

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***PALOMA REZENDE CORRÊA***

Caracterização do comportamento de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau frente ao ambiente intracelular de macrófagos THP-1

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

**Orientadoras:** Dra. Leila de Mendonça Lima  
Dr. Milton Ozório Moraes

**RIO DE JANEIRO**  
2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Corrêa, Paloma Rezende .

Caracterização do comportamento de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau frente ao ambiente intracelular de macrófagos THP-1 / Paloma Rezende Corrêa. - , 2018.

146 f.; il.

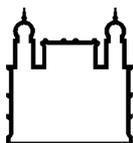
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Leila de Mendonça Lima.

Co-orientador: Milton Ozório Moraes.

Bibliografia: f. 117-138

1. *Mycobacterium bovis* BCG Moreau. 2. Tuberculose. 3. Linhagem monocítica humana THP-1. 4. Estresse. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***PALOMA REZENDE CORRÊA***

**CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG  
MOREAU FRENTE AO AMBIENTE INTRACELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1**

**ORIENTADOR (ES): Dra. Leila de Mendonça Lima  
Dr. Milton Ozório Moraes**

**Aprovada em: 29/01/18**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani (IOC/FIOCRUZ) - Presidente e Revisora**

**Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues (UERJ) - Titular**

**Prof. Dra. Patrícia Elaine de Almeida (UFJF) - Titular**

**Prof. Dr. Luis Caetano Martha Antunes (ENSP/FIOCRUZ) - Suplente**

**Prof. Dra. Myrna Cristina Bonaldo (IOC/FIOCRUZ) - Suplente**

Rio de Janeiro, 29 de Janeiro de 2018

Trabalho realizado nos laboratórios de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB) e de Hanseníase, sob a orientação da doutora Leila de Mendonça Lima e do doutor Milton Ozório Moraes.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmã, filha e marido por todo incentivo, torcida, carinho e paciência.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços  
repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

À Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha filha Isadora, que me ensina todo dia o que realmente importa nessa nossa trajetória. O resultado mais lindo que obtive durante o doutorado.

Aos meus pais, Marcia e Marco, que me deram uma estrutura familiar de base sólida, permitindo o meu crescimento pessoal e profissional. Vocês são meu porto seguro quando o mar da vida está agitado e me encham de esperança quando dizem que o melhor da vida ainda virá.

A minha irmã, Rachel, com quem divido todos os meus momentos; as angústias, as alegrias, as dores e as conquistas. Não consigo imaginar minha vida sem a presença dela, me incentivando e me amparando.

Ao Alexandre, meu companheiro de vida, que desenvolve o dom da paciência comigo, afinal, não foram poucos os momentos nervosismo ao longo do caminho. Ele me deu força para realizar mais essa etapa, acreditando no meu potencial.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Leila de Mendonça Lima pela dedicação, carinho e confiança que depositou em mim. Mesmo em momentos difíceis soube conduzir e me dar calma para continuar a fazer o meu melhor!

Ao meu orientador Dr. Milton Ozório Moraes pela disponibilidade e todos os ensinamentos.

Aos meus amigos do grupo de Micobactéria (Marcos, Leandro, Sindy, Renata, Bianca e Alessandra) por dividirem as angústias e as felicidades de desenvolver um trabalho acadêmico. Nossos papos científicos sempre renderam boas ideias e principalmente risadas, fazendo o dia-a-dia mais leve.

Aos colegas do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (salas 105, 110 e 201) pela agradável convivência diária, pelo companheirismo e pelos inúmeros momentos de descontração.

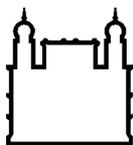
À Pati, uma das pessoas que eu mais admiro, pelo seu profissionalismo, amizade, perfeccionismo e coragem. Tenho certeza de que a distância geográfica não nos afastará! Estarei sempre torcendo pelo seu sucesso e felicidade.

À dona Neiva que cuida de todos nós com um zelo ímpar. A sua presença é indispensável a nossa rotina de laboratório e o dia a dia me faz admirar ainda mais a senhora! Obrigada pela sua colaboração, pois sem ela esse trabalho não seria possível.

À Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) da Fiocruz, especialmente às plataformas de Eletroforese 2D e Fracionamento (RPT02B - RJ) e citometria de fluxo (Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica – IOC/RJ), que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, por proporcionar o ambiente e os recursos necessários à realização de grande parte da minha trajetória acadêmica. Todos os trabalhos que aqui realizei na última década me trouxeram um conhecimento científico muito rico e diverso.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, através do qual recebi minha bolsa de estudo.



Ministério da Saúde

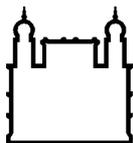
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG MOREAU FRENTE AO AMBIENTE INTRACELULAR DE MACRÓFAGOS THP-1

### RESUMO

A vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guèrin), única vacina disponível contra a tuberculose (TB), foi obtida no início do século XX por Calmette e Guèrin após 231 passagens de um isolado clínico de *M. bovis* cultivado em meio glicerinado contendo bile bovina. Sua eficácia protetora contra a TB pulmonar em adultos varia de 0-80% e as diferenças genéticas entre as diversas cepas vacinais utilizadas mundialmente contribuem para esta variação. A cepa vacinal brasileira, BCG Moreau, é considerada uma cepa primitiva, mais próxima do BCG original, quando comparada às cepas mais recentes, como BCG Pasteur. Dados do nosso grupo identificaram diferenças, no genoma e no perfil proteômico, entre as cepas BCG Moreau e Pasteur. A partir dessas informações tornou-se relevante avaliar como essas cepas respondem ao microambiente existente dentro do macrófago. O BCG fagocitado por macrófago sofre diferentes tipos de estresse, os quais estimulam respostas moleculares que podem impactar no efeito protetor da vacina. Buscamos analisar o comportamento da cepa BCG Moreau comparativamente às cepas Pasteur e Tokyo, no contexto da infecção de macrófagos THP-1, caracterizando aspectos bacterianos e de resposta da célula eucariótica à infecção. Para isso, células THP-1 foram infectadas com BCG Moreau, Pasteur e Tokyo. Os resultados apontam para uma cinética de crescimento similar entre BCG Moreau e Tokyo, mas diferente de Pasteur. Esse perfil de comportamento distinto também é observado na taxa de colocalização do bacilo com fagossomas acidificados, bem como na expressão da proteína intracelular HspX. As cepas em estudo parecem não induzir a morte dos macrófagos até 96 horas e são capazes de estimular diferencialmente a secreção das citocinas pelas células THP-1. A cepa BCG Pasteur induziu maior secreção da citocina IL-1 $\beta$  e da quimiocina MCP-1, já a cepa BCG Moreau induziu maior secreção da citocina TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ . Além disso, a cepa BCG Pasteur foi capaz de induzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos nos macrófagos, essas organelas são diretamente associadas a mecanismos de escape em patógenos intracelulares. Essas informações contribuem para caracterizar o perfil de resposta das três cepas BCGs frente ao ambiente intracelular do macrófago, identificando diferenças em BCG Moreau que poderão contribuir para o melhor entendimento da fisiologia da cepa vacinal brasileira contra a tuberculose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## CHARACTERIZATION OF THE BEHAVIOR OF *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG MOREAU IN FRONT OF THE INTRACELLULAR ENVIRONMENT OF MACROPHAGOS THP-1

### ABSTRACT

BCG vaccine (*Bacillus Calmette-Guèrin*), only available prophylaxis against tuberculosis (TB), was obtained in the early 20th century by Calmette and Guèrin after 231 passages of a *M. bovis* clinical isolate grown in glicerinated broth with bile bovine. Its protective efficiency against pulmonary TB in adults varies from 0-80% and genetic differences from vaccine strains worldwide contribute to this variation. Brazilian vaccine strain, BCG Moreau, is a primitive strain, closely related to original BCG when compared with recent strains, as BCG Pasteur. Data from our group show genomic and proteomic differences between BCG strains Moreau and Pasteur. With this, it is interesting to evaluate how these strains respond to the micro-environment inside macrophage. After macrophage phagocytosis, BCG goes under diverse types of stress that stimulates molecular responses that can impact vaccine protective effect. We aimed to analyse BCG Moreau behavior comparing to Pasteur and Tokyo within THP-1 macrophage environment, looking for bacteria and eukaryotic cell responses toward infection. THP-1 cells were infected with BCG Moreau, Pasteur and Tokyo. Results show a similar viability kinetics between BCG Moreau and Tokyo, distinct from Pasteur. This behavior pattern is also observed in bacteria-acidified vesicles colocalization rate, as well as HspX intracellular expression. Studied strains do not seem to induce macrophage death within 96 hours, but can stimulate in a different manner cytokines secretion by THP-1 cells. BCG Pasteur induced higher secretion of cytokine IL-1 $\beta$  and chemokine MCP-1, otherwise BCG Moreau induced higher secretion of cytokine TNF- $\alpha$  and chemokine MIP-1. Besides, BCG Pasteur was able to induce lipid bodies accumulation within the macrophage, these organelles are directly associated with escape mechanism in intracellular pathogens. These data contribute to search for response profile of the three studied BCG strains inside macrophage, identifying BCG Moreau differences that may contribute for a better understanding of the Brazilian vaccine strain against tuberculosis.

# LISTA DE FIGURAS

## INTRODUÇÃO

1.1	Mapa de estimativa da taxa de incidência da tuberculose ao redor do mundo.	2
1.2	Estrutura e constituição celular do granuloma de TB.	3
1.3	Fagocitose micobacteriana e interferência na maturação fagossomal e autofagia.	6
1.4	Esquema do possível mecanismo pelo qual cepas virulentas de <i>M. tb</i> induzem diferenciação para macrófagos espumosos.	9
1.5	Representação esquemática das relações filogenéticas do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	13
1.6	Representação esquemática do envelope micobacteriano	15
1.7	Genealogia das vacinas BCG.	18
1.8	Cepas da vacina BCG utilizadas entre 2003 e 2007 em todo o mundo.	19
1.9	Candidatos vacinais em fase clínica, de acordo com o Global Tuberculosis Report 2016	21

## RESULTADOS

4.1	Caracterização morfológica das cepas <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau, Pasteur e Tokyo.	40
4.2	Esquema representativo para identificação molecular das cepas estudadas.	42
4.3	Identidade molecular das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo.	42
4.4	Padronização do protocolo de diferenciação de monócitos THP-1 a macrófagos.	44
4.5	Perfil representativo de vesículas acidificadas em macrófagos THP-1 submetidos a diferentes protocolos de indução com PMA.	45
4.6	Perfil representativo de colônias das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo em placas 7H10 recuperadas após infecção em células THP-1.	52
4.7	<i>Western blotting</i> para avaliar a expressão da proteína HspX de BCG em resposta ao ambiente intracelular.	53
4.8	Gel unidimensional (1D) representativo do perfil de proteínas intracelulares de BCG Moreau e Pasteur após 24 horas de infecção em macrófagos THP-1.	54
4.9	Perfil de viabilidade de macrófagos THP-infectados por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 4, 24, 48 horas.	56

4.10	Perfil representativo de colocalização das cepas BCG com vesículas acidificadas no tempo de 6 horas.	70
4.11	Perfil representativo de colocalização das cepas BCG com vesículas acidificadas no tempo de 24 horas.	71
4.12	Perfil representativo da organização dos filamentos de actina em células infectadas por BCG moreau, Pasteur e Tokyo no tempo de 6 horas.	73
4.13	Perfil representativo da organização dos filamentos de actina em células infectadas por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo no tempo de 24 horas.	74
4.14	<i>Western blotting</i> para avaliar a expressão das proteínas actina (B) e GAPDH (C) em macrófagos infectados por BCG (24h).	76
4.15	Perfil representativo da presença de corpúsculo em células infectadas por BCG Moreau e Pasteur no tempo de 24 horas.	77

# LISTA DE TABELAS

## RESULTADOS

- 4.1 Concentração peptídica das amostras, após a realização do protocolo de FASP adaptado. 54

## ANEXOS

8.1	Meio de cultura 7H9, Tween 80 e glicerol	119
8.2	Solução de ADC	119
8.3	Meio de cultura sólido 7H10 e glicerol	119
8.4	Fucsina Fenicada	119
8.5	Solução álcool-ácido	119
8.6	Azul de metileno	120
8.7	Tampão PBS 10X	120
8.8	Oligonucleotídeos para identificação genética	120
8.9	Ciclagem para a reação de PCR	120
8.10	Tampão TBE 10X	120
8.11	Meio RPMI completo contendo soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina	121
8.12	Tratamento lamínulas de vidro	121
8.13	4 % Paraformaldeído (PFA)	121
8.14	0,4 % azul de Tripan	121
8.15	Tampão MOPS 10X	122
8.16	Tampão de lise	122
8.17	Tampão de focalização isoeletrica - IEF	122
8.18	Tampão para aplicação de amostras proteicas em gel SDS-PAGE (1X).	122
8.19	Géis 15% SDS-PAGE	123
8.20	Tampão de corrida Laemmli	123
8.21	Método de coloração por prata para géis SDS-PAGE de 7cm	123
8.22	Solução UA	124
8.23	Solução contendo iodoacetamida	124
8.24	Solução DB	124
8.25	Tampão TBS 10X	124
8.26	Anticorpos utilizados no estudo.	124

# LISTA DE GRÁFICOS

## RESULTADOS

4.1	Comprimento dos bacilos das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo.	41
4.2	Viabilidade das células THP-1 em diferentes concentrações de PMA.	47
4.3	Cinética de crescimento das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo após infecção de células THP-1.	48
4.4	Comparação do crescimento das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo após infecção de células THP-1.	49
4.5	Comparação da taxa de internalização das cepas de BCG Moreau, Pasteur e Tokyo por células dTHP-1 em 4 horas.	50
4.6	Comparação da taxa de crescimento intracelular das cepas de BCG Moreau, Pasteur e Tokyo em células dTHP-1.	51
4.7	Perfil de viabilidade de macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas.	55
4.8	Perfil de expressão da citocina IL-1 $\beta$ em macrófagos THP-1 não infectados e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas.	58
4.9	Perfil de expressão da citocina MCP-1 em macrófagos THP-1 não infectados e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas.	60
4.10	Perfil de expressão da citocina TNF- $\alpha$ em macrófagos THP-1 não infectados e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.	62
4.11	Perfil de expressão da citocina MIP-1 $\beta$ em macrófagos THP-1 não infectados e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.	64
4.12	Perfil de expressão da citocina IL-6 em macrófagos THP-1 não infectados e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.	66
4.13	Perfil de expressão da citocina IL-8 em macrófagos THP-1 não infectados e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.	68
4.14	Porcentagem de células THP-1 infectadas por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6 e 24 horas.	69
4.15	Vesículas acidificadas colocalizadas com BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6 e 24 horas.	72
4.16	Quantificação relativa de corpúsculos lipídicos através da marcação com ORO nas células THP-1 infectadas por BCG Moreau e Pasteur no tempo de 24 horas.	78

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADRP- “Adipose differentiation-related protein” (Proteína relacionada a diferenciação de adipócitos)

AG – *Arabinogalactan* (Arabinogalactana)

AM – *Mycolic acid* (Ácidos micólicos)

AMPs – *Antimicrobial peptides and proteins* (Peptídeos/proteínas antimicrobianos)

BAAR – Bacilo álcool ácido resistente

BCG – Bacilo de Calmette e Guérin

BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)

CBB – *Coomassie brilliant blue* (Azul brilhante de Coomassie)

CLRs – *C- type lectin receptor* (Receptores de lectina do tipo c)

DABCO - 4',6-Diamidino-2-fenilindol

DAMPs – *danger-associated molecular patterns* (padrões de moléculas associadas a danos)

DAPI - 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano

DEPEC – *Diethylpyrocarbonate* (Dietilpirocarbonato)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DOTS – *Directly Observed Treatment, Short Course* (Estratégia de Tratamento Diretamente Observado)

DTT – Ditioneitol

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

GL – *Glycolipids* (Glicolipídeos)

HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HSL – *Hormone-sensitive lipase* (Lipase hormônio-sensível)

IFN- $\gamma$  – *Interferon gamma* (Interferon gama)

IGRA - *interferon gamma release assay* (ensaio de quantificação de Interferon gama )

IL-10 – *Interleukin - 10* (Interleucina – 10)

IL-1 $\beta$  – *Interleukin - 1 $\beta$*  (Interleucina – 1 $\beta$ )

IL-6 – *Interleukin - 6* (Interleucina – 6)

IL-8 – *Interleukin - 8* (Interleucina – 8)

LAMP-1 – *Lysosomal-associated membrane protein 1* (Proteína 1 associada a

membrana lisossomal)

LAMP-2 – *Lysosomal-associated membrane protein 2* (Proteína 2 associada a membrana lisossomal)

*M. tb* – *Mycobacterium tuberculosis*

MAPK – *Mitogen-activated protein kinases* (Proteínas quinases ativadas por mitógenos)

MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína quimiotática de monócitos-1)

MDM – *Monocyte-derived macrophages* (macrófagos derivados de monócitos)

MIP-1 $\beta$  – *Macrophage Inflammatory Protein - 1 $\beta$*  (Inflamatória de macrófagos-1 $\beta$ )

MOGs – *Millennium Development Goals* (Objetivos de Desenvolvimento do Milênio)

NF-kB – *Factor nuclear kappa B* (Fator nuclear kappa B)

NLRs - *NOD – like receptor* (Receptores tipo NOD)

NO - Nitric oxide (Óxido nítrico)

NOD – *Nucleotide-binding oligomerization domain* (Domínio de ligação ao DNA)

NOS2 – *Nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase)

NOX2 – *NADPH oxidase 2 activity* (NADPH oxidase 2)

OMS – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

PBS – *Phosphate buffered saline* (Salina tamponada com fosfato)

PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns* (padrões de moléculas associadas a patógenos)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PDGF – *Platelet-derived growth factor* (Fator de crescimento derivado de plaqueta)

PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

PG – *Prostaglandin* (Prostaglandina)

PGE2 – *Prostaglandin E2* (Prostaglandina E2)

pH - Potencial hidrogeniônico

PIM – *Phosphatidylinositol mannoside* (Manosídeo fosfatidilinositol)

PKA – *Protein kinase A* (Proteína quinase A)

PL - *Phospholipids* (Fosfolípidos)

PMA – *Phorbol-12-miristato-13-acetato* (Forbol-miristila)

PRRs – *Pattern recognition receptors* (Receptores de Reconhecimento de Padrões)

q.s.p. – Quantidade suficiente para

RD – *Region of Difference* – Região de diferença

RIG I – *Retinoic acid inducible gene 1 – like receptor* (Receptor do tipo – gene I induzível por ácido retinóico)

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RNS – *Reactive nitrogen species* (Espécies reativas de nitrogênio)

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

SDS – *Sodium dodecyl sulphate* (Dodecil sulfato de sódio)

TB – Tuberculose

TDM – “Trehalose dimycolate” (Dimicolato de trealose)

TEMED – N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina

TLRs – *Toll like receptors* (Receptores do tipo *toll*)

TMM – *Trehalose monomycolate* (Monomicolato de trealose)

