47.6
Reverse	415	437	22	62	45.5

Chat ao vivo

SARS-CoV-2. Don't let us. We'll help.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

GET HELP | EN ANDREON SANTOS MACHADO DA SILVA 0 ITEMS R\$ 0.00 BRL

PRODUCTS & SERVICES ▾ APPLICATIONS & SOLUTIONS ▾ SUPPORT & EDUCATION ▾ TOOLS ▾ COMPANY ▾

ORDER MENU You are using the Sintese-Brazil IDT portal.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Sequence 1 Assay Set 1 Details

BACK TO RESULTS

Parameter Set: qPCR Intercalating Dyes (Primers only)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 128

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	309	330	21	62	47.6
Reverse	415	437	22	62	45.5

Forward: CAGAGGTTGGATGGAAATCA (Sense) Hairpin Blast

Reverse: GTCAATGCTGAGGGCTTAGAA (AntiSense)

Base	Sequence
1	ACAGCTCTCTCTACATCAACCAAGACAAACAGACAGAGAGCCCTGTGGAAGCTGTGTCAAGCGTTCCGACATCCCGAAGTGAAGCGG
101	GACTGCTACTGTGTGTACAGCTGCCCTCACAGAGGAGGCGCTCCGTAAGATGCTTGAACAATTTGACTGTTTTGAGAGCAAGCT
201	CAAGCTCTCAGATGAGTCCATCTTCAGTGTCTTTTGTCTCAGTTGTAGCAAGCTGGGAGCTGGGGCCAAAGCTGAGGGCAAGGCT
301	CTGCTATCAGAGAGGCTTGGGGCTGTCTACAGAGGTTTGGATGATTCAGAGGATTCAGATTTGGCCAGAGAGGTTGGCCAGAGAG
401	TACCAAGCTCTGCTTGTAGTACAGCCCTTGGCTCTCAGAGCTCAGACATGACTTTGTACAGCAGAGCCCGCCGCTACAGAGAG
501	AAAGAGAAACCCAAAGTGTCTTCTCAGTGTAGTCCAGTGGAGAGATCTTTCAGCAGAGATGACAGAGACAGACACCCAAAGAAAC
601	TTCAGAGCATGCGCTCCAGCCAGATCTAG

Chat ao vivo

Sequence 1 ✖

General Information

Run Date: 7/17/2022 5:29:13 PM # Bases 21

CACAGAGTTGGATGGAATCA

Nucleotide Type: DNA Sequence Type: linear

Temperature: 25 °C Max Foldings: 20

Na Concentration: 50 mM Start Position:

Mg Concentration: 0 mM Stop Position:

Suboptimality: 50%

UPDATE ORDER

Structures

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		-0.91	36.8	-24	-77.43	Ct Det
2		-0.69	34.9	-21.5	-69.79	Ct Det
3		-0.49	32.1	-21.3	-69.79	Ct Det
4		-0.25	28.6	-21.3	-70.6	Ct Det

*Note dNTP Concentration is not taken into account.

IDT's licensed UNAFold software is available to our customers for the design of oligonucleotide sequences and for use of the resulting oligos purchased from IDT in the purchaser's research applications only. To obtain access to a license to or a copy of the UNAFold software for any other application, including commercial applications, please visit <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/commercial-license>. For the latest information on UNAFold development and additional resources, visit <http://mfold.rna.albany.edu/?q=unafold-man-pages>

Copyright © Rensselaer Polytechnic Institute 2006. All rights reserved.

Chat ao vivo

SARS-CoV-2. Don't let up. We'll help.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

Search

GET HELP | EN ANDREON SANTOS MACHADO DA SILVA 0 ITEMS R\$0.00 BRL

PRODUCTS & SERVICES APPLICATIONS & SOLUTIONS SUPPORT & EDUCATION TOOLS COMPANY

ORDER MENU You are using the Sintese-Brazil IDT portal.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Sequence 1 Assay Set 1 Details

BACK TO RESULTS

Parameter Set: qPCR Intercalating Dyes (Primers only)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 128

	Forward	Reverse	Start	Stop	Length	Tm	GC%
	CCACAGGTTGGATGCAATCA (Sense)	GTCATTGCTGAGGCTGTAGAA (AntiSense)	309	437	21	62	47.6
					22	62	45.5