TNF- $\alpha$  – *Tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

Tris - Tris-hidroxi-metil-amino-metano

V - volume

WB – *Western blot*

# ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv

## 1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose	1
1.2 Imunopatogênese da TB	3
1.2.1 Reconhecimento do <i>M. tuberculosis</i> pelo hospedeiro	4
1.2.2 A resposta do hospedeiro à infecção por <i>M. tuberculosis</i>	5
1.2.2.1 Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	6
1.2.2.2 Maturação fagossomal	7
1.2.2.3 Corpúsculos Lipídicos	8
1.2.2.4 Papel das citocinas na TB	10
1.3 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1.3.1 <i>M. tuberculosis</i> : agente etiológico da tuberculose	14
1.3.2 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	15
1.3.2.1 Breve histórico	16
1.3.2.2 Genealogia das vacinas BCGs: diferentes BCGs diferentes vacinas	17
1.3.2.3 Uso mundial das diferentes BCGs	19
1.3.2.4 Novas vacinas contra tuberculose	19
1.3.2.5 Cepa vacinal brasileira: <i>M. bovis</i> BCG Moreau e o esquema vacinal	22
1.4 Células THP-1	22
1.5 Justificativa	24

## 2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25

### 3 METODOLOGIA

3.1	Cultura de <i>M. bovis</i> BCG	26
3.2	Quantificação do lote semente de <i>M. bovis</i> BCG através do método de unidade formadora de colônia (CFU)	26
3.3	Avaliação da pureza do lote semente de <i>M. bovis</i> BCG pelo método de Ziehl-Neelsen	26
3.4	Avaliação da viabilidade do lote semente de <i>M. bovis</i> BCG	27
3.5	Confirmação da identidade genética das cepas de <i>M. bovis</i> BCG	27
3.6	Cultura de células THP-1	28
3.7	Padronização do protocolo de diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos	28
3.8	Diferenciação das células THP-1 e infecção por BCG	29
3.9	Crescimento intracelular das cepas BCGs em modelo THP-1	29
3.10	Viabilidade dos dTHP-1 frente a infecção com os diferentes BCGs	30
3.11	Imunofluorescência	30
3.11.1	Plaqueamento das células THP-1 e infecção	30
3.11.2	Marcação para vesículas acidificadas pelo fluoróforo <i>LysoTracker Red DND-99®</i>	31
3.11.3	Marcação para os filamentos de actina por Rodamina-faloidina	31
3.11.4	Marcação para corpúsculos lipídicos por Oil Red O (ORO)	32
3.12	Dosagem de citocinas e nitrito	32
3.12.1	Plaqueamento das células THP-1 e infecção	32
3.12.2	Dosagem de citocinas pelo método de ELISA de captura	32
3.12.3	Dosagem de citocinas pelo método CBA	33
3.12.4	Dosagem nitrito pelo método de Griess	33
3.13	Purificação de ácidos nucleicos	34
3.13.1	Obtenção da amostra bacteriana	34
3.13.2	Obtenção da amostra de dTHP-1	34
3.13.3	Extração de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR	34
3.14	Obtenção do extrato proteico	35
3.14.1	Quantificação de proteínas e análise da integridade da amostra	36
3.14.2	FASP ( <i>Filter-Aided Sample Preparation</i> )	36
3.15	<i>Western Blot</i>	37

## 4 RESULTADOS

<b>4.1</b>	<b>Caracterização fenotípica, genética e da viabilidade dos lotes-semente das cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau, Pasteur e Tokyo</b>	39
<b>4.2</b>	<b>Padronização das condições de diferenciação dos monócitos humanos THP-1 em macrófagos</b>	43
4.2.1	Concentração de PMA e tempo de indução, com posterior tempo de repouso são importantes para o quantitativo final de células com morfologia compatíveis com macrófagos	43
4.2.2	Monócitos THP-1 diferenciados com 200 nM PMA exibem aumento na quantidade de vesículas acidificadas	45
4.2.3	Concentrações variando de 80 a 200 nM de PMA não apresentam diferença na viabilidade dos macrófagos THP-1	46
<b>4.3</b>	<b><i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau e BCG Tokyo apresentam aumento na sobrevivência intracelular em macrófagos THP-1 diferenciados por PMA</b>	47
<b>4.4</b>	<b><i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau apresenta maior taxa de internalização em macrófagos THP-1</b>	49
<b>4.5</b>	<b><i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau e Tokyo apresentam aumento do número de bactérias</b>	50
<b>4.6</b>	<b><i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau e Pasteur apresentam mudanças na morfologia de colônia após a infecção</b>	51
<b>4.7</b>	<b>A cepa BCG Pasteur regula positivamente o regulon DevR em 6 horas, enquanto BCG Moreau apenas no tempo de 24 horas</b>	52
<b>4.8</b>	<b>Perfil proteômico intracelular de BCG após o tempo de 24 horas de infecção</b>	53
<b>4.9</b>	<b>O perfil de viabilidade dos macrófagos THP-1 infectados por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo não é alterado ao longo da cinética de infecção</b>	55
<b>4.10</b>	<b>O perfil morfológico dos macrófagos THP-1 infectados não apresenta alteração cepa-específica</b>	55
<b>4.11</b>	<b>Avaliação do perfil de citocinas secretadas e da produção de Óxido Nítrico por macrófagos THP-1 em resposta à infecção com as diferentes cepas de BCG</b>	57
4.11.1	A cepa BCG Pasteur induz maior secreção da citocina IL1- $\beta$ nos tempos de 6 e 24 horas quando comparada à cepa Moreau	57
4.11.2	A cepa BCG Pasteur induz maior secreção da citocina MCP-1 no tempo de 48 horas quando comparada à cepa Moreau	59

4.11.3	A cepa Moreau induz um aparente aumento na secreção da citocina TNF- $\alpha$ no tempo de 6 horas quando comparada à cepa Pasteur	61
4.11.4	A cepa BCG Moreau induz um aparente aumento na secreção da citocina MIP-1 $\beta$ no tempo de 24 horas quando comparada à cepa Pasteur	63
4.11.5	A cepa BCG Moreau induz um aparente aumento na secreção da citocina IL-6 no tempo de 24 horas quando comparada à cepa Pasteur	65
4.11.6	A cepa BCG Moreau, Pasteur e Tokyo parecem não induzir modulação na secreção da citocina IL-8	67
4.12	<b><i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau resiste em fagossomas acidificados até 24 horas</b>	69
4.13	<b><i>Mycobacterium bovis</i> BCG Pasteur induz a acumulação de corpúsculos lipídicos em macrófagos THP-1 no tempo de 24 horas</b>	76
5	<b>DISCUSSÃO</b>	79
6	<b>CONCLUSÕES</b>	95
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	97
8	<b>ANEXOS</b>	119

## 1. Introdução

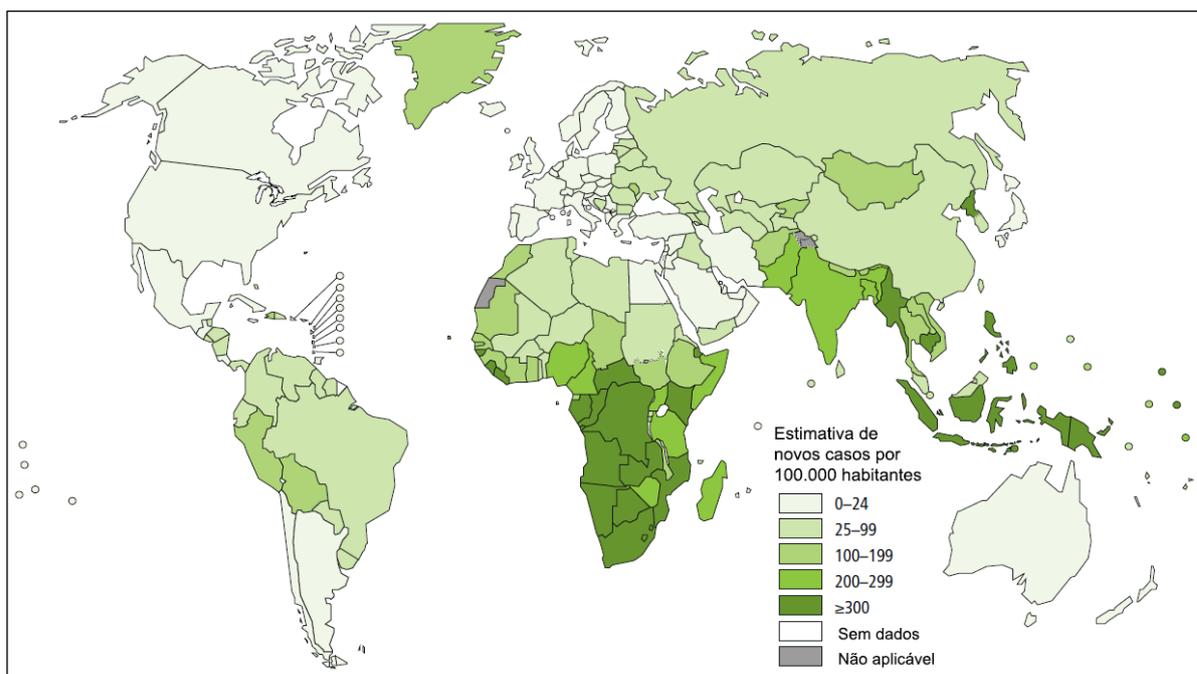
### 1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) permanece sendo um grave problema de saúde global, ocupando desde o ano de 2015 o primeiro lugar no *ranking* mundial de doenças infectocontagiosas, ultrapassando o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2016).

O aumento da TB vem sendo observado desde a década de 90, resultante principalmente do empobrecimento, urbanização, favelização, da pandemia da infecção pelo HIV e do aparecimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) multirresistentes. Devido a esse quadro, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, declarou a TB como sendo uma emergência global e propôs a Estratégia de Tratamento Diretamente Observado (DOTS). O programa de DOTS objetivava a conscientização pública e política para a doença, ampliando assim as taxas de diagnóstico e cura (WHO, 1994).

Em 2014, a OMS lançou outra estratégia para o controle da TB, chamada de “*END TB*”. O programa propunha uma abordagem completamente nova para a luta contra a TB e possuía objetivos ambiciosos, dentre eles consolidar e expandir o que já havia sido alcançado pelas estratégias anteriores. A meta principal era parar e iniciar o processo de reversão da incidência de TB, atendendo assim um dos itens dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (*Millennium Development Goals – MOGs*) para 2015 (Uplekar *et al.*, 2015).

Apesar de consideráveis esforços para combater a doença, em 2015 observou-se 10,4 milhões de novos casos e o número de óbitos foi estimado em 1,7 milhões, incluindo 0,4 milhões de pessoas co-infectadas com HIV. A maior parte dessa população está distribuída em países em desenvolvimento, devido às baixas condições socioeconômicas (WHO, 2017) (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Mapa de estimativa da taxa de incidência da tuberculose ao redor do mundo. A gradação do verde reflete diferentes taxas de incidência, indo da taxa menor (verde claro) a maior (verde escuro). (WHO, 2017)

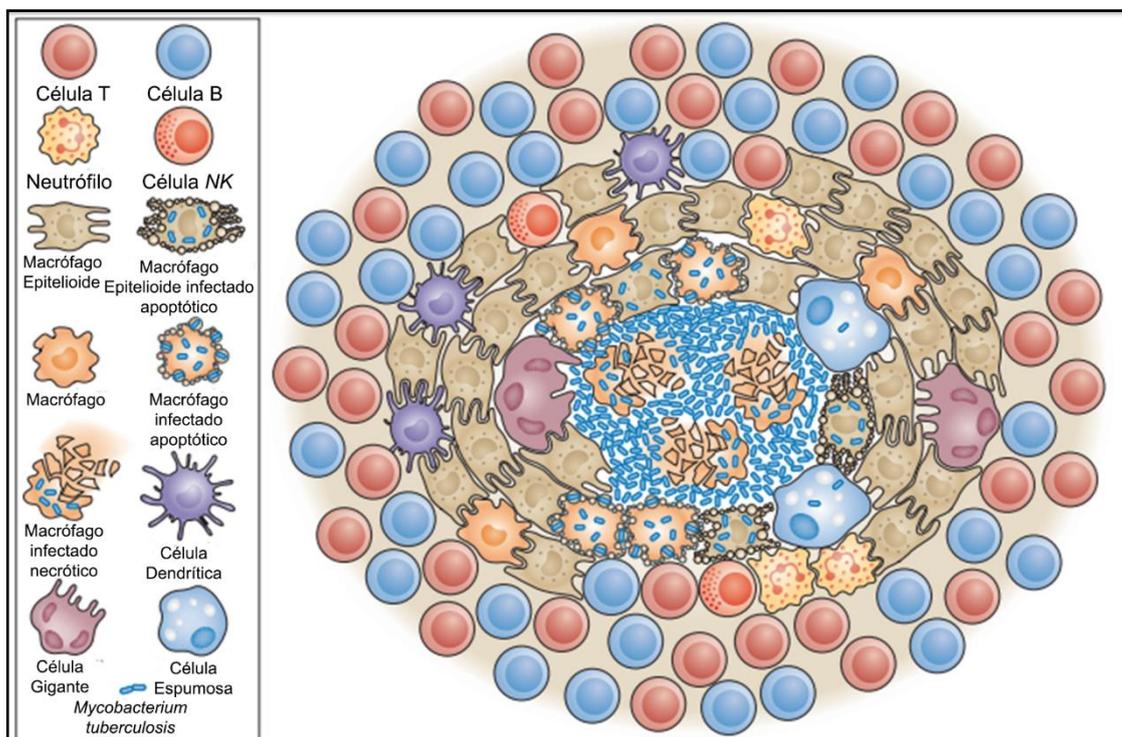
Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo seu agente etiológico, o *M. tb* (WHO, 2016). Ainda que o patógeno persista sob a forma latente, o sistema imune é eficiente na sua contenção (Young *et al.*, 2009; CDC, 2016). Cerca de 5-10% das pessoas infectadas com TB irão desenvolver a forma ativa da doença ao longo da vida. As pessoas infectadas imunodeprimidas, subnutridas e diabéticas são as que possuem maior probabilidade de reversão da TB latente para ativa (WHO, 2016).

Esse panorama mundial alarmante ressalta a necessidade de vacinas profiláticas e terapêuticas mais eficazes contra a TB (Evans, 2017), assim como métodos diagnósticos mais específicos e rápidos (Petrucci *et al.*, 2017; Iruedo *et al.*, 2017). Algumas áreas ganham destaque dentro desse contexto, a Genômica Funcional, a Proteômica e a Bioinformática, pois fornecem importantes informações. Esses dados permitem a caracterização do perfil proteico de diferentes cepas de BCG e possíveis alvos quimioterápicos, possibilitando o aperfeiçoamento ou mesmo o desenvolvimento de novas intervenções (Sharma *et al.*, 2015; Kaufmann *et al.*, 2017), além do entendimento da fisiopatologia do *M. tb* (Rienksma *et al.*, 2015).

## 1.2 Imunopatogênese da TB

O processo de infecção do hospedeiro pelo *M. tb* ocorre em uma sequência de eventos bem estabelecidos. A transmissão da TB ocorre através da inalação de aerossóis contendo o *M. tb*. Após a inalação, a bactéria é fagocitada por macrófagos residentes no pulmão. Esses macrófagos infectados são ativados e produzem diversos mediadores, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), anti-inflamatórias (TGF- $\beta$ ; IL-10) e mediadores lipídicos (eicosanoides); objetivando a eliminação da micobactéria e o início de complexas interações entre patógeno-hospedeiro (Russel, 2001).

A produção de citocinas e outros mediadores quimiotáticos favorecem o recrutamento de mais macrófagos para o local de infecção, acumulação de células T específicas e a formação de granuloma (Figura 1.2). Apesar do granuloma ser tipicamente reconhecido como responsável pela contenção e prevenção da propagação da micobactéria, estudos em *zebra fish* apontam sua natureza dinâmica, sugerindo que o granuloma poderia estar desenvolvendo outras funções, dentre elas a proteção do *nicho* favorável à replicação bacteriana (Ramakrishnan, 2012).



**Figura 1.2 Estrutura e constituição celular do granuloma de TB.** O granuloma tuberculoso é um agregado compacto e organizado de células epitelióides (macrófagos que sofreram uma transformação especializada para ter membranas celulares estreitamente interdigitadas que ligam as células adjacentes). As células epitelióides podem ser altamente fagocíticas, mas em alguns casos não contêm bactérias. Os macrófagos do granuloma também podem se fundir em células gigantes

multinucleadas ou se diferenciar em células espumosas, caracterizadas pelo acúmulo de corpúsculos lipídios. As células espumosas foram observadas mais frequentemente na borda do centro necrótico de um granuloma tuberculoso maduro. As consequências dessas mudanças não são bem compreendidas, mas, em geral, células espumosas e células gigantes multinucleadas são pouco infectadas ou não infectadas. As bactérias são mais comumente presentes nas áreas necróticas centrais, nas quais macrófagos mortos podem ser vistos. Muitos outros tipos celulares também participam do granuloma, como os neutrófilos, células dendríticas, células B e T, células *natural killer* (NK), fibroblastos e células que secretam componentes da matriz extracelular (Ramakrishnan, 2012).

### 1.2.1 Reconhecimento do *M. tuberculosis* pelo hospedeiro

Os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) são grupos de receptores que reconhecem a presença de bactérias, fungos e vírus (Kawai & Akira, 2010). PRRs são formados por quatro grupos bem caracterizados: proteínas transmembranas como *toll like receptor* (TLRs) e receptores de lectina do tipo c (*c-type lectin receptor* – CLR), além de proteínas citoplasmáticas como: gene I induzível por ácido retinóico (*retinoicacid inducible gene I – like receptor* – RIG I) e receptores tipo NOD (*NOD – like receptor* - NLRs) (Akira et al., 2006).

O *M. tb* é reconhecido por ativar pelo menos três famílias diferentes de receptores: do tipo *toll* (TLRs), CLR e NLRs. A interação patógeno-hospedeiro ocorre principalmente através dos componentes da parede micobacteriana ricos em manose (lipoarabinomanana (LAM) e manosídeo fosfatidilinositol (PIM)) e dimicolato de trealose (TDM) com os receptores de resposta imune inata das células (Ishikawa et al., 2017).

Os membros TLR2, TLR4 e TLR9 da família *toll* reconhecem micobactérias (Means et al., 1999; Kurt-Jones et al., 2000; Takeuchi & Akira, 2010; Welin, & Lerm, 2012; Hossain & Norazmi, 2013). TLR2 está associado ao reconhecimento de lipoproteínas, peptideoglicanos e glicolipídeos da parede celular micobacteriana, incluindo LAM, LM e PIM (Vignal et al., 2003, Harding & Boom, 2010). A ligação dos componentes micobacterianos reconhecidos por TLRs de macrófagos ou células dendríticas induzem a produção de citocinas pró inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 através da ativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B e MAPK (Ishikawa et al., 2017).

Os CLR são genericamente definidos como a família de receptores que reconhece ligantes contendo açúcar na presença de cálcio. O reconhecimento de glicolipídeos micobacterianos (monomicolato glicerol, PIM, TDM e lipoarabinomanana) por CLR dispara uma cascata de sinalização via imunoreceptores com atividade de tirosina quinase, que modulam a resposta imune adaptativa, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e formação do granuloma (Geijtenbeek & Gringhuis, 2016; Ishikawa et al., 2009)

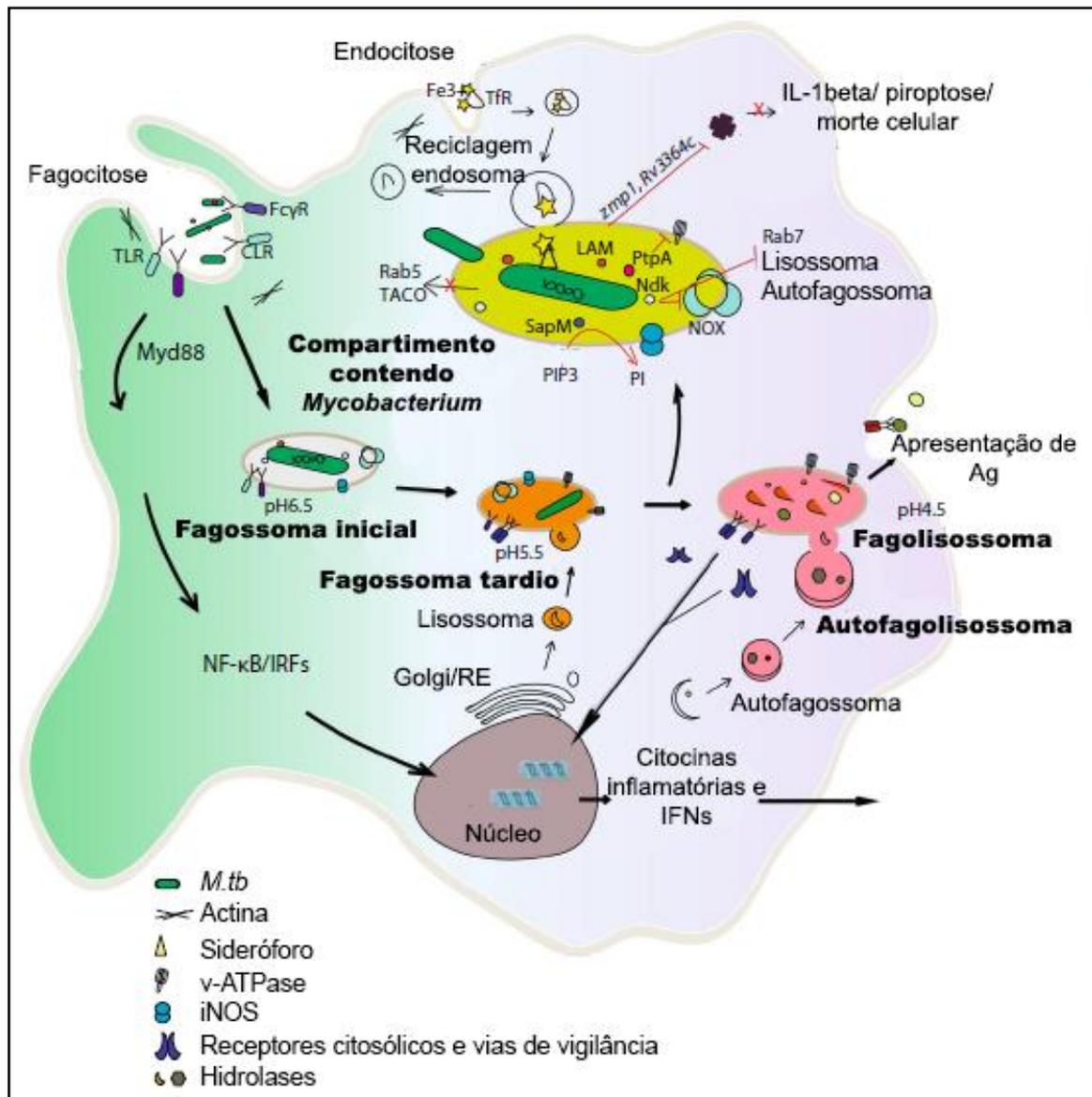
Os NLRs estão localizados no citoplasma e são programados para reconhecer padrões de moléculas associadas a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) e associados a danos (*danger-associated molecular patterns* – DAMPs). A partir do reconhecimento de peptidoglicanos, por exemplo, promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Coulombe, *et al.*, 2009).

Enquanto a ativação de determinados PRRs, como TLR2, levaria a produção de citocinas pró-inflamatórias, o reconhecimento por outros PRRs, como Dectina 2 (CLR) regularia a inflamação através da produção de citocinas anti-inflamatória. Esse equilíbrio da resposta de citocinas parece ser um importante mecanismo no hospedeiro, sugerindo um papel fundamental no desfecho da doença de TB (Hossain & Norazmi, 2013).

Além do balanço de citocinas, vários outros processos celulares de defesa do hospedeiro vêm sendo associados com o tipo de PRRs que são ativados durante a infecção por *M. tb*, como: inflamação, apresentação de antígenos, apoptose, autofagia e amadurecimento de fagossoma (Mishra *et al.*, 2017).

### **1.2.2 A resposta do hospedeiro à infecção por *M. tuberculosis***

O reconhecimento e a fagocitose do *M. tb* por macrófagos induz a expressão de uma variedade de genes que controlam a função imune desses fagócitos, buscando a eliminação do patógeno (Figura 1.3). Para isso, diversos mecanismos microbicidas são empregados, dentre eles a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários reativos de nitrogênio (RNS), além da acidificação fagossomal e a secreção de citocinas e quimiocinas (Awuh & Flo, 2017).



**Figura 1.3 Fagocitose micobacteriana e interferência na maturação fagossomal e autofagia.** As micobactérias entram na célula através da fagocitose, havendo uma grande redundância no uso de receptores. Os fagossomas, normalmente, se fundem com lisossomos para a degradação do conteúdo. No entanto, micobactérias patogênicas interferem na maturação de fagossomas e permanecem dentro de um compartimento, que pode participar na via de reciclagem endossomal. Dentro dos macrófagos, as micobactérias são privadas de ferro, mas podem obter ferro através da interação com endossomos. O escape fagossomal de *M. tb* ou pelo menos a permeabilização do fagossoma, desencadearia a autofagia. Algumas micobactérias, como *M. avium*, podem escapar à degradação e sinalização fagossomal mesmo quando fusionadas com endossomos tardios ou lisossomos. A evasão micobacteriana e estratégias de sobrevivência, em particular, a aquisição de ferro e proteínas micobacterianas, podem interferir com a maturação fagossomal e autofagia (adaptado de Awuh & Flo, 2017).

### 1.2.2.1 Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A produção de RNS e ROS é um processo rápido e que ocorre em resposta a fagocitose do patógeno através da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) e NADPH oxidase (NOX2), respectivamente (Bogdan *et al.*, 2000).

No fagossoma, óxido nítrico (NO) e ROS podem reagir espontaneamente gerando intermediários altamente reativos. ROS irão destruir lipídeos da membrana microbiana, DNA, resíduos tiol e tirosina por oxidação; e o NO pode atuar diretamente no *cluster* ferro-enxofre das enzimas bacterianas, contribuindo para a eliminação do bacilo (Weiss & Schaible, 2015).

### 1.2.2.2 Maturação fagossomal

O processo de maturação fagossomal ocorre através de sucessivas fusões e fissões do fagossoma com vesículas intracelulares. Desta forma, os fagossomas iniciais se tornam tardios e, posteriormente, fagolisossomas. Esse processo de maturação envolve a ativação das enzimas NADPH oxidase e NOS2, enzimas de degradação, como a catepsina, a produção de peptídeos/proteínas antimicrobianos (AMPs) e a acidificação do fagossoma (Awuh & Flo, 2017).

O fagossoma inicial representa o primeiro estágio após o fechamento do copo fagocítico, não possui a bomba de próton vesicular ATPase (vATPase), é caracterizado por um pH ligeiramente ácido de 6 - 6,5 e possui a proteína GTPase Rab5, como marcador de maturação fagossomal (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). As micobactérias podem interferir na maturação fagossomal, levando a manutenção das propriedades observadas nos fagossomas iniciais (Lawe *et al.*, 2002). Os fagossomas contendo *M. tb* adquirem uma proteína de revestimento, coronina ou TACO, que inibe a fusão fagossoma-lisossoma, resultando na sobrevivência micobacteriana dentro do macrófago (Jayachandran *et al.*, 2007).

A maturação do fagossoma inicial resulta no fagossoma tardio, assinalado como um estado transitório, em que está sendo construído um compartimento oxidativo e hidrolítico. Esse processo é associado à perda da proteína GTPase Rab5, a aquisição da Rab7 e das proteínas de membrana associadas ao lisossoma (LAMP-1 e LAMP-2) (Cole *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2007). A característica proeminente do fagossoma tardio é a acidificação luminal (pH em torno de 5) necessária para a atividade da maioria das hidrolases lisossomais e realizada pela vATPase (Bruns *et al.*, 2012).

O fagolisossoma é o produto final da fusão do fagossoma tardio com o lisossoma e é caracterizado por um pH de 4 - 4,5 e alta atividade hidrolase. O pH ácido é considerado um pré-requisito para ocasionar a morte de micobactérias. No entanto, *M. tb* pode sobreviver a um pH de 4,5, devido a expressão de um gene de

resistência, *rv3671c* (Vandal *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2014). A acidificação do fagossolisoma reduz o metabolismo de micobactérias, tornando-as altamente dependente de fontes de carbono disponíveis, como: piruvato, acetato ou colesterol, resultando em parada de crescimento (Baker *et al.*, 2014). As bactérias contidas em fagossomas não interagem apenas com vesículas de várias origens durante a biogênese, mas também com compartimentos de armazenamento lipídico, isto é, corpúsculos lipídicos (ou gotículas) (Melo & Dvorak, 2012).

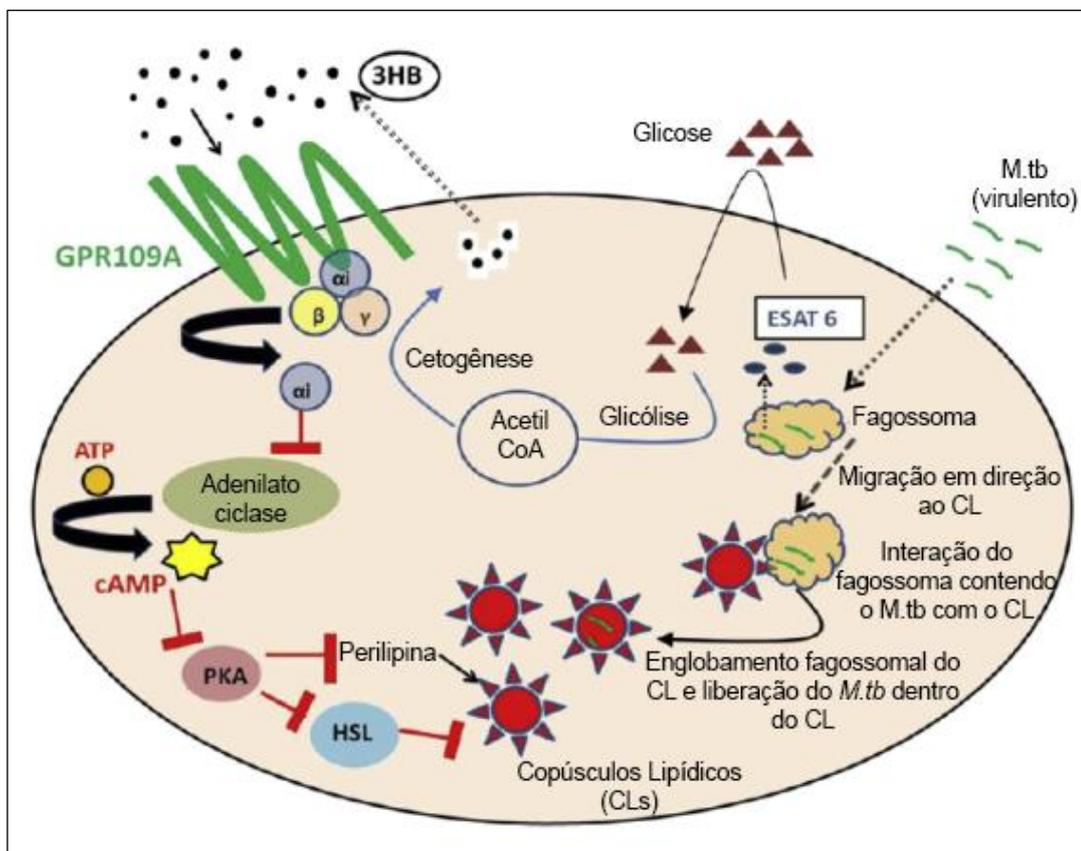
### 1.2.2.3 Corpúsculos Lipídicos

O corpúsculo lipídico (CL) é uma organela multifuncional e com estrutura única (Welte, 2015), sendo constituído de um núcleo de lipídeos neutros (triacilglicerol, colesterol, ésteres de colesterol e diacilglicerol), envolvidos por uma monocamada de fosfolipídeos e proteínas periféricas (ADRP, perilipina) (Ding *et al.*, 2012). Participam do metabolismo e armazenamento de lipídeos (Cohen *et al.*, 2011), tráfego membranar (Bartz *et al.*, 2007), apresentando proteínas com diferentes funções metabólicas (Li *et al.*, 2012; Ploegh, 2007).

O acúmulo de CL vem sendo correlacionada com diversas funções biológicas e doenças humanas (Melo *et al.*, 2011). Essa acumulação de lipídeos neutros no interior da célula hospedeira é uma característica chave para a infecção bacteriana por *M. tb*, resultando em macrófagos infectados com aparência espumosa, bem como das células adjacentes não infectadas (Daniel *et al.*, 2011). Esses macrófagos espumosos participam na formação do granuloma e na consequente manutenção da infecção (Singh *et al.*, 2012).

Macrófagos infectados por *M. tb* cepa H37Rv (virulenta) apresentam um maior aumento de CLs quando comparados aos macrófagos que foram infectados pela cepa H37Ra (avirulenta), inferindo uma relação entre acumulação de CL com a capacidade de evasão do hospedeiro (Figura 1.4). Essa relação é pautada na habilidade de *M. tb* de evadir e manipular o sistema imune do hospedeiro (Russell *et al.*, 2009; Tanigawa *et al.*, 2012). Uma vez que a acumulação de CL está correlacionada com a inibição tanto da autofagia quanto da acidificação fagossomal. Através da microscopia eletrônica foi possível observar que o fagossoma contendo o bacilo migra em direção ao CL e o engloba. Posteriormente, as micobactérias do fagossoma são liberadas dentro desses CL que foram englobados, assegurando

uma forma de proteção à sobrevivência intracelular do patógeno contra os mecanismos microbicidas da célula hospedeira (Singh *et al.* 2012).



**Figura 1.4 Esquema do possível mecanismo pelo qual cepas virulentas de *M. tb* induzem diferenciação para macrófagos espumosos.** Após ser fagocitado pelo macrófago hospedeiro, o *M. tb* secreta a proteína ESAT6, estimulando a absorção de glicose pela célula infectada. Isso provavelmente aumenta a taxa de glicólise, levando a uma acumulação de acetil-CoA. O excesso de acetil-CoA inibe a atividade da adenilato ciclase, reduzindo os níveis celulares de AMPc e interrompendo a atividade da proteína quinase A (PKA). A inatividade da PKA reduz a fosforilação da perilipina. A perilipina não fosforilada forma um revestimento protetor na superfície do CL protegendo-o contra a lipólise por lipase hormônio-sensível (HSL). Os fagossomas que contêm *M. tb* migram para os CLs e, finalmente, os englobam. A liberação subsequente das micobactérias nesses CLs garante a proteção contra as vias microbicidas celulares do hospedeiro e permite a persistência dos bacilos (adaptado de Singh *et al.* 2012).

Estudos utilizando o modelo murino infectado por *M. bovis* BCG relatam o aumento na biogênese de CL, de forma dose e tempo dependentes. A presença desses CLs em macrófagos ativados estaria associada com a liberação de citocinas, como IL-10 e TNF- $\alpha$ , além de Prostaglandina E2 (PGE2). A síntese de PGE2 pode ocorrer dentro do CL e está diretamente relacionada com o aumento na formação de CL, induzindo a secreção da citocina IL-10 e inibindo citocinas como TNF- $\alpha$  (D'Avila *et al.*, 2006)

#### 1.2.2.4 Papel das citocinas na tuberculose

Macrófagos infectados por *M. tb* produzem e secretam várias citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), fatores imunossupressivos (IL-10) e quimiocinas (MIP-1 $\beta$  e MCP-1) que são envolvidos na regulação da função das células imune (Bhatt & Salgame, 2007; Berrington & Hawn, 2007). Essas citocinas e quimiocinas recrutam células inflamatórias (células T, neutrófilos) para as áreas de infecção, ativam a transmigração de células e coordenam a resposta inflamatória e imune adaptativa em resposta ao *M. tb*. Dessa forma, o sucesso da infecção bacteriana depende da rede de citocinas que é estabelecida pelos macrófagos infectados e a sua manutenção (Berrington & Hawn, 2007).

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T quando expostos a produtos microbianos, provenientes de *M. tb* (Flynn & Chan, 2001). Durante o processo infeccioso esta citocina atua auxiliando na contenção da infecção e do crescimento bacteriano através da indução de formação do granuloma (Bekker *et al.* 2001, Kisich *et al.* 2002). Juntamente com o INF- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  ativa a produção de óxido nítrico sintase 2 (NOD2), permitindo que o macrófago iniba a replicação intracelular do *M. tb* através da geração de intermediários reativos de nitrogênio (Chan *et al.*, 1992; Fleisch *et al.*, 1994). Em humanos, evidências sugerem o TNF- $\alpha$  com um importante papel para a defesa do hospedeiro contra *M. tb*. Pacientes que receberam inibidores de TNF- $\alpha$  apresentaram aumento da reativação da doença e maior susceptibilidade ao patógeno (Keane *et al.*, 2001).

O TNF- $\alpha$  induz a apoptose de macrófagos alveolares infectados por *M. tb*, acarretando indiretamente na redução da carga bacteriana. No entanto, cepas virulentas de *M. tb* são capazes de reduzir a atividade de TNF- $\alpha$  e consequentemente a apoptose dos macrófagos (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998). Desta forma, TNF- $\alpha$  tem sido considerado um indicador da capacidade de conter o crescimento de *M. tb* em monócitos e macrófagos humanos, considerado como um potencial mecanismo de evasão (Engele *et al.*, 2002).

Além disso, a produção da citocina TNF- $\alpha$  regula positivamente a secreção de outras quimiocinas, tais como: CCL2 (MCP-1), CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 e CXCL13 (Tessier *et al.*, 1997).

A interleucina 1- $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células imunes sob a forma de um precursor inativo (pro-IL-1 $\beta$ ), que é ativado

através da clivagem pela enzima caspase 1. A conversão da pro-IL-1 $\beta$  para a IL-1 $\beta$  pode ocorrer em resposta ao estímulo de diferentes bactérias, incluindo *M. tb*. A citocina IL-1 $\beta$  regula positivamente mediadores necessários à contenção da infecção por *M. tb* desenvolvendo um importante papel na patogenicidade (Dinarelli, 2009). Animais incapazes de produzir as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  apresentaram granulomas maiores após a infecção e foram incapazes de eliminar as micobactérias, quando comparados ao grupo controle (Yamada *et al.*, 2000).

A citocina IL-6 é um importante fator envolvido na resposta inicial contra as micobactérias, favorecendo o estabelecimento da inflamação aguda, na hematopoese e na diferenciação de linfócitos (Raja, 2004). É sintetizada por fagócitos, células endoteliais e fibroblastos, em resposta a microrganismos e aos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, e indiretamente pela translocação nuclear do NF- $\kappa$ B (Kishimoto, 2010). A IL-6 é uma citocina pluripotente com propriedades anti- e pró-inflamatórias, produzida na fase inicial da infecção micobacteriana e envolvida na diferenciação de macrófagos e células T citotóxicas (Shiratsuchi *et al.*, 1991; Schindler *et al.*, 1990). Juntamente com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , participa no recrutamento das células imunes para os locais de infecção, formando o granuloma e controlando a infecção por *M. tb* (Takeda & Akira, 2004; Bean *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2000).