Blatrn Blast

Base	Sequence
1	ACAGCTCTCTTACATACCAAGGCAAGCAGACAGAGAGCTGGTGGAAAAGCTGTGTGAGCGGTTCCGACATCCCACTGAGCGCAGCAGCGA
101	GAGCTTGGCTACTGTGTGTCTCAGCTCCCTCCAGAGCAGAGGCTCCGTAAGATGCTTGGACATTTGATTTTGGAGCAAACTGTGATGAGGT
201	CCATCTTGAATCTTTTTTTCATTTGTGGAGGAGCTGTGAGTGGGGGAGGCTGATGAGGAGGATTTGAGCAATTTGAGCAAACTGTGGGCTGGGG
301	CTGTCTATGACAGAGTTTGGATGCAATCAAGAGGCTTGGATTTGGCCAGCAGGTAGCCAGAGAGCCCATCAAGCCAGAAACCTCCATCTGTTCTAGG
401	TACCAAGCTCTTGGTTTGGAGGCTGTAGCAATGAGTTTGTCCAGCAGAGCCCGGCGTACTACCGGTGGGATCCCAAGCCAGCAGAGGAGGCTTCCA
501	AAAGAGAAACCCAAAGTTGTCTTCAAGTGTGAGTCCAGTGGAGAGATGTTTTCAGCAGAGATGACAGAGAGCGAGACCCCAAGAGAAAACCTCCCAT
601	TTCAGAGCATCGGCTCCAGGCAAGATCTCTAG

Chat ao vivo

Sequence 1 ✖

General Information

Run Date: 7/17/2022 6:06:22 PM # Bases 22

GTCATTGCTGAGGCTGTAGAA

Nucleotide Type: DNA Sequence Type: linear

Temperature: 25 °C Max Foldings: 20

Na Concentration: 50 mM Start Position:

Mg Concentration: 0 mM Stop Position:

Suboptimality: 50%

UPDATE ORDER

Structures

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		0.03	24.5	-17.4	-58.47	Ct Det
2		0.27	21.3	-21.4	-72.69	Ct Det
3		0.7	13.9	-18.2	-63.4	Ct Det
4		1.01	7.5	-16.2	-57.72	Ct Det

*Note dNTP Concentration is not taken into account.

IDT's licensed UNAFold software is available to our customers for the design of oligonucleotide sequences and for use of the resulting oligos purchased from IDT in the purchaser's research applications only. To obtain access to a license to or a copy of the UNAFold software for any other application, including commercial applications, please visit <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/commercial-license>. For the latest information on UNAFold development and additional resources, visit <http://mfold.rna.albany.edu/?q=unafold-man-pages>

Chat ao vivo

- Reconstituição e diluição do *primer* GAPDH para concentração estoque, intermediária e de trabalho

Para se determinar o volume ideal de tampão TRIS-EDTA pH 8,0 (TE) a ser adicionado no *primer* GAPDH, garantindo assim a sua reconstituição e diluição na concentração estoque, a revisão da concentração exata do alvo, seguindo as informações do fabricante da síntese do *primer*, foi realizada, onde os valores indicados pelo fabricante eram 44,5 *nmoles* (*foward*) e 55,6 *nmoles* (*reverse*), e foram encontrados com a revisão o valor de 44,28 *nmoles* (*foward*) e 52,17 *nmoles* (*reverse*).

Após a revisão da concentração do GAPDH, o cálculo de concentração foi realizado, para se determinar o volume de TE a ser adicionado para reconstituir e diluir o *primer* em 500 pmol/μl (solução estoque), onde o volume do tampão TE a ser adicionado foi de 88,56 μl (*foward*) e de 104,34 μl (*reverse*)

Com a solução estoque pronta, o cálculo de diluição para se determinar o quanto de TE deveria ser adicionado para chegar no valor de solução intermediária de 250 pmol em 100 μl foi realizado. A partir do cálculo, o volume de 50 μl de tampão TE foi adicionado.

Com a solução intermediária pronta, o cálculo para se determinar o quanto de tampão TE deveria ser adicionado para se chegar à solução de trabalho 25 pmol em 200 μl foi realizado. A partir do cálculo o volume de 180 μl de tampão TE foi adicionado.

- Fabricante dos *primers*: INVITROGEN

***Primer* GAPDH fwd: 5'- ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT – 3'**

Primer lenght= 23bp

Fabricante dos *primers*: IDT

nmoles per OD → 4.1

OD's → 10.80

nmoles → 44.5 (não confiável)

*Fórmula: nmoles/OD × OD = nmoles, 4.1 × 10.8 = **44,28 nmoles** (confiável).*
Depois, multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

44280 → x, x = 88,56 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Primer GAPDH rev: 5'- GAG TCC TTC CAC GAT ACC AAA G -3'

Primer lenght= 22 bp

Fabricante dos Primers: IDT

nmoles per OD → 4.7

OD's → 11.10

nmoles → 51.6 (não confiável)

*Fórmula: nmoles/OD × OD = nmoles, 4.7 × 11.10 = **52,17 nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

52170 → x, x = 104,34 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

- Concentração intermediária igual a 250 pmol

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \Rightarrow 500 \times V_1 = 250 \times 100 \Rightarrow V_1 = 50 \mu\text{L}$ (adicionar 50 µL de TE)

- Concentração de trabalho igual a 25 pmol (a partir da intermediária)

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \Rightarrow 250 \times V_1 = 25 \times 200 \Rightarrow V_1 = 20 \mu\text{L}$ (adicionar 180 µL de TE).