A quimiocina IL-8 é secretada por células fagocíticas após serem estimuladas com *M. tb* ou seus produtos (Zhang *et al.*, 1995; Riedel & Kaufmann, 1997), levando ao recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção. O aumento dos níveis de IL-8 detectado no fluido de lavagem broncoalveolar em indivíduos infectados com *M. tb* foi associado ao aumento da mortalidade desses pacientes (Sadek *et al.*, 1998).

A quimiocina CCL2, também conhecida como proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1), é induzida em monócitos infectados por *M. tb* (Lin *et al.*, 1998) e é secretada em resposta a estimulação de TNF- $\alpha$  e IL-1. MCP-1 provoca a quimiotaxia de linfócitos T de memória, células *natural killer* e macrófagos para o sítio de inflamação. Estudos mostraram que camundongos deficientes em MCP-1 falharam em recrutar monócitos e na formação do granuloma (Lu *et al.*, 1998). Além disso, a super expressão da quimiocina MCP-1 levou ao aumento da susceptibilidade de camundongos ao patógeno intracelular, sugerindo uma possível modulação na severidade da doença (Rutledge *et al.*, 1995).

A quimiocina MIP-1 $\beta$  é produzida por macrófagos ativados, células dendríticas, células *natural killer* e células T (Lehner *et al.*, 2011), com efeito quimioatraente principalmente para células T auxiliares ativadas e macrófagos (Sherry *et al.*, 1998). A secreção de MIP-1 $\beta$  é induzida por TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1, e modulada negativamente por citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 (Sherry *et al.*, 1998; Maurer & von Stebut, 2004).

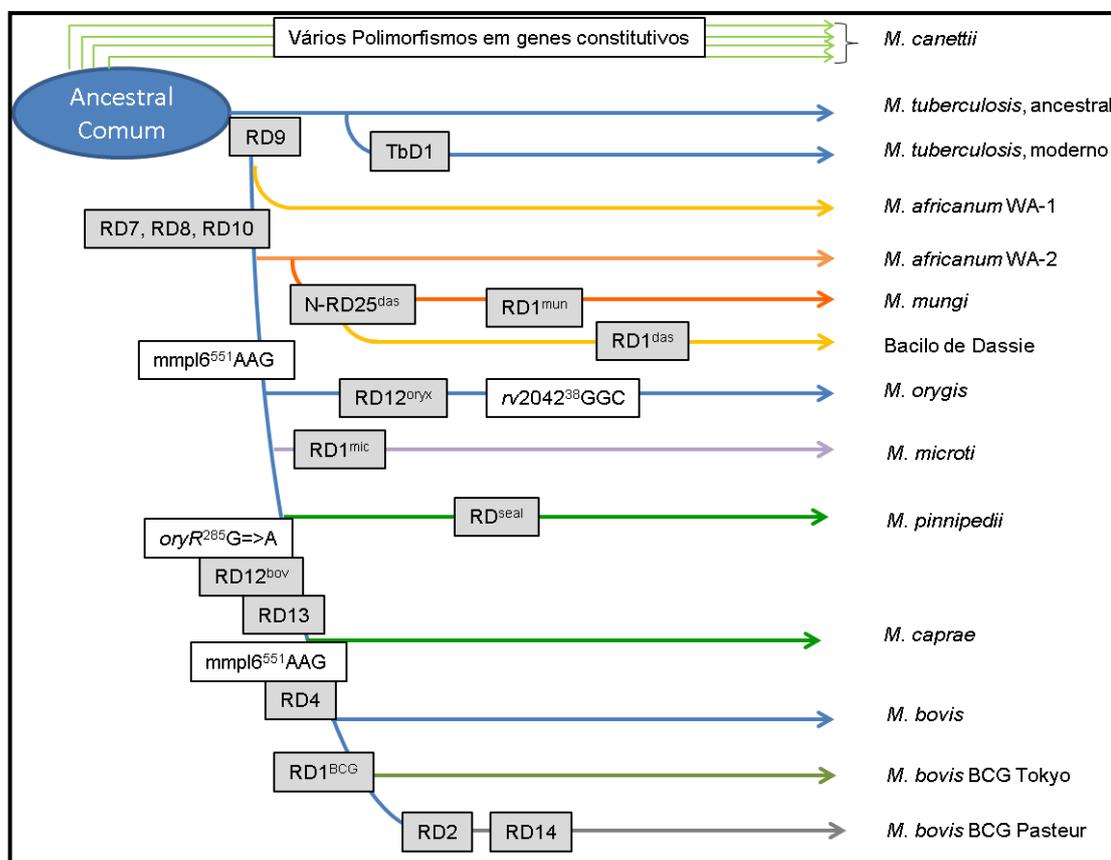
Amostras de sangue provenientes de pacientes com tuberculose e de seus contatos domésticos foram analisadas com o kit QuantiFERON Gold, que consiste na avaliação da resposta imune celular por meio da dosagem de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Apesar de ser um teste acurado para diagnosticar TB, não distingue a TB ativa da TB latente. Buscando identificar possíveis biomarcadores para cada fase da doença, o sobrenadante proveniente do teste QuantiFERON Gold foi recolhido e avaliado através da dosagem multiplex de citocinas (Luminex). Os níveis antígeno-específico para MIP-1 $\beta$  foram correlacionados à presença da tuberculose ativa, com sensibilidade de 85% e especificidade de 61%, parâmetros que eram melhorados com a utilização combinada de outros marcadores (Chegou *et al.*, 2009).

Resultados similares foram obtidos para pacientes com uma baixa carga de bacilos, onde MCP-1 mostrou sensibilidade e especificidade para confirmar casos de TB comparados com controles presumidamente não infectados (Kellar *et al.*, 2011). No entanto, estudos utilizando apenas MCP-1 revelaram um pequeno potencial para diagnosticar tuberculose ativa ou infecção latente, de acordo com o que havia sido definido pelo IGRA positivo (Frahm *et al.*, 2011).

### 1.3 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* abrange mais de 180 espécies, incluindo espécies saprófitas não patogênicas de vida livre (como *M. smegmatis*) até patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis* e *M. leprae*, agentes causadores da tuberculose e hanseníase, respectivamente (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). As micobactérias são tradicionalmente classificadas quanto ao tempo de crescimento: bactérias de crescimento rápido (capazes de formar colônias em meio sólido em cerca de uma semana, compreendendo as micobactérias saprófitas) e bactérias de crescimento lento (tempo de formação de colônia de cerca de três semanas e abrange a maioria das espécies patogênicas) (Runyon, 1959). As micobactérias pertencentes ao complexo

*M. tb* são estritamente patogênicas, de crescimento lento e podem desencadear a TB no homem e em animais (Brennan & Nikaido, 1995; Tortoli, 2006; Alexander *et al.*, 2010) (Figura 1.5).



**Figura 1.5** Representação esquemática das relações filogenéticas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. As caixas cinzas representam presença ou ausência de regiões genômicas e as caixas brancas representam polimorfismo de base única (SNPs). (Adaptado de Alexander *et al.*, 2010).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é um grupo de micobactérias altamente relacionadas, abrangendo oito espécies e subespécies que incluem *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* e *M. caprae* (van Soolingen *et al.*, 1997; Niemann *et al.*, 2002; Cousins *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2010). O *M. bovis* BCG, cepa atenuada de *M. bovis*, é considerado constituinte do complexo de *M. tb*, devido às semelhanças fenotípicas e genéticas (Behr *et al.*, 1999; Rosemberg, 2001; Gibson *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2017).

A análise de dados de sequenciamento genômico revelou que os microorganismos membros do complexo possuem 99,9% de similaridade em relação à sequência de nucleotídeos e apresentam sequências idênticas do RNA ribossomal 16S (Brosch *et al.*, 2000; Rodriguez-Campos *et al.*, 2014). No entanto, podem diferir

bastante entre si quanto a aspectos como: uma ampla deleção em *locus* cromossômico, espectro de hospedeiros, fenótipos e patogenicidade (Galagan, 2014). A genômica comparativa identificou múltiplos polimorfismos entre os membros do complexo *M. tb*, contribuindo para o esclarecimento da diversidade fenotípica observada. As regiões polimórficas superiores a, aproximadamente, 0,5 kb são denominadas regiões de diferença, ou *loci* “RD”. A relevância desta informação genômica foi explorada, por exemplo, no estudo das diferentes cepas vacinais de BCG (Gordon *et al.* 2009).

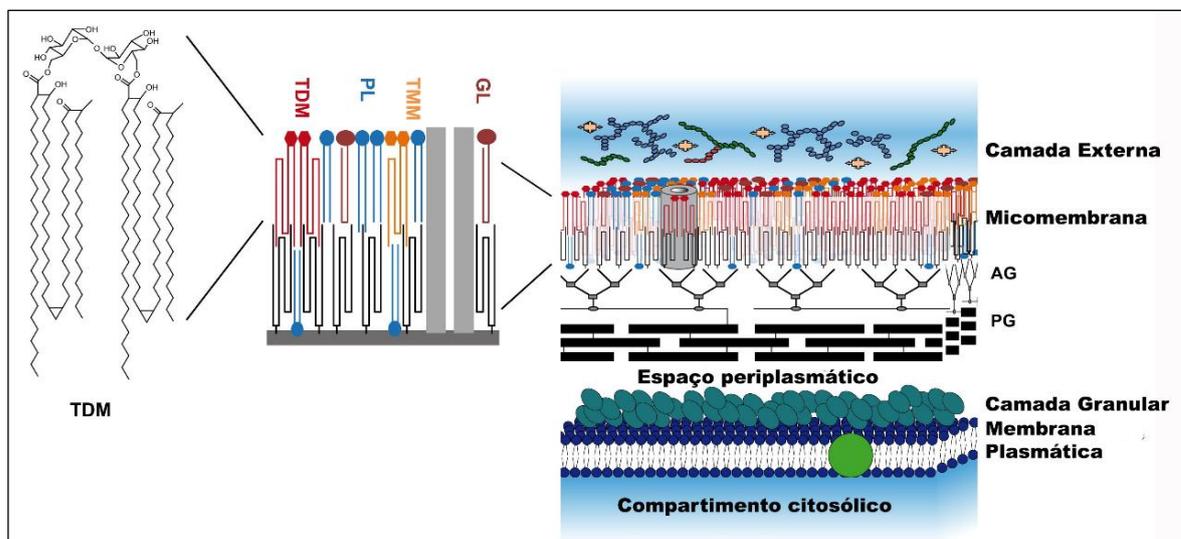
### 1.3.1 *M. tuberculosis*: agente etiológico da tuberculose

*M. tuberculosis*, identificado pelo médico alemão Robert Koch em 1882, pertence à família Mycobacteriaceae, apresenta forma reta ou ligeiramente curva, é imóvel, aeróbio estrito, caracterizado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), não corado pelo método de GRAM, de crescimento lento, intracelular facultativo e capaz de entrar em dormência (Wheeler & Ratledge, 1994; King *et al.*, 2017).

Apesar de descrito como não esporulado e nem encapsulado (Wheeler & Ratledge, 1994; Uhía *et al.*, 2015), análises de bioinformática indicam que o genoma de *M. tb* possui genes semelhantes aos envolvidos na esporulação de *B. subtilis* (Piggot & Hilbert, 2004). Evidências de dados microscópicos e de coloração de esporos indicam uma provável esporulação em *M. bovis* BCG. A esporulação observada poderia representar uma adaptação para prolongar a forma estacionária (não-replicativa), um mecanismo utilizado em resposta às condições ambientais, podendo ser um dos meios pelos quais o *M. tb* alcance a dormência na célula hospedeira (Ghosh *et al.*, 2009). Apesar das evidências, a ocorrência da esporulação em micobactérias ainda é controversa, visto a necessidade de compreensão das condições exatas que originam o processo, levando ao seu entendimento (Uhía *et al.*, 2015).

Além do mais, o *M. tb* exibe algumas características muito peculiares, como uma complexa superfície celular, rica em lipídeos, proteínas e açúcares (figura 1.3) conferindo propriedades importantes, tais como: resistência a alguns agentes químicos como álcool e ácido, sendo denominado BAAR, e impermeabilidade à maioria dos antibióticos, propiciando um grau de resistência contra mecanismos micobactericidas, o qual é complementado por enzimas detoxificadoras produzidas

pelo próprio bacilo (Besra *et al.*, 1995; Daffé & Draper, 1998; Stewart *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2011; Marrakchi *et al.*, 2014).



**Figura 1.6. Representação esquemática do envelope micobacteriano:** A camada mais externa é composta basicamente por proteínas e glucano, com uma fina camada lipídica. A micomembrana corresponde à barreira de permeabilidade. A membrana interna é formada por cadeias paralelas de ácidos micólicos (AM, em preto), ligadas a arabinogalactana (AG), que está associada a peptidoglicanos (PG). A camada interna da micomembrana é composta por lipídeos livres, incluindo dimicolato de trealose (TDM), monomicolato de trealose (TMM), vários glicolipídeos (GL) e fosfolipídeos (PL). A camada granular acima da membrana plasmática é composta de proteínas (Adaptado Marrakchi *et al.*, 2014).

### 1.3.2. *Mycobacterium bovis* BCG

A única vacina atualmente recomendada e pertencente ao cronograma de vacinação da OMS em países com alta incidência de TB é o Bacilo de Calmette e Guérin (BCG), cepa atenuada de *M. bovis* obtida no início do século XX. Apesar da vacina BCG ser empregado desde a década de 1920, apenas em 1974 foi incluída no Programa Expandido de Imunização da OMS, como forma de conter a disseminação da doença (WHO, 2005, Liu *et al.*, 2009). Como resultado da medida, mais de 4 bilhões de indivíduos foram imunizados com o BCG, sendo mais de 100 milhões de doses administradas anualmente, tornando-a a vacina mais usada mundialmente em humanos (Gengenbacher *et al.*, 2017). Estudos confirmaram a relação da vacina BCG com a proteção em crianças, contra as formas graves da tuberculose, incluindo meningoencefalite tuberculosa e tuberculose miliar, com eficácia superior a 80% (Colditz *et al.*, 1995; Trunz *et al.*, 2006; Dye, 2006; Liu *et al.*, 2009; Mangtani *et al.*, 2014; Lahey & von Reyn, 2016).

Em contrapartida, a proteção contra as formas pulmonares da tuberculose em adolescentes e adultos varia de 0 a 80%, dependendo do estudo (Colditz *et al.*, 1994; Brewer, 2000). A razão para a eficácia variável da vacina BCG é ainda desconhecida, mas pode estar associada a diversos fatores, incluindo diferenças entre cepas de BCG utilizadas nos vários países (Behr, 2002; Young *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2015), divergências na dose e via de administração, idade adotada para a vacinação, exposição prévia à micobactérias ambientais, diferenças na cepa de *M. tb* infectante e fatores genéticos inerentes às diferentes populações vacinadas (Behr, 2002; Pereira *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2015). Outros fatores como diferenças na resposta imune de cada indivíduo, fatores nutricionais e infecção por helmintos também estão relacionadas à variabilidade de proteção (Colditz *et al.*, 1995; Fine, 1995; Behr, 2002; Abdallah *et al.*, 2015).

### 1.3.2.1 Breve histórico

A vacina BCG foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin, no Instituto Pasteur de Lille, na França. Iniciaram seus estudos de atenuação em 1908, a partir de uma cultura de *Mycobacterium bovis* virulento, que havia sido isolado do leite de uma vaca com mastite tuberculosa, em 1902, por Edmond Nocard (Yamamoto & Yamamoto, 2007; Lahey & von Reyn, 2016).

Buscando obter uma cultura homogênea da cepa virulenta, Calmette e Guérin fizeram, a cada três semanas, sub-culturas do isolado de *M. bovis* sobre a superfície de batata cozida em meio contendo bile bovina, suplementado com glicerol (Hawgood, 1999).

Ao final de 13 anos (1908-1921), após 231 passagens consecutivas *in vitro* da amostra de *M. bovis*, Calmette e Guérin obtiveram organismos mutantes, no qual foram observadas alteração morfológica das colônias e perda gradual da virulência, mantendo uma limitada capacidade de infecção e propriedades imunogênicas. Esta amostra atenuada foi batizada como BCG (Bacilo de Calmette e Guérin), e foi utilizado com sucesso na imunização ativa de vacas, sem produzir a doença (Yamamoto & Yamamoto, 2007; Lahey & von Reyn, 2016).

Em julho de 1921, a vacina foi administrada oralmente pela primeira vez em humanos, em um bebê de 3 dias, cuja mãe havia falecido de tuberculose poucas horas após o parto. O recém-nascido recebeu três doses da vacina via oral, não apresentou efeitos colaterais deletérios e o mais importante, não desenvolveu

tuberculose. Entre 1921 e 1924, a vacina foi oferecida a mais 600 crianças, sem relatos de sérias complicações (Lahey & von Reyn, 2016).

Em 1924, após Calmette e Guérin demonstrarem que o BCG era seguro e atenuado, o Instituto Pasteur distribuiu as culturas de BCG para laboratórios em todo o mundo (revisto por Tran *et al.*, 2014). Por tratar-se de uma vacina viva, apesar dos esforços para padronização do crescimento e preparação da vacina, diferentes condições de passagem foram utilizadas nos diferentes laboratórios de produção e a evolução *in vitro* do BCG prosseguiu. Emergiram diversas sub-cepas distintas, incluindo a cepa BCG Moreau, que é a vacina administrada no Brasil (Liu *et al.*, 2009; revisto por Tran *et al.*, 2014).

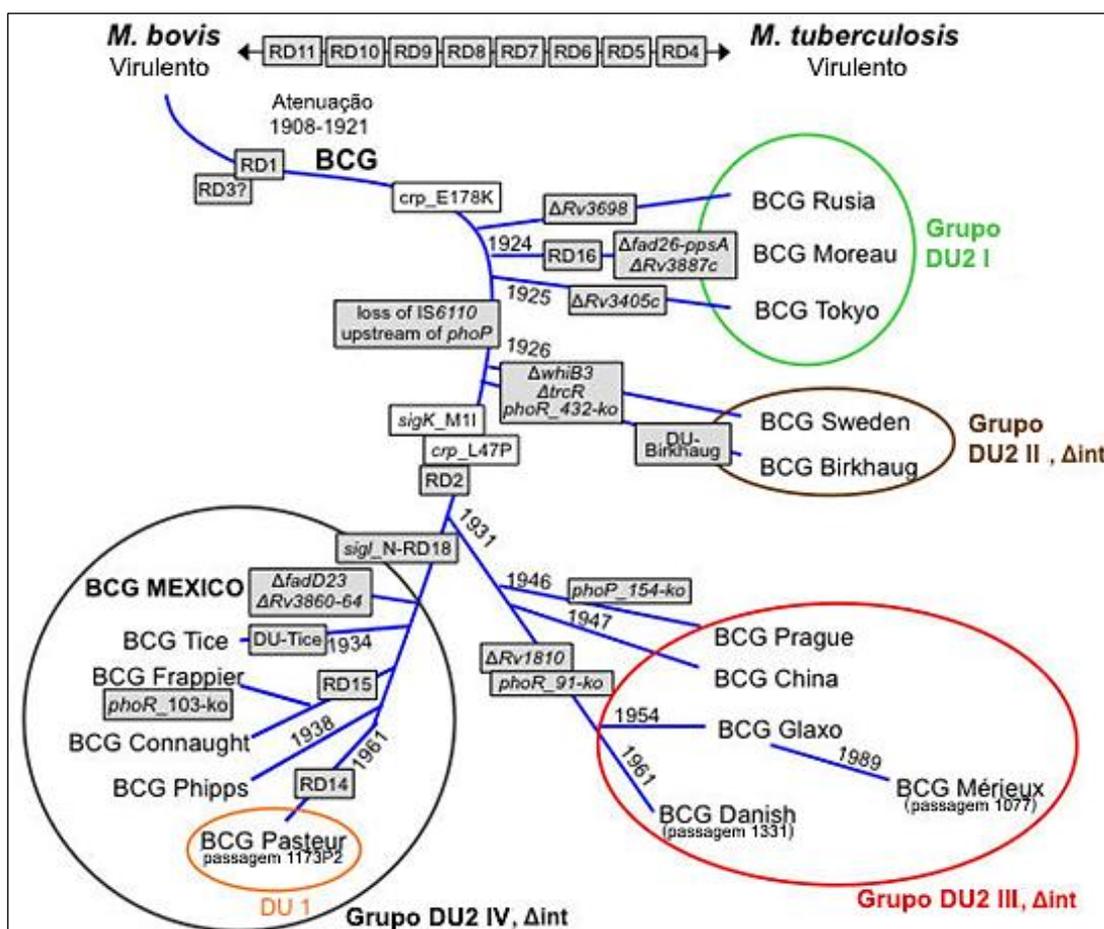
### **1.3.2.2 Genealogia das vacinas BCGs: diferentes BCGs diferentes vacinas**

Visando compreender a evolução, atenuação e variabilidade protetora das sub-cepas de BCG, foram realizados estudos de genômica comparativa, que revelaram a existência de eventos genéticos, incluindo deleções, duplicações e SNPs. O estudo das diferenças genéticas identificadas e o fenótipo correspondente vêm contribuindo para a compreensão dos mecanismos que resultam numa eficácia protetora variável entre as diferentes cepas BCG (Behr *et al.*, 2001; revisto por Tran *et al.*, 2014).

Pode-se dizer que as vacinas BCG atualmente disponíveis passaram por duas fases de atenuação. Na primeira fase (1908-1921), comum a todos os BCGs, ocorreu a atenuação da cepa *M. bovis* após 231 passagens *in vitro*, realizadas por Calmette e Guérin. Essa atenuação é explicada parcialmente pela deleção da região RD1, no entanto, não exclui que outras mutações possam ter contribuído para a perda da virulência (revisto por Tran *et al.*, 2014).

A segunda fase teve início por volta de 1924, com a distribuição mundial da vacina BCG. A partir de cultivos subsequentes da cepa original, entre as décadas de 1940 e 1950, os laboratórios observaram algumas diferenças fenotípicas. Essa evolução *in vitro* pode ter sido favorecida pela manutenção da cepa em meio de cultivo não definido, bem como condições de crescimento variáveis. Esse período foi concluído algumas décadas depois com a criação dos lotes sementes (revisto por Tran *et al.*, 2014) e resultou em mutações adicionais cepa-específicas, tornando relevante a apreciação da virulência, eficácia e mecanismos de atenuação dentro do contexto de cada cepa BCG (Liu *et al.*, 2009).

A classificação que surge a partir das árvores filogenéticas consiste na divisão entre cepas “primitivas” e cepas “recentes”. As cepas primitivas, como o BCG Moreau, foram obtidas no início da década de 1920 e seriam mais virulentas e imunogênicas. Enquanto que as cepas “recentes”, como BCG Pasteur, seriam as cepas obtidas a partir de 1927, após a perda da RD2 (Figura 1.7). Esta região está mantida nas cepas derivadas antes de 1927, como é o caso do BCG Moreau, e inclui os genes *rv1980c* e *rv1984c*, que codificam as proteínas imunogênicas Mpt64 (Wang *et al.*, 2007) e Cfp21 (Kalra *et al.*, 2007).



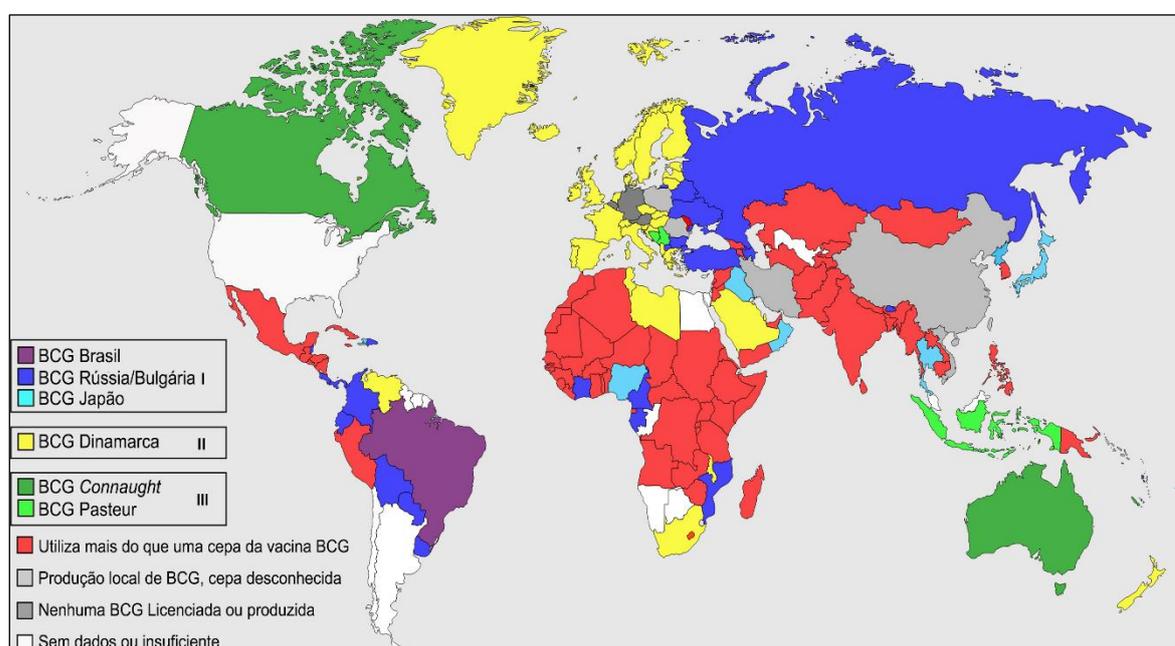
**Figura 1.7: Genealogia das vacinas BCG.** O esquema apresenta as regiões de diferença (RD) das vacinas, duplicações, inserções e deleções (adaptado de Brosch *et al.*, 2007).

O desafio atual está em reunir informações experimentais e da genética descritiva para compreender como as diferentes vacinas BCGs interagem com o sistema imunológico. Apesar dos estudos demonstrarem evidências relevantes correlacionando o uso das diferentes vacinas BCGs com a resposta imune induzida e, conseqüentemente, com a proteção oferecida contra a tuberculose, não há dados

suficientes que favoreçam ou indiquem uma cepa vacinal em particular, como sendo mais protetora ou universal (Ritz *et al.*, 2008; revisto por Tran *et al.*, 2014).

### 1.3.2.3 Uso mundial das diferentes BCGs

Ritz e Curtis revisaram em 2009 os dados da OMS/UNICEF, gerando o primeiro mapa que mostra o uso das cepas vacinais de BCG nos diferentes países (Figura 1.8). Além disso, correlacionaram dados referentes à incidência da TB com a utilização das diferentes cepas de BCG nos países analisados. Essas informações podem contribuir na interpretação das diferenças na proteção vacinal e no desenho racional de novas vacinas contra TB.



**Figura 1.8** Cepas da vacina BCG utilizadas entre 2003 e 2007 em todo o mundo. As vacinas BCG agrupadas numa mesma caixa são geneticamente mais similares. (Adaptado de Ritz & Curtis, 2009).

### 1.3.2.4 Novas vacinas contra tuberculose

A variabilidade da eficácia protetora da vacina BCG, o pequeno declínio da incidência de TB e o aumento dos casos cepas resistentes são elementos que evidenciam o grave quadro da doença e a necessidade de desenvolver novos candidatos vacinais. Atualmente, cerca de 13 novas vacinas (Figura 1.9) estão sendo avaliadas quanto à sua capacidade de prevenir a infecção, a progressão da doença e a reativação da tuberculose latente (Zenteno-Cuevas, 2017). Esses candidatos vacinais contra a tuberculose encontram-se em diferentes fases de

pesquisa, na busca por um aprimoramento ou mesmo substituição da vacina atualmente utilizada (Lambert *et al.*, 2009).

Para o desenvolvimento de novas vacinas contra tuberculose, três principais abordagens devem ser consideradas: (1) as vacinas BCG recombinantes (rBCG), baseadas na modificação genética do BCG, tornando-o mais imunogênico; (2) vacinas de reforço (*booster*), que visam reforçar a imunidade conferida pela vacina BCG e (3) novas vacinas terapêuticas, visando fortalecer o sistema imunológico do paciente para eliminar células infectadas por *M. tb*, prevenindo a reativação e reduzindo o tempo de tratamento. No caso das vacinas terapêuticas, as duas principais propostas baseiam-se em: (1) fusão de proteínas, proteínas de subunidade e fragmentos bacterianos revestidos por lipossomos e (2) outras espécies de micobactérias inativadas por calor (Zenteno-Cuevas, 2017).

Vacina	Vetor/ Adjuvante	Antígenos	Abordagem
<b>Fase clínica III</b>			
Vaccae/MOD-901	<i>Mycobacterium vaccae</i> / <i>M. obtuense</i>	Poliantigênico	Micobactéria inativada por calor
MIP	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	Poliantigênico	Micobactéria inativada por calor
<b>Fase clínica IIb</b>			
VPM1002	rBCG $\Delta$ ureC:hly (motivo PEST) <i>L.monocytogenes listeria-lysin O</i>	Listerolisina e domínio da deleção da uréase	Nova rBCG
Mtb72F/ASO1/ASO2A	Proteína recombinante com ASO1 e Mtb39a (Rv1196)	Mtb39a (Rv1196) Mtb32a (Rv0125)	Fusão proteica
<b>Fase clínica IIa</b>			
DAR-901	Inativação por calor <i>M. vaccae</i> / <i>M. obtuense</i>	Poliantigênico	Micobactéria inativada por calor
RUTI	Fragmentos de <i>M. tuberculosis</i> em vacina terapêutica de lipossomas	Poliantigênico	Fragmentos bacteriano
H1/H56/IC31	Fusão da proteína recombinante Ag85B com Ag IC-31 ou CAF01	ESAT6 (Rv3785) R2660	Fusão proteica
H4:IC31	Proteína recombinante com IC-31	TB10.4 (Rv0288) fusionado com Ag85B	Fusão proteica
ID93/GLA-SE	ID93 (fusão de quatro proteínas) com GLA-SE	Rv3619, Rv1813c, Rv3620c, Rv2608	Fusão proteica
<b>Fase clínica I</b>			
MTBVAC	Deleção dos genes <i>phoP</i> e <i>fadD26</i>	Poliantigênico	Micobactéria inativada
Ad5-Ag85A	Adenovirus recombinante sorotipo 5	Ag85A (Rv3804c)	Vetor viral
ChAdox1.85A/MVA85A	Simian adenovírus	Ag85A (Rv3804c)	Vetor Viral
TB/FLU-04L	Vacina vetor Influenza vaccine	Ag85A e ESAT-6	Vetor viral

**Figura 1.9 Candidatos vacinais em fase clínica, de acordo com o Global Tuberculosis Report 2016** (adaptado de Zenteno-Cuevas, 2017)

Além dos esforços para caracterizar os alvos já mencionados, o melhor entendimento da fisiopatologia do bacilo da tuberculose e da vacina propriamente dita vem fornecendo dados que estão levando à descoberta e validação de novos alvos terapêuticos, assim como possíveis candidatos para uma vacina mais eficiente. Dentre esses alvos destacam-se algumas proteínas que estão envolvidas nos mecanismos de proteção a diferentes tipos de estresse (Kumar *et al.*, 2011).

### 1.3.2.5 Cepa vacinal brasileira: *M. bovis* BCG Moreau e o esquema vacinal

Uma amostra da vacina BCG, proveniente do Instituto Pasteur, chegou ao Brasil através do médico uruguaio Júlio Elvio Moreau, em 1925. Esta amostra foi entregue ao pesquisador Arlindo de Assis no Rio de Janeiro e recebeu o nome de BCG Moreau (Benévolo-de-Andrade *et al.*, 2005)

Inicialmente, a vacina BCG foi produzida por Arlindo de Assis, no Instituto Vital Brasil, em Niterói. Após 1930, a produção passou a ser realizada na Fundação Ataulpho de Paiva (FAP), sendo responsável também por sua distribuição (Benévolo-de-Andrade *et al.*, 2005).

A vacina BCG Moreau está filogeneticamente próxima à cepa BCG de 1921 e é conhecida como uma das cepas mais imunogênicas. Cabe ressaltar que a cepa BCG Moreau foi uma das primeiras cepas distribuídas pelo Instituto Pasteur, juntamente com o BCG Tokyo (1924) e Rússia (1925); estas cepas são consideradas mais “antigas” e ainda preservam a região RD2 (Antas *et al.*, 2008; Antas, 2016).

Em relação à proteção da vacina BCG no Brasil, o efeito protetor da primeira dose aplicada no período neonatal é considerado satisfatório e o efeito em adolescentes (15 a 20 anos) foi de 39% (9%-58%), apontando a longevidade do efeito da primeira dose por mais de duas décadas (Barreto *et al.*, 2005).

Dados do nosso grupo apontam divergências entre os genomas da cepa de *M. bovis* BCG Moreau e BCG Pasteur, cepa de referência (Gomes *et al.*, 2011). Além disso, a caracterização do perfil proteômico bidimensional do filtrado do sobrenadante de cultura dessas cepas ressaltou diferenças quando cultivadas em meio Sauton (Bêrredo-Pinho *et al.*, 2011), que poderiam estar contribuindo no efeito protetor dessas vacinas.

### 1.4 Células THP-1

Para o estudo da interação entre micobactérias e macrófagos vários sistemas vêm sendo empregados como modelo, de modo a simular a associação de *M. tb* com macrófagos humanos. Dentre os modelos usados, cabe destacar (1) os isolados de células primárias, como: macrófagos peritoneais de murino (Stokes *et al.*, 1993), macrófagos alveolares murino (Schlesinger *et al.*, 1990) e macrófagos alveolares humanos (Aston *et al.*, 1998); (2) as células diferenciadas *in vitro*, tais

como macrófagos de medula óssea de murino (Xu *et al.*, 1994) e macrófagos derivados de monócitos (MDM) humanos (Silver *et al.*, 1998); e (3) linhagens celulares semelhantes a macrófagos de murino (Mehta *et al.*, 1996) e humanos (Kremlev & Phelps, 1997). Esses diferentes modelos têm propriedades específicas e interagem com as micobactérias de forma diferente.

Estudos que avaliam a função de monócitos/macrófagos são restritivos, uma vez que estas células não podem ser expandidas *ex vivo*. Linhagens de células monocíticas apresentam poucos receptores e são menos eficientes em fagocitar patógenos. No entanto, macrófagos diferenciados exibem um grande número de receptores, com capacidade fagocítica aumentada. Além disso, macrófagos de linhagem constituem uma população homogênea, conferindo uma vantagem em relação aos monócitos humanos nativos (Auwerx, 1991; Daigneault *et al.*, 2010). Apesar do modelo com células de linhagem ser considerado um modelo de interface simplificada da relação patógeno-hospedeiro, vem sendo usado para definir interações bacterianas com tipos celulares específicos, fornecendo uma visão geral da progressão da doença bacteriana (Waddell *et al.*, 2007).

A partir da purificação de monócitos do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda obteve-se a linhagem celular leucêmica monocítica humana, THP-1. Esses monócitos adquirem características de macrófagos mediante a utilização de citocinas e agentes farmacológicos, como acetato de forbol-miristila (PMA) e 1,25- dihidroxivitamina d3 para promover sua diferenciação. O PMA atua através da ativação da proteína quinase C, induzindo a diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos. Esse processo de diferenciação acarreta na diminuição da replicação de DNA, adesão ao substrato (plástico) e morfologia similar a macrófagos primários. Além disso, é possível detectar a expressão de marcadores de superfície que são conhecidamente descritos como associados à diferenciação de macrófagos (Schwende *et al.*, 1996).

O modelo de células THP-1 é considerado um bom modelo para substituir MDM humano quando usado para investigar a relação de micobactéria/macrófago, apresentando como vantagem a menor variabilidade entre doadores comumente encontrados em MDM, a quantidade de células que podem ser facilmente cultivadas e diferenciadas para estudos bioquímicos ou de expressão gênica. Além disso, a linhagem celular tende a ser mais favorável à manutenção a longo prazo após a infecção com *M. tb* (Stokes & Doxsee, 1999).

Essa linhagem já foi empregada para análise do crescimento e persistência bacteriana (Theus *et al*, 2004), avaliação do perfil de expressão gênica de *M. bovis* BCG no contexto intracelular macrofágico (Rienksma *et al.*, 2015) e do perfil de expressão proteica de isolados clínicos de *M. tb* (Singhal *et al.*, 2012). A escolha por esse modelo favorece o entendimento dos eventos moleculares e celulares envolvidos durante a interação entre macrófago e micobactéria.

### 1.5 Justificativa

A tuberculose continua sendo considerada um grave problema de saúde pública no Brasil, devido a sua alta incidência. A única vacina disponível como forma de prevenção da TB é a vacina BCG, no entanto, sua eficácia varia de 0 – 80% (Brewer, 2000). Um dos fatores para esta variação reside na escolha da cepa utilizada em cada país (Abdallah *et al.*, 2015). No Brasil a cepa BCG Moreau é utilizada desde os anos 1920, mas apesar disso só recentemente vem sendo caracterizada de forma mais detalhada ao nível molecular. Um dos aspectos que impactam na eficácia vacinal é a interação da bactéria com a célula hospedeira. Desta forma, torna-se essencial a apreciação da resposta da cepa vacinal brasileira, BCG Moreau, ao estresse intrafagosomal provocado por macrófagos. Para avaliar o comportamento do BCG Moreau, optamos por usar como cepa de referência o BCG Pasteur e, em alguns experimentos, acrescentar a cepa Tokyo, uma cepa caracterizada como primitiva, mais próxima ao BCG Moreau. Além da escolha das cepas, optamos por um modelo de estudo de monócitos/macrófagos de linhagem humana (THP-1), que permite caracterizar mecanismos básicos que estão sendo ativados pela interação patógeno-hospedeiro. Assim, poderemos obter informações relevantes para o entendimento da fisiologia da vacina BCG Moreau e de como esse comportamento pode estar interferindo no efeito protetor da vacina.