- Validação do *primer* controle positivo GAPDH

Com o intuito de garantir a funcionalidade e eficiência do *primer* de GAPDH, comumente utilizado como controle positivo em reações de PCR para expressar genes de expressão constitutivos e assim presentes em todas as células nucleadas [1], a amplificação na PCR Convencional com o uso do Termociclador (Thermofisher *GenePro*) foi realizada, e posterior eletroforese com o Transiluminador-UV (GE Healthcare - ImageQuant 300) para leitura do gel de eletroforese, utilizando o *primer* GAPDH em DNA de amostras amplificadas anteriormente para comparação.

Após a amplificação das regiões em anelamento com o alvo GAPDH, nós observamos no gel de eletroforese duas bandas da amplificação nas amostras de DNA 1 e 2, dentro dos tamanhos indicados pelo marcador de tamanho referente a 100-500 pbs, pois seu tamanho de *amplicon* poderia estar entre 100 pbs a 250 pbs, de acordo com as especificações de sua avaliação *in silico*. Portanto, as bandas indicadas nas figuras 1A e 1B representam a amplificação dos genes no tamanho de 128 pbs, pela amplificação única dos dois sentidos *sense* e *anti-sense* após todo o tratamento de *splicing*. Já as bandas das figuras 1C e 1D representam as amplificações dos genes no tamanho de 256 pbs, pela amplificação separada dos dois alvos *forward* e *reverse* presentes em exons diferentes no sentido *sense* e *anti-sense*.

Planejamento do volume e concentração das amostras na PCR Convencional

Amostras	[DNA - ng/ uL]	Volume de DNA (uL)	[DNA estimada - ng/ uL]
1 - C09	26,42	2	52,84
2 - C212	27,25	2	54,5
N - CN	N/A	2	-
Microtubos		Volume de DNA utilizado	
MIX 1	1, 2 e 3	2	

Reação da PCR para GAPDH

Reagentes	Volume (µL)	M1 (x4)
Go Taq G2 Green Master Mix M782A PROMEGA (aberta em 07.01.22)	12,5	50
Primer GAPDH Reverse, 25 pmol	1	4
Primer GAPDH Forward, 25 pmol	1	4
Amostra DNA de paciente (50 ng)	2	2 (8)
Nuclease free water (26.06.22)	8,5	34
Volume calculado	25	100
Volume nos microtubos		23

Termociclador GenePro. Tempo: 1h40min.

Condições de Amplificação

Passos	Temperatura	Tempo	Numero de Ciclos
Desnaturação Inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturação	94 °C	1 min	25 ciclos
Anelamento	67 °C	1min	
Extensão	72 °C	30 sec (1 min/kb)	
Final Extensão	72 °C	7 min	1
Permanência	4 °C	∞ (min. 15 min)	1

Gel de Eletroforese

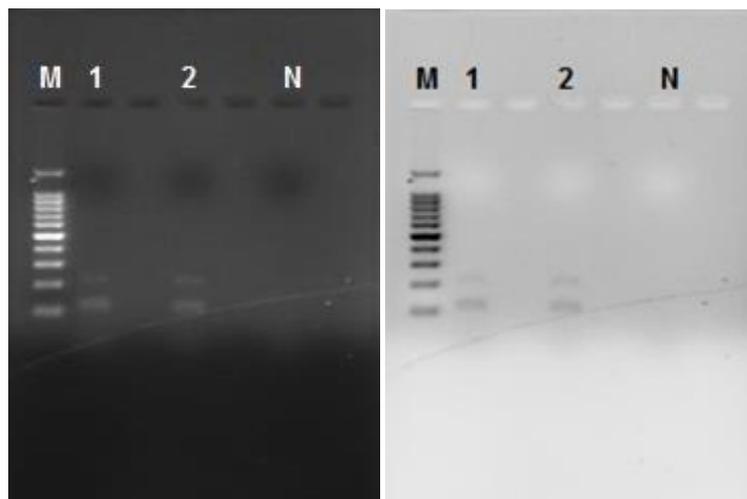


Figura 1. Gel de eletroforese do GAPDH em amostras de DNA conhecidas, para validação do *primer*. (M) Marcador Molecular de pares de bases entre 100 a 500 pbs, (1) amostra de DNA teste 01, (2) amostra de DNA teste 02 e (N) Controle Negativo com somente com os reagentes da reação e água. (A) e (B) Amplificação do GAPDH nas amostras teste contendo o tamanho molecular de 128 pbs. (C) e (D) Amplificação do GAPDH nas amostras teste contendo o tamanho molecular de 256 pbs. Gel de eletroforese em 2% de agarose com brometo de etídio e solução tampão TBE, Condições da fonte de 60 V, 400 A, tempo de corrida de 45 min.