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento da cepa vacinal brasileira, *M. bovis* BCG Moreau no contexto da infecção de macrófagos humanos, comparando com outras cepas BCG (Pasteur e Tokyo), caracterizando tantos aspectos da resposta bacteriana quanto da célula hospedeira.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Padronizar o protocolo de diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos;
2. Comparar o perfil de sobrevivência intracelular das diferentes cepas BCG em macrófagos THP-1;
3. Avaliar o nível de expressão da proteína HspX pelas cepas BCGs após a infecção;
4. Comparar o perfil de sobrevivência dos macrófagos THP-1 em resposta à infecção pelos diferentes BCGs;
5. Avaliar mudanças morfológicas dos macrófagos provocadas pela infecção pelos diferentes BCGs;
6. Analisar comparativamente o perfil de citocinas secretadas (IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL10, MCP-1, TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ ) por macrófagos THP-1 em resposta à infecção pelos diferentes BCGs;
7. Determinar diferenças no perfil de colocalização das bactérias com vesículas acidificadas durante a infecção dos macrófagos pelas diferentes cepas BCG;
8. Determinar diferenças no perfil de produção de corpúsculos lipídicos pelas células hospedeiras em resposta à infecção pelos diferentes BCGs;

### 3. Metodologia

Os materiais empregados no estudo estão descritos no anexo I.

#### 3.1 Cultura de *M. bovis* BCG

As cepas vacinais BCG Moreau (fornecida em meio Sauton / batata pela Fundação Ataufo de Paiva - FAP), BCG Pasteur e BCG Tokyo (obtidas do Instituto Pasteur, Paris e mantidas criopreservadas na coleção do LAGFB / IOC) foram cultivadas em meio de cultura líquido *Middlebrook* 7H9 (Difco™) contendo Tween 80 (Sigma) e glicerol (Sigma) (Anexo I, Tabela 8.1), suplementado com ADC (albumina, dextrose e catalase) (Anexo I, Tabela 8.2). O tempo de cultivo foi de aproximadamente 3 semanas, sob agitação constante e à temperatura de 37 °C, com passagens semanais na diluição 1:10. Ao atingir a densidade ótica (DO<sub>600nm</sub>) de aproximadamente 1,0 (correspondente a fase exponencial do crescimento micobacteriano), o cultivo foi interrompido, aliquotado em 15 % glicerol (Sigma) e o lote semente estocado a -70 °C.

#### 3.2 Quantificação do lote semente de *M. bovis* BCG através do método de unidade formadora de colônia (CFU)

Para posterior uso das alíquotas do lote semente de BCG em ensaios de infecção, a quantidade bacteriana foi avaliada através da técnica de unidade formadora de colônia (CFU). Alíquotas do lote semente de cada cepa foram descongeladas 10 min à 37 °C, centrifugadas por 10 min a 16.000 x g e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de meio líquido 7H9 / Tween 80 / glicerol / ADC e as bactérias foram mecanicamente dissociadas através de 20 passagens sucessivas em seringa de 27,5 G X ½". A partir dessa suspensão bacteriana foram feitas diluições seriadas. O equivalente a 100 µL de cada diluição foi plaqueado em placas de *Middlebrook* 7H10 (Difco™) e glicerol (Sigma) (Anexo I, Tabela 8.3), suplementado com ADC. As colônias foram quantificadas no 28º dia.

#### 3.3 Avaliação da pureza do lote semente de *M. bovis* BCG pelo método de Ziehl-Neelsen

A pureza do cultivo das cepas foi avaliada pelo método de coloração Ziehl-Neelsen. Foram adicionados 10 µL da cultura em lâmina de vidro que foi fixada por

calor, utilizando um bico de Bunsen. Posteriormente, a lâmina foi coberta com fucsina fenicada (Anexo I, Tabela 8.4) por cerca de 5 min e novamente aquecida, evitando a fervura da solução. O excesso de fucsina foi retirado por lavagem delicada com água corrente, seguida pela incubação com solução de álcool-ácido (Anexo I, Tabela 8.5) para descoloração. Após lavagem com água corrente, foi adicionado azul de metileno (Anexo I, Tabela 8.6) por cerca de 30 segundos. Após essa etapa, a lâmina foi novamente lavada com água e seca em temperatura ambiente. As lâminas foram observadas em microscópio (Nikon Eclipse Ci) com lente de imersão em aumento de 100 X. A partir das imagens geradas, foram medidas 50 bactérias isoladas de cada cepa, utilizando o programa *NSElements* (NIKON). Esses valores foram plotados e analisados no programa *GraphPrism*.

### 3.4 Avaliação da viabilidade do lote semente de *M. bovis* BCG

Para avaliar a viabilidade do lote semente de BCG utilizamos o kit *LIVE/DEAD™ BacLight bacterial viability* (Molecular Probes - Invitrogen). Alíquotas do lote semente de cada cepa foram descongeladas 10 min à 37 °C, centrifugadas por 10 min a 16.000 x g, o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de água Mili-Q estéril. As bactérias foram mecanicamente dissociadas através de sucessivas passagens em seringa de 27,5 G X ½". Foram adicionados a suspensão bacteriana 16 µM de *LIVE* (SYTO9) e 100 µM *DEAD* (Iodeto de propídio). A mistura contendo a suspensão bacteriana e os fluoróforos foi homogeneizada e incubada por 15 min, à temperatura ambiente e protegida da luz. Após a marcação, a solução bacteriana foi novamente centrifugada por 10 min a 16.000 x g e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspenso 1 mL de PBS (Anexo I, Tabela 8.7) e as bactérias foram, novamente, dissociadas em seringa de 27,5 G X ½". A lâmina foi montada com 20 µL da suspensão bacteriana marcada e 3 µL de DABCO (Sigma). As lâminas foram observadas e as imagens adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci).

### 3.5 Confirmação da identidade genética das cepas de *M. bovis* BCG

A identidade genética das cepas foi confirmada através de reação de PCR utilizando um par de iniciadores para a região RD2 e outro para o gene *rv3887* (Anexo I, Tabela 8.8). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl, utilizando o kit *Master Mix PCR* (Life Technologies), 200 ng de cada iniciador

específico (F e R) e 5 µl de uma diluição 1:100 de DNA genômico de cada cepa. A ciclagem utilizada para as reações de PCR está especificada na tabela 8.9 no Anexo I.

Os produtos de PCR foram posteriormente analisados por eletroforese em gel de 1,5 % agarose a 80 V, em 0,5 % TBE (Anexo I, Tabela 8.10). Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo, descorado com água destilada e visualizada sob luz U.V em transiluminador.

### **3.6 Cultura de células THP-1**

As células THP-1 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Milton Ozório Moraes e cultivadas em meio RPMI-1640 contendo L-Glutamina (Sigma), soro fetal bovino (SFB) (Sigma) e penicilina e estreptomicina (PEES) (Sigma) (Anexo I, Tabela 8.11). As células foram mantidas em frascos de cultura à 37 °C em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> através de repiques semanais.

### **3.7 Padronização do protocolo de diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos**

Primeiramente, diferentes concentrações de forbol-miristila (PMA, Sigma-Aldrich) foram avaliadas, a fim de definir a melhor concentração de PMA e tempo de diferenciação dos monócitos.

Para os ensaios de avaliação morfológica foram utilizadas 2 X 10<sup>5</sup> células por poço, em placas de 24 poços (Nunc), onde as células foram diferenciadas com diferentes concentrações de PMA (30 nM, 80 nM e 200 nM) e tempos de incubação (24 h e 48 h). Os monócitos e os macrófagos (dTHP-1) foram acompanhados na fase inicial (antes da adição do PMA), após o tempo de incubação com o PMA e com o respectivo tempo de descanso, com meio e sem indutor. As imagens foram visualizadas em microscópio invertido (Nikon).

Para avaliar a viabilidade dos dTHP-1 submetidos a diferentes concentrações de PMA (80 nM – 200 nM) foram utilizadas 3,2 X 10<sup>4</sup> células por poço, em placas de 96 poços (Nunc). Nos tempos de 48 h pós indução e 48 h pós descanso foram adicionados 50 µL de azul de alamar (resazurina - Invitrogen) em todos os poços. Após 4h de incubação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Device) em dois diferentes comprimentos de onda, 570 e 600 nm. Os dados foram plotados e analisados no *software GraphPrism*.

### 3.8 Diferenciação das células THP-1 e infecção por BCG

Para os ensaios de infecção, as células THP-1 foram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão por coloração de 0,4 % azul de Tripán (Sigma) (Anexo I, Tabela 8.14). Posteriormente, foram estimuladas com 200 nM PMA em meio RPMI / 10 % SFB pré-aquecido para a diferenciação em dTHP-1. Após 48 h de estímulo, as células foram lavadas para a retirada do PMA e então adicionado meio RPMI / 10 % SFB pré-aquecido, por 48 h, com troca diária. Os dTHP-1 foram então infectados com *M. bovis* BCG em multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 por um pulso de infecção de 4 h à 37°C em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Ao final do tempo de infecção, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com meio RPMI / SFB 10 %, a fim de retirar as bactérias que não foram internalizadas.

### 3.9 Crescimento intracelular das cepas BCGs em modelo THP-1

Para os ensaios de crescimento intracelular das cepas BCGs foram utilizadas 2 X 10<sup>5</sup> células por poço, em placas de 24 poços (Nunc), onde as células foram diferenciadas como descrito anteriormente.

Os lotes semente de bactérias foram descongelados por 10 min a 37 °C, centrifugados por 10 min a 16.000 x g e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI / 10 % SFB e as bactérias foram mecanicamente dissociadas através de sucessivas passagens em seringa de 27,5 G X ½". Essa suspensão bacteriana foi utilizada para infectar os dTHP-1, como descrito anteriormente.

Ao final do tempo de infecção, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com meio RPMI / SFB 10 %, a fim de retirar as bactérias que não foram internalizadas. O crescimento intracelular das cepas BCG foi avaliada através de uma cinética de tempo, que compreendia os tempos de 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h após a infecção. Nos tempos selecionados, os dTHP-1 infectados foram lisados com 0,05% SDS. As células lisadas, assim como as bactérias, foram recolhidas e centrifugadas por 10 min a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de meio líquido 7H9 / Tween 80 / Glicerol / ADC. A partir dessa suspensão bacteriana foram feitas diluições seriadas. O equivalente a 100 µL de cada diluição foi plaqueado em placas de 7H10 (Difco™)

e glicerol (Sigma) (Anexo I, Tabela 8.3), suplementado com ADC. As colônias foram quantificadas no 28º dia.

### 3.10 Viabilidade dos dTHP-1 frente a infecção com os diferentes BCGs

Para avaliar a viabilidade dos dTHP-1 foram utilizadas  $3,2 \times 10^4$  células por poço, em placas de 96 poços (Nunc). As células foram diferenciadas e infectadas, como descrito anteriormente. Como controle de morte dos dTHP-1 não infectados adicionamos 10 % *Tween* 20. Nos tempos de 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h foram adicionados 50 µL de azul de alamar em todos os poços. Após 4h de de incubação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Device) em dois diferentes comprimentos de onda, 570 e 600 nm. Os dados foram plotados e analisados no *software GraphPrism*.

### 3.11 Imunofluorescência

#### 3.11.1 Plaqueamento das células THP-1 e infecção

Para os ensaios de imunofluorescência foram utilizadas  $2 \times 10^5$  células por poço, em placas de 24 poços (Nunc), onde as células foram diferenciadas sobre lamínulas de vidro previamente tratadas (Anexo I, Tabela 8.12). Os dTHP-1 foram então infectados por *M. bovis* BCG como descrito anteriormente, com as bactérias previamente marcadas com o fluoróforo *LIVE* (SYTO9) do kit *LIVE/DEAD® BacLight* (Molecular Probes - Invitrogen).

Brevemente, o lote semente de bactéria foi descongelado 10 min à 37 °C, centrifugadas por 10 min a 16.000 x g e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspensão em 1 mL de água Mili-Q e as bactérias foram mecanicamente dissociadas através de sucessivas passagens em seringa de 27,5 G X ½". O fluoróforo *LIVE* foi adicionado a suspensão bacteriana na diluição 1:200 por 15 min à temperatura ambiente e protegido de luz. Após a coloração, a solução bacteriana foi novamente centrifugada por 10 min a 16.000 x g e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspensão em meio RPMI / 10 % SFB e as bactérias foram, novamente, mecanicamente dissociadas em seringa de 27,5 G X ½", sendo utilizadas para o procedimento de infecção já descrito. Ao final do tempo de infecção, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com meio RPMI / 10 % SFB.

### 3.11.2 Marcação para vesículas acidificadas pelo fluoróforo LysoTracker Red DND-99®

Após 4 h e 22 h de infecção, as vesículas acidificadas dos dTHP-1 infectados foram coradas com *LysoTracker Red DND-99®* (Molecular Probes - Invitrogen). Brevemente, o estoque de 1 mM do fluoróforo *LysoTracker Red DND-99®* foi diluído em meio RPMI / 10 % SFB para a concentração final de 100 nM, em um volume final de 400 µl / poço. As células com o fluorófororo foram incubadas por 2 h e a placa protegida da luz.

Após completar as 2 h de marcação com o fluoróforo *LysoTracker®*, nos tempos de 6 h e 24 h de infecção, as células foram lavadas com PBS 1 X e fixadas com paraformaldeído 4 % (PFA) (Anexo I, Tabela 8.13) por 20 min a temperatura ambiente e a placa protegida da luz. O PFA foi retirado e as lamínulas lavadas com PBS 1 X. Por fim, os núcleos das células eucarióticas foram corados com 0,5 µg / mL DAPI (4',6'-diamidino-2-fenillindole, Sigma), por 10 min a temperatura ambiente e protegido da luz. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1 X e montadas em lâminas de vidro com 3 µL de DABCO.

Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se do microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci). Foram analisadas no mínimo 250 células de cada condição estudada para observar a porcentagem das células infectadas e 50 bactérias isoladas para observar a porcentagem de bactérias colocalizadas com fagossomas acidificados (Alvez *et al.*, 2004). Esses valores foram plotados e analisados no programa *GraphPrism*.

### 3.11.3 Marcação para os filamentos de actina por Rodamina-faloidina

Nos tempos de 6 h e 24 h de infecção, as células foram lavadas com PBS 1 X e fixadas com 4 % paraformaldeído (PFA) por 20 min a temperatura ambiente e a placa protegida da luz. O PFA foi retirado e as lamínulas lavadas com PBS 1 X. As células foram permeabilizadas com 0,1 % Triton X-100 (Sigma) / PBS por 30 min a temperatura ambiente e a placa protegida da luz. As células foram bloqueadas com 2 % BSA / PBS e incubadas com 333 nM Rodamina-faloidina (Invitrogen) por 20 min a temperatura ambiente e a placa protegida da luz.

Por fim, os núcleos das células eucarióticas foram corados com DAPI (4',6'-diamidino-2-fenillindole, Sigma) na concentração final de 0,5 µg / mL, por 10 min a

temperatura ambiente e protegido da luz. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1 X e montadas em lâminas de vidro com 3  $\mu$ L de DABCO.

Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se do microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci).

#### **3.11.4. Marcação para corpúsculos lipídicos por Oil Red O (ORO)**

No tempo de 24 h de infecção, as células foram lavadas com PBS 1 X e fixadas com 3,7 % formalina por 10 min a temperatura ambiente. A formalina foi retirada e as lamínulas lavadas com água destilada. Após as lavagens, incubou-se as lamínulas com 100 % propileno glicol durante 5 min, seguidos pela solução 0,5 % *Oil Red O* por 10 min. As células foram rinsadas com 85 % propileno glicol por 5 min e lavadas com água destilada (Koopman *et al.*, 2001).

Por fim, os núcleos das células eucarióticas foram corados com DAPI (4',6'-diamidino-2-fenillindole, Sigma) na concentração final de 0,5  $\mu$ g / mL, por 10 min a temperatura ambiente e protegido da luz. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1 X e montadas em lâminas de vidro com 3  $\mu$ L de DABCO.

Foram capturadas imagens de campos aleatórios totalizando o mínimo de 250 células utilizando-se do microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci).

### **3.12 Dosagem de citocinas e nitrito**

#### **3.12.1 Plaqueamento das células THP-1 e infecção**

Para os ensaios de dosagem de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1 e TNF- $\alpha$ ) foram utilizadas  $3,2 \times 10^4$  células por poço, em placas de 96 poços (Nunc). As células foram diferenciadas e infectadas, como descrito anteriormente. Os sobrenadantes dos tempos de 6 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h foram recolhidos e estocados a -70 °C.

#### **3.12.2 Dosagem de citocinas pelo método de ELISA de captura**

Através da técnica de ELISA determinamos as concentrações de IL-1 $\beta$  (DY201 – R&D Systems), MCP-1 (DY279 – R&D Systems), IL-6 (DY206 – R&D Systems) e TNF- $\alpha$  (DY210 – R&D Systems), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, a microplaca de 96 poços de fundo chato (Nunc) foi incubada com anticorpo de captura específico para cada citocina por 18 h a temperatura ambiente.

A solução com o anticorpo de captura foi retirada, a placa lavada 3 X com tampão de lavagem (0.05 % *Tween*® 20 em PBS) e os sítios inespecíficos bloqueados com 1 % albumina sérica bovina (BSA) em PBS por 1 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a placa foi lavada 3 X com tampão de lavagem e incubada com as respectivas amostras analisadas e a curva padrão por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada 3 X com tampão de lavagem e incubada com o anticorpo de detecção por 2 h a temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada 3 X e incubada com solução de estreptavidina peroxidase por 20 min a temperatura ambiente, protegendo da luz. A placa foi lavada 3 X e incubada com o substrato para a estreptavidina por 20 min a temperatura ambiente, protegendo da luz. A reação foi bloqueada pela adição de ácido sulfúrico 2 N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). As medidas de absorbância foram obtidas em um leitor de microplacas da *Molecular Devices* com filtro 450 nm. As amostras foram analisadas em quatro replicatas biológicas e a concentração de cada citocina calculada através do programa *SoftMax*. Os dados foram plotados e analisados no programa *GraphPrism*.

### 3.12.3 Dosagem de citocinas pelo método CBA

Através do Kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Flex Set* determinamos as concentrações de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α. Brevemente, os sobrenadantes obtidos na etapa 3.12.1 e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1 mL de solução de lavagem e centrifugado por 10 min a 1100 x g. O sobrenadante foi desprezado e as amostras foram ressuspensas em 300 µL da solução de lavagem. A aquisição das amostras foi feita em citômetro de fluxo *BD FACS Calibur* (BD Bioscience). Foi realizada uma aquisição de 1000 eventos. Os resultados foram gerados utilizando o *BD CBA Analysis Software* e analisados no software *GraphPrism*.

### 3.12.4 Dosagem nitrito pelo método de Griess

A concentração de óxido nítrico foi realizada indiretamente através da dosagem de nitrito e foi dosada nos mesmos sobrenadantes pela reação de Griess. Para a reação colorimétrica foi adicionado 100 µL/poço de solução de Griess às amostras

(100 µL/ poço) ou à curva padrão (100 µL/ poço). A curva padrão apresenta a solução de nitrito (100 µM) como primeiro ponto.

A solução de Griess é preparada pela adição de compostos na relação 1:1, a 1 % sulfanilamida diluída em 5% ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,1% α-Naftiletilenodiamina diluída em água. A absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Device). Os dados foram analisados no *software GraphPrism* e expresso em µM.

### **3.13 Purificação de ácidos nucleicos**

#### **3.13.1 Obtenção da amostra bacteriana**

Para obter a amostra de ácidos nucleicos bacteriano foram utilizadas  $1,5 \times 10^7$  células em garrafa de 150 cm<sup>2</sup> (Nunc). As células foram diferenciadas e infectadas, como descrito anteriormente. Após 24 h de infecção os dTHP-1 foram lisados com 0,05 % SDS. As células lisadas, assim como as bactérias, foram recolhidas e centrifugadas por 10 min a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspensão em 1 mL de trizol (Invitrogen). As amostras foram armazenadas em -70 °C.

#### **3.13.2 Obtenção da amostra de dTHP-1**

Para obter a amostra de ácidos nucleicos das células THP-1 foram utilizadas  $1,0 \times 10^6$  células em placas de 6 poços (Nunc). As células foram diferenciadas e infectadas, como descrito anteriormente. Após 24 h de infecção os dTHP-1 foram lisados e ressuspensos em 1 mL de trizol (Invitrogen). As amostras foram armazenadas em -70 °C.

#### **3.13.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR**

As células bacterianas foram rompidas por lise mecânica na presença de pérolas de zircônio em equipamento Bead Beater (Biospec Products INC.). Após clarificação, a fração solúvel da lise bacteriana e a amostra de d-THP-1 foram submetidas à extração com clorofórmio e precipitação com etanol, e o RNA foi ressuspensão em 50µl de água DEPC. A contaminação com DNA foi removida através da digestão com RNase-free Turbo-DNase (Ambion-Life) de acordo com as especificações do fabricante. A ausência de contaminação com DNA foi confirmada

através de PCR diretamente sobre o RNA, em amostras não submetidas à reação com transcriptase reversa. A concentração do RNA extraído, após tratamento com DNase, foi determinada pelo kit Qubit (Ambion-Life) e a pureza avaliada pela relação de OD260/280nm.

A análise da integridade do RNA foi verificada através da eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,2 % em tampão MOPS 1X (Sigma) (Anexo I, Tabela 8.15). O RNA foi previamente desnaturado com 35 % formamida, MOPS 1X, corado com 0,125 % azul de bromofenol e 1 µL de *SYBR Green II 100X* (Applied Biosystems). E, em seguida, aplicado no gel. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V por 40 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi analisado por um sistema de fotodocumentação (I-Pix Touch, Loccus Biotecnologia, Brasil).

As reações de transcrição reversa foram feitas utilizando 1000 ng de RNA total, iniciadores randômicos (0,5 µg/reação, Invitrogen) e o sistema de SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen) para RT-PCR seguindo as especificações do fabricante.

### **3.14 Obtenção do extrato proteico**

Para obter a amostra proteica de células THP-1 infectadas e dos bacilos intracelulares foram utilizadas  $1,0 \times 10^6$  células em placas de 6 poços (Nunc). As células foram diferenciadas e infectadas, como descrito anteriormente. Após 24 h de infecção os poços foram lavados com PBS, para retirar o acúmulo de BSA. Os dTHP-1 foram lisados com água Milli-Q e centrifugados a 16.000 x g por 10 min. Ao final da centrifugação o sobrenadante, contendo as proteínas intracelulares dos macrófagos, foi recuperado e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em tampão de lise micobacteriana (Anexo I, Tabela 8.16).

As bactérias foram rompidas por lise mecânica na presença de pérolas de zircônio em equipamento Bead Beater (Biospec Products INC.). A metodologia utilizada para a precipitação de proteínas dos macrófagos e bactérias foi adaptada a partir da descrita por Wessel e colaboradores (1984). As proteínas foram precipitadas pela adição de TCA na concentração final de 17 % seguida de incubação a -20 °C por 10 minutos e o material centrifugado por 10 minutos a 16.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado sequencialmente com 300 µL de acetona gelada contendo 1 % trietanolamina (TEA) duas vezes com 300 µL de acetona 100 P.A gelada. O sedimento final das células THP-1 foi ressuspenso em

50 µL de tampão de focalização isoeétrica (tampão IEF- Anexo I, Tabela 8.17) e das células bacterianas em 40 µL tampão e lise micobacteriana contendo 1 % SDS e 50 mM DTT.

### **3.14.1 Quantificação de proteínas e análise da integridade da amostra**

A quantificação das proteínas extraídas foi realizada com 1 µL da amostra no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Para avaliar a integridade e a quantificação das amostras que seriam analisadas pelo *Orbitrap*, foram utilizadas 5 µg de proteínas misturadas a tampão de amostra de proteína 1 X (Anexo I, Tabela 8.18) para um volume final de 20 µL. A mistura foi aquecida 100 °C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em géis 15 % SDS-PAGE (Anexo I, Tabela 8.19) de 7 centímetros em tampão de corrida Laemmli (Anexo I, Tabela 8.20) (Laemmli, 1970) a 200 volts, empregando o sistema MiniProtean (BioRad). O gel foi corado por prata (Anexo I, Tabela 8.21) e a imagem capturada em densitometro GS-800 (BioRad).

### **3.14.2 FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*)**

As amostras bacterianas selecionadas para a análise proteômica foram preparadas seguindo a metodologia *FASP* adaptada, para a tripsnização das proteínas. Os tubos utilizados nessa etapa foram previamente tratados com lavagens sequenciais de metanol-agua-metanol. Como controle da realização dessa etapa foi utilizado o BSA na concentração de 1mg/mL.

As amostras obtidas no item 3.14 foram descongeladas em gelo e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min à 6 °C. Após a centrifugação, foi coletada 30 µL da amostra clarificada e transferida para um tubo, que foi colocado em um banho à 100 °C por 5 min, seguido de incubação à 25 °C por 15 min.

A amostra foi centrifugada a 16.000 g por 10 min e transferida para a unidade filtrante, onde foi adicionando 200 µL da solução UA (Anexo I, Tabela 8.22) e homogeneizado gentilmente com a pipeta. Centrifugou-se a unidade por 10.000 x g por 15 min, até obtermos um volume aproximadamente de 10 µL. Essa etapa foi repetida mais uma vez.

Foi adicionado 100 µL de solução contendo iodoacetamida (Anexo I, Tabela 8.23), incubou-se sob agitação em *termo mix* por 15 min, 600 rpm a temperatura

ambiente e protegido da luz. Após a incubação a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min.

Foi adicionado 100 µL de solução UA (Anexo I, Tabela 8.24) a unidade filtrante e centrifugou-se a 10.000 x g por 10 min. Esse passo foi repetido por mais duas vezes.

Após esse processo, adicionou-se 100 µL de solução DB ao filtro e centrifugou-se a 10.000 x g por 5 min. Essa etapa foi repetida mais duas vezes.

A unidade filtrante foi adicionado 40 µL de solução de tripsina, na proporção de 1 µg de tripsina para cada 100 µg de proteínas totais e incubada inicialmente por 1 min a 600 rpm. Depois, incubou-se as unidades filtrantes no *termo mix* a 37 °C por 18 horas, sob agitação.

Após a incubação com a tripsina, as unidades filtrantes são acopladas a novos tubos coletores previamente tratados e centrifugados a 10.000 x g até que toda solução passasse pelo filtro. Por fim, adicionou-se 100 µL de solução DB aos filtros, centrifugou-se a 10.000 x g por 15 min, repetindo esse passo uma vez.

A amostra foi concentrada em *SpeedVac* até que alcançasse o volume aproximado de 54 µL. A amostra concentrada adicionou-se 6 µL de 10 % TFA e água para volume final de 60 µL.

A dessalinização da amostra foi realizada em resina R2. Inicialmente lavou-se a coluna contendo a resina com 20 µL de 100 % acetonitrila. Em seguida, a resina foi equilibrada com 4 vezes de 20 µL de 1 % TFA. Por fim, a amostra foi passada em 3 passos, cada um de 20 µL cada. A coluna foi lavada 4 vezes com 20 µL de 0,1 % TFA e a amostra foi eluída no tubo *autosampler* com 4 lavagens de 20 µL de 0,1 % TFA em 70 % acetonitrila. A amostra foi totalmente seca em *SpeedVac*.

Os peptídeos foram ressuspensos em 20 µL de 1 % ácido fórmico, homogeneizado em vortex e incubados em banho sonificador por 10 min. A amostra contendo os peptídeos foram dosadas no NanoDrop.

### **3.15. Western Blot**

Proteínas resolvidas em géis SDS-PAGE 15 % foram eletro-transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham Pharmacia) em equipamento Mini Transblot (BioRad), a 100 V durante uma hora, segundo especificações do fabricante. Após a transferência, a membrana foi corada com o corante reversível MemCode (Pierce) para visualização e verificação da qualidade da transferência, a

imagem capturada em densitômetro GS800, novamente descorada e em seguida bloqueada em leite 10 % / TBS (Anexo I, Tabela 8.25) por uma noite a 4 °C.

Após o bloqueio a membrana foi lavada com TBS 1X (3 vezes por 5 min) e, em seguida, incubada durante 2 horas, com agitação suave, com o anticorpo primário (Anexo I, Tabela 8.26) em leite 5 % / TBS.

A membrana foi então lavada sequencialmente com TBS contendo 0,05 % *Tween* 20 (3 vezes por 5 min) e TBS (3 vezes por 5 min) e então incubada por 1 h na presença do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado à peroxidase (Pierce) (diluição especificada em Resultados) em 5 % leite desnatado / TBS e novamente lavada como descrito acima.

Para revelar as membranas utilizamos o Kit Super Signal® (Pierce) conforme as instruções do fabricante.

### **3.16 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados estatisticamente através do teste de análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni ou através do teste-t não pareado.

## 4. Resultados

### 4.1 – Caracterização fenotípica, genética e da viabilidade dos lotes-semente das cepas de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, Pasteur e Tokyo

Para os experimentos de infecção no modelo de células THP-1, as cepas de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, Pasteur e Tokyo foram cultivadas em meio 7H9 enriquecido com ADC, sob agitação a 37 °C. A partir da fase logarítmica de crescimento ( $OD_{600nm} \approx 0,8 - 1,2$ ) das bactérias foram feitos os lotes-semente. Os lotes foram quantificados através da contagem de colônias (CFU) em placas de meio sólido 7H10 enriquecidas com ADC; tiveram sua viabilidade avaliada, por microscopia de fluorescência utilizando o *kit LIVE/DEAD™ BacLight™* e seu perfil molecular identificado com iniciadores específicos para as cepas estudadas (Figura 4.1).

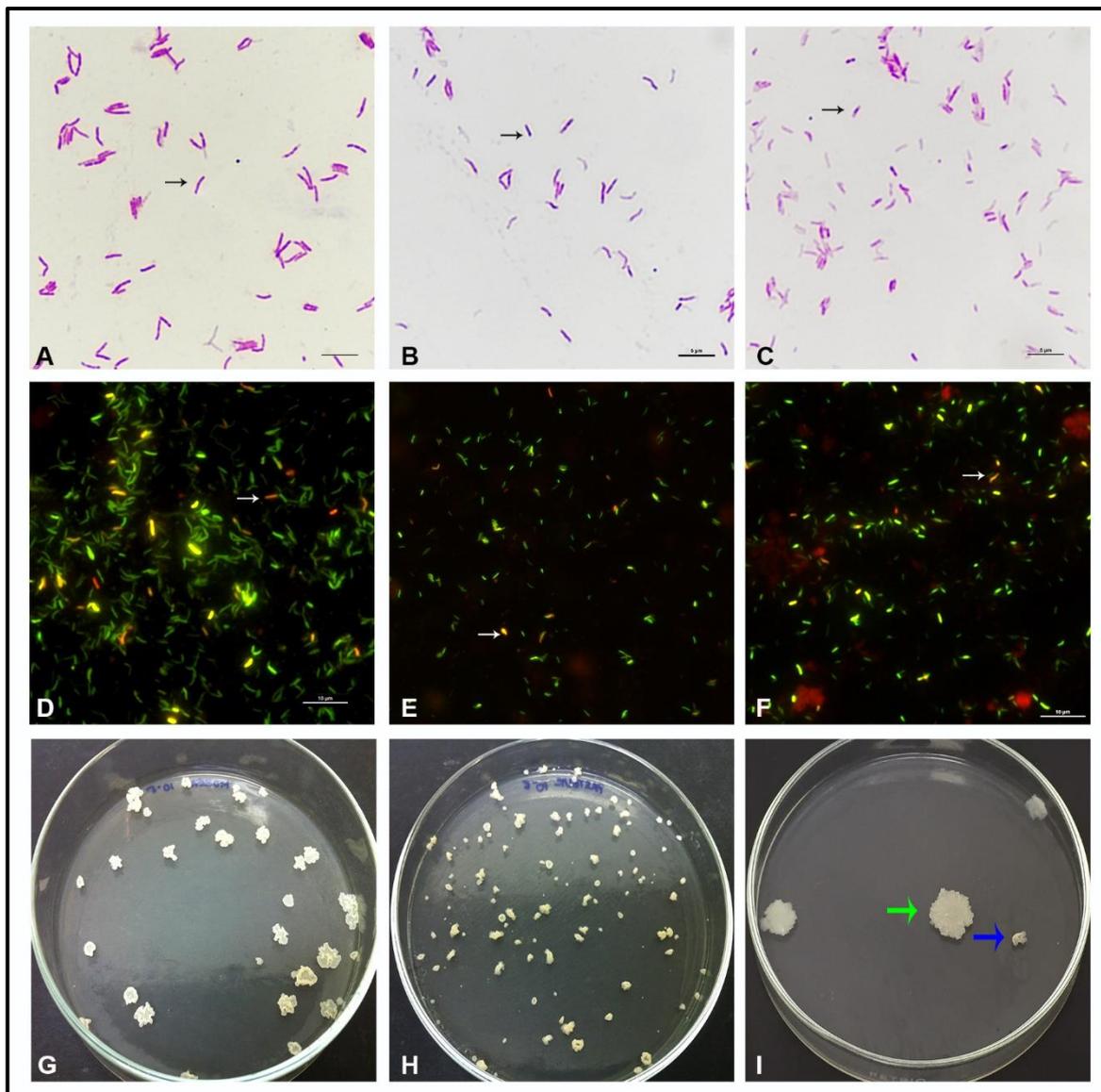
Na figura 1 observamos os bacilos corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (A-C), pelos fluoróforos *Live/DEAD* (D-F) e a morfologia das colônias em placas de 7H10 (G-I).

Através da técnica de coloração Ziehl-Neelsen (A-C) podemos observar que os bacilos estão dispersos e não há contaminação com outras bactérias. Essa avaliação é possível devido à propriedade ácido-álcool resistente das micobactérias.

Os fluoróforos *Live/Dead* (D-F) foram utilizados para observarmos a proporção de bactérias viáveis e mortas nos lotes semente. O fluoróforo verde *Live* é o intercalante de DNA SYTO9 e o fluoróforo vermelho *Dead* é o intercalante de DNA iodeto de propídio. As setas em branco indicam bacilos que estão marcados com o fluoróforo *Dead*, indicando bactérias mortas. A média da taxa de viabilidade obtida a partir da microscopia de fluorescência para a cepa BCG Moreau foi de 92%, BCG Pasteur 89% e BCG Tokyo 90%.

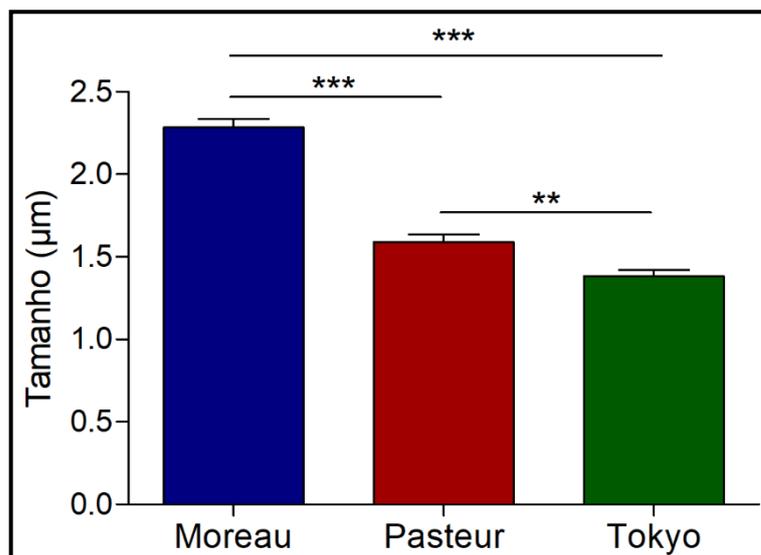
As placas de meio sólido 7H10 (G-I) revelam que as cepas BCG Moreau e BCG Pasteur possuem uma única morfologia de colônia, enquanto a cepa BCG Tokyo apresenta duas formas de morfologia de colônia, como já descrito na literatura (Bedwell *et al.*, 2001). As cepas BCG Moreau, BCG Pasteur e BCG Tokyo apresentam colônias rugosas com pouco espraio e projeções que crescem no sentido vertical. Além de colônias com características descritas anteriormente, a cepa BCG Tokyo apresenta também colônias lisas com espraio. A seta em

verde indica colônia lisa e em azul rugosa, ambas morfologias encontradas na cepa BCG Tokyo.



**Figura 4.1. Caracterização morfológica das cepas *Mycobacterium bovis* BCG Moreau (A, D e G), Pasteur (B, E e H) e Tokyo (C, F e I).** As culturas de BCG Moreau, Pasteur e Tokyo foram crescidas em meio líquido 7H9 enriquecido com ADC e estocadas em fase logarítmica de crescimento. (A-C) Bacilos corados pela técnica de coloração Ziehl-Neelsen. As setas em preto indicam bacilos isolados de cada cepa estudada. A barra de escala indica 5µm. (D-F) Bacilos marcados com fluoróforos *Live/Dead*. A marcação em verde indica bactérias viáveis e a marcação em vermelho bactérias mortas. As setas em branco destacam as bactérias mortas. A barra de escala indica 10µm. (G-I) Morfologia de colônia em placas de meio sólido 7H10 enriquecido com ADC. A seta em verde indica colônia lisa e em azul rugosa.

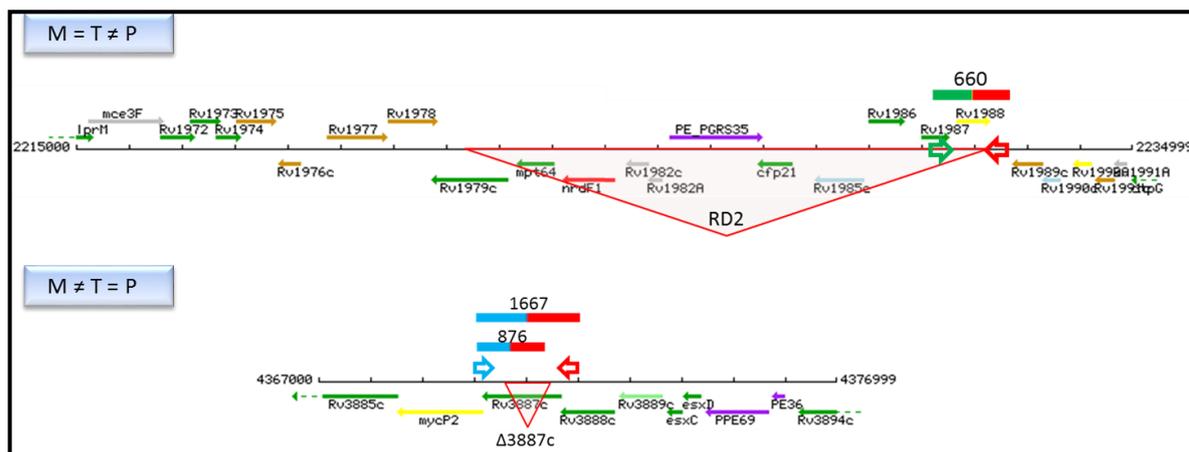
A partir da técnica de coloração Ziehl-Neelsen foi possível medir 50 bactérias isoladas, de cada cepa, utilizando o programa *NSElements* (NIKON). Esses valores foram plotados e analisados utilizando o programa *GraphPrism* (Gráfico 4.1).



**Gráfico 4.1. Comprimento dos bacilos das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo.** Foram avaliadas bactérias isoladas coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e as medidas adquiridas através do programa *NSElements*. As medidas foram analisadas através do programa *GraphPrism* e os dados foram apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ . N=50

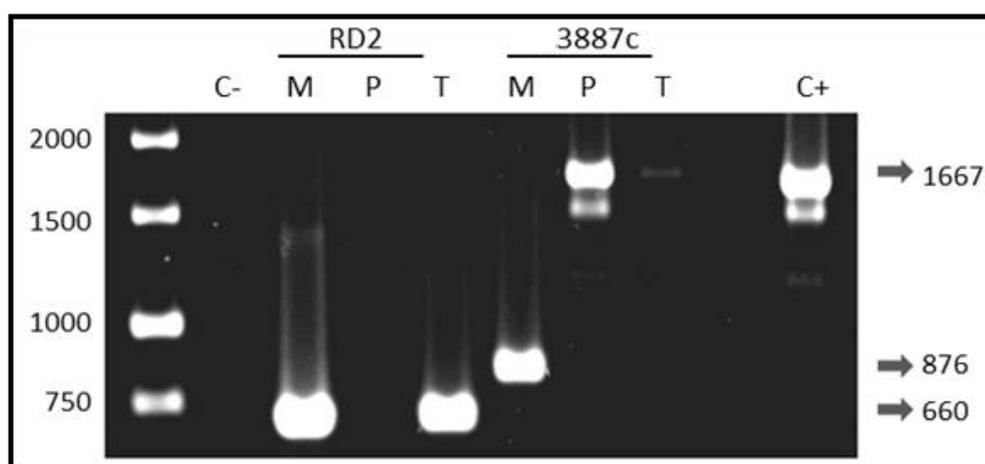
A medição indicou que os bacilos da cepa Moreau apresentam em média  $2,28 \pm 0,05 \mu\text{m}$  de comprimento, da cepa Pasteur  $1,59 \pm 0,05 \mu\text{m}$  e da cepa Tokyo  $1,38 \pm 0,04 \mu\text{m}$ . Com isso, foi possível constatar que os bacilos da cepa BCG Moreau são 1,43X e 1,65X maiores do que os bacilos de BCG Pasteur e Tokyo, respectivamente, ambos com  $p$  valor  $< 0,001$ . Os bacilos de BCG Pasteur são 1,15X maiores do que os bacilos de BCG Tokyo, com  $p$  valor  $< 0,01$ .

A identidade genética de cada cepa foi confirmada através de PCR, com iniciadores para regiões específicas. A figura 4.2 mostra o esquema das regiões analisadas, a região RD2 e o gene *rv3887c*. A região RD2 está presente nas cepas de BCG mais antigas, obtidas antes de 1927, como BCG Moreau e Tokyo, mas está ausente em cepas mais recentes, como Pasteur. Para diferenciar a cepa BCG Moreau das cepas Pasteur e Tokyo foi utilizado o gene *rv3887c*. Esse gene íntegro possui 1667 pb, como foi observado nas cepas BCG Pasteur e BCG Tokyo, mas a cepa BCG Moreau possui uma deleção nesse gene, gerando um fragmento de 876 pb.



**Figura 4.2. Esquema representativo para identificação molecular das cepas estudadas.** No esquema superior temos em destaque a região genômica RD2 e no inferior a região contendo o gene *rv3887c*. Os iniciadores do sentido senso estão marcados de verde e azul e os iniciadores anti-senso estão marcados de vermelho. O fragmento gerado na reação da região RD2 é de 660pb; da reação do gene *rv3887c* é de 1667pb para o gene íntegro e de 876pb para o gene com deleção.

Na figura 4.3 podemos observar os produtos da reação de PCR em gel de agarose 0,8% e revelados por brometo de etídio. Foi constatada a amplificação do fragmento de 660pb da região RD2 nas cepas BCG Moreau e BCG Tokyo, mas não foi detectado esse fragmento na cepa BCG Pasteur. Para o gene *rv3887c*, observamos uma amplificação do fragmento de 876pb na cepa BCG Moreau e de 1667pb nas cepas BCG Pasteur e Tokyo, confirmando a deleção nesse gene na cepa BCG Moreau.



**Figura 4.3. Identidade molecular das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo.** Na esquerda temos o marcador de 100pb, seguido do controle negativo. A região RD2 e o gene *rv3887c* foram usados para diferenciar as cepas BCG Moreau (M), Pasteur (P) e Tokyo (T). As setas em cinza indicam o valor esperado em pb.

## **4.2 – Padronização das condições de diferenciação dos monócitos humanos THP-1 em macrófagos**

Após a caracterização e confirmação molecular dos lotes-semente das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo fez-se necessário a padronização das condições de cultivo e diferenciação dos monócitos THP-1 para macrófagos (dTHP-1). O protocolo de diferenciação de monócitos para macrófagos THP-1 não está padronizado na literatura. A concentração do indutor de diferenciação (PMA) varia, bem como o tempo de indução. O levantamento bibliográfico com artigos entre os anos de 2009 - 2014 revelou que a concentração de PMA pode variar de 8nM a 400nM, o tempo de indução de 30 minutos a 96 horas e com tempo de descanso ou não, após a diferenciação.

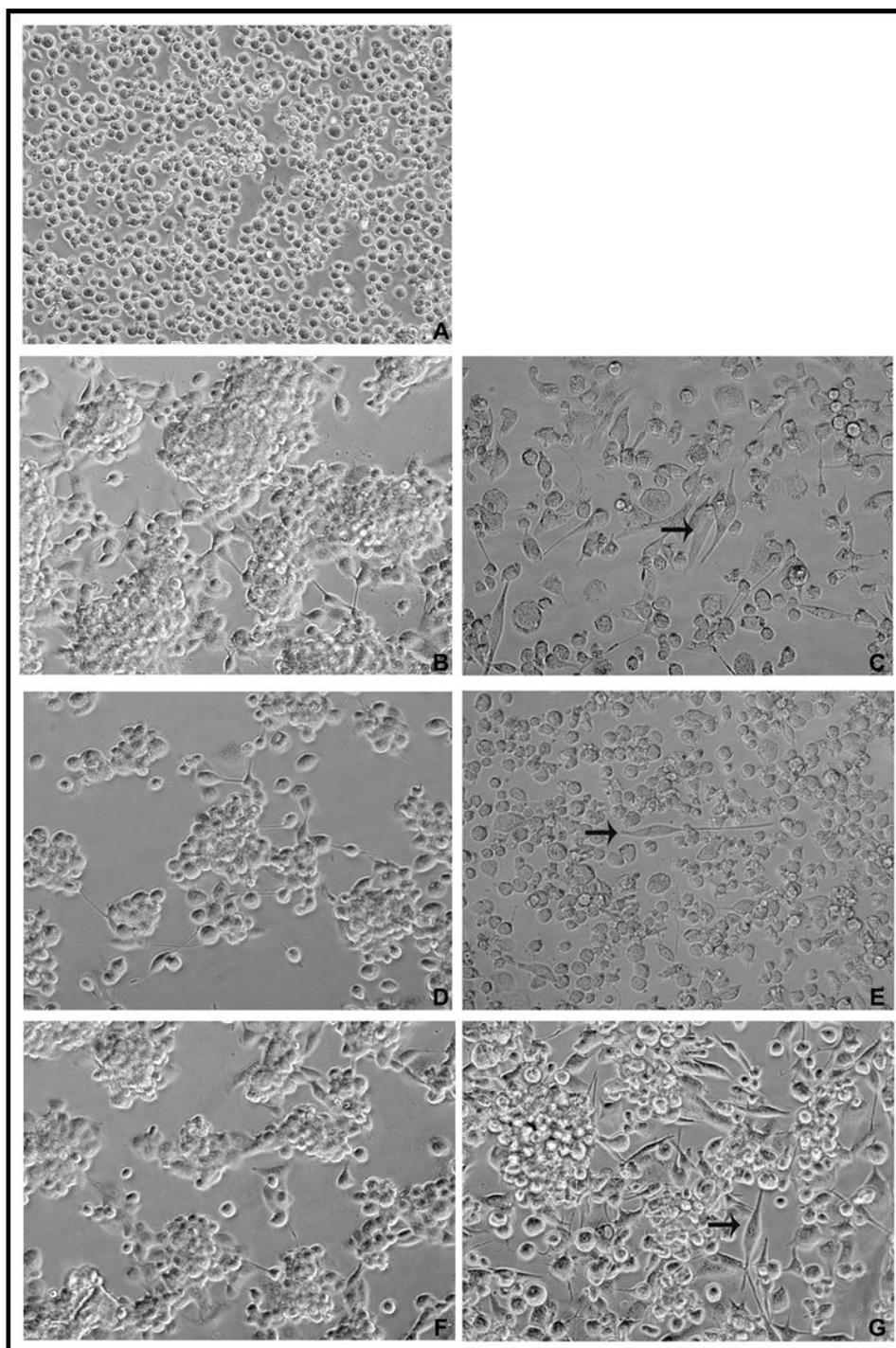
### **4.2.1 – Concentração de PMA e tempo de indução, com posterior tempo de repouso são importantes para o quantitativo final de células com morfologia compatíveis com macrófagos**

Selecionamos três protocolos já descritos na literatura. De Pinho e colaboradores, utilizam a concentração de 30 nM PMA por 48 horas com 48 horas adicionais de descanso sem a droga (de Pinho *et al.*, 2014); Guerreiro e colaboradores propõe a concentração de 80 nM por 24 horas sem descanso (Guerreiro *et al.*, 2013) e por fim, uma adaptação do protocolo de Daigneault e colaboradores, em que utilizamos 200 nM de PMA por 48 horas com 48 horas adicionais de descanso sem a droga (Daigneault *et al.*, 2010),

Na figura 4.4 podemos observar a morfologia das células THP-1 nos diferentes protocolos testados. As imagens (B), (D) e (F) são respectivamente das concentrações de 30 nM, 80 nM e 200 nM depois do tempo de exposição ao PMA. Nessa fase, as células parecem ainda bem arredondadas e grumadas, com poucas projeções características de células diferenciadas em macrófagos. A figura 4D seria representativa do final do protocolo de 80 nM antes da infecção, uma vez que nesse artigo não era descrito o descanso adicional para completar a diferenciação.

A partir do tempo de descanso, podemos observar nas imagens (C), (E) e (G) células com morfologia compatíveis a de macrófagos, sugerindo a diferenciação. Ao final do protocolo de 30 nM podemos observar uma quantidade maior de células com morfologia compatível de macrófago do que com o protocolo com 80 nM com ou sem o descanso posterior ao indutor. A diferenciação com o protocolo de 200 nM

foi satisfatória quando avaliamos a proporção de células com morfologia de macrófago. A quantidade de células ao final do processo de diferenciação e repouso no protocolo de 200nM foi maior do que com o protocolo de 30 nM PMA.

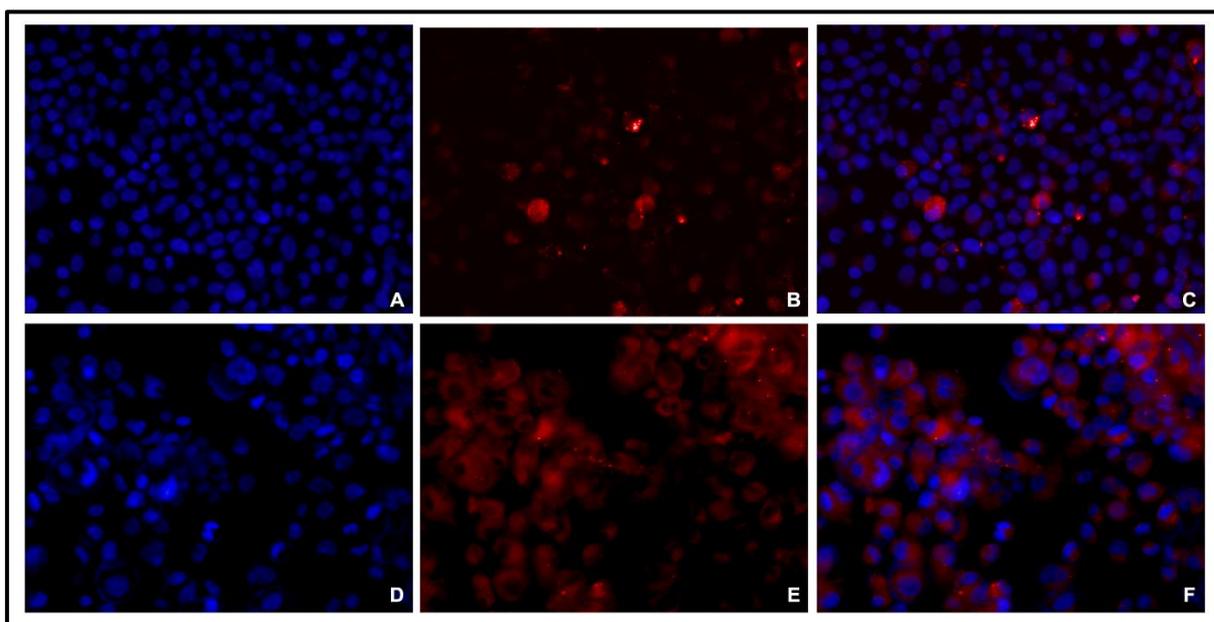


**Figura 4.4. Padronização do protocolo de diferenciação de monócitos THP-1 a macrófagos.** (A) Monócitos THP-1. Células THP-1 após 48 horas de indução com 30 nM PMA (B) e 48 horas de descanso (C). Células THP-1 após 24 horas de indução com 80 nM de PMA (D) e 24 horas de descanso (E). Células THP-1 após 48 horas de indução com 200 nM de PMA (F) e 48 horas de descanso (G). As setas em preto destacam morfologia compatível a de macrófagos. Imagens representativas obtidas com microscópio Nikon Eclipse Ci, aumento 20 X. N=5

A partir da observação dos protocolos testados foi possível inferir que o tempo de exposição ao PMA, assim como a concentração e o tempo de descanso são importantes para a diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos. A concentração de 30 nM PMA foi descartada para a realização dos experimentos posteriores, visto que mesmo após 72 horas leva a um nível de diferenciação intermediário, podendo levar tanto à formação de células dendríticas quanto macrófagos (Spano *et al.*, 2013).

#### 4.2.2 – Monócitos THP-1 diferenciados com 200 nM PMA exibem aumento na quantidade de vesículas acidificadas

Seguimos então com os protocolos que utilizavam 80 nM e 200 nM de PMA. O próximo passo foi avaliar a quantidade de vesículas acidificadas através da marcação do fluoróforo *LysoTracker* (Figura 4.5), visto que em macrófagos diferenciados a quantidade de mitocôndrias e lisossomos é aumentada (Cohn & Benson, 1965; Daigneault *et al.*, 2010).



**Figura 4.5. Perfil representativo de vesículas acidificadas em macrófagos THP-1 submetidos a diferentes protocolos de indução com PMA.** Células THP-1 submetidas ao protocolo de 80 nM (A, B e C) e de 200 nM (D, E e F). A marcação em azul é referente ao fluoróforo DAPI, intercalante de DNA (A e D) e em vermelho referente ao fluoróforo *LysoTracker*, indicador de vesículas acidificadas (B e E). Imagens representativas e virtualmente justapostas (C e F). N=3

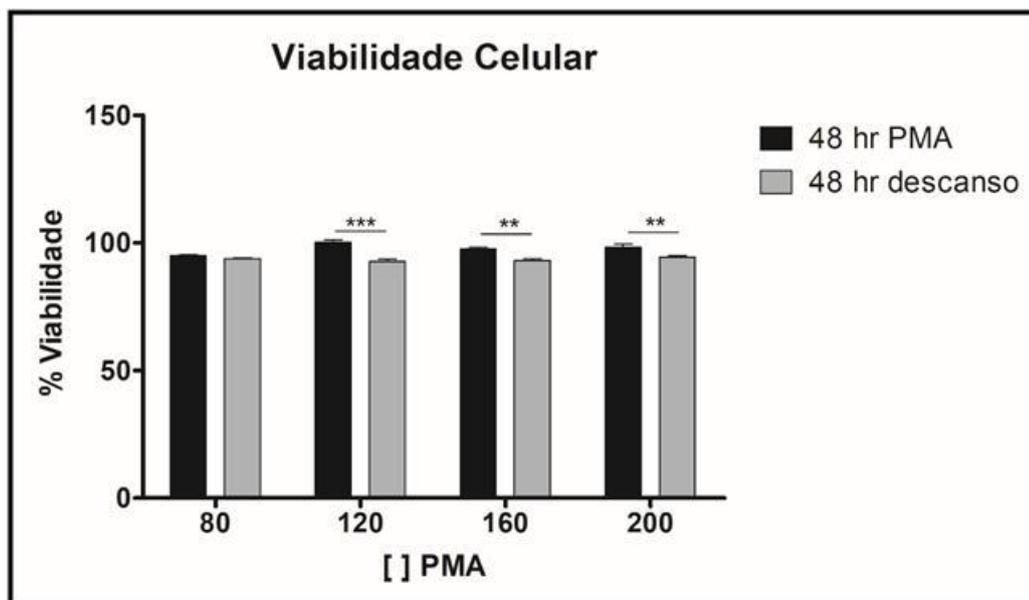
Foi possível observar que os macrófagos obtidos a partir do protocolo de 200 nM PMA possuíam mais marcação para vesículas acidificadas dos que os obtidos a partir do protocolo de 80 nM PMA. Esses dados juntamente com os obtidos na figura

4.4 reforçaram a importância do tempo de indução e de descanso, levando-nos a adaptar o protocolo de 80 nM PMA para 48 horas de indução e posterior 48 horas de descanso.

#### **4.2.3 – Concentrações variando de 80 a 200 nM de PMA não apresentam diferença na viabilidade dos macrófagos THP-1**

Células em estágio avançado de diferenciação, derivadas da indução com PMA na concentração igual ou superior a de 60 nM e recuperadas em meio com soro, apresentam baixa capacidade de restauração proliferativa e altos níveis de apoptose (Spano *et al.*, 2013). Essa informação nos levou a analisar a viabilidade das células THP-1 através do ensaio com resazurina em diferentes concentrações de PMA, que variaram de 80 nM a 200 nM (Gráfico 4.2). A resazurina é um composto de coloração azul que quando reduzido pelas células metabolicamente ativas, passa para resorufina, um corante rosa (Bueno *et al.*, 2002).

Nas concentrações acima de 80 nM de PMA foi possível observar uma diminuição da viabilidade das células ao final do tempo de 48 horas de descanso quando comparamos com o tempo de 48 horas de indução, nas respectivas concentrações estudadas. A avaliação de concentrações variando de 80 a 200 nM PMA durante 48 horas, com posterior 48 horas de descanso mostrou não haver diferença na viabilidade das células THP-1, ao final do protocolo. A viabilidade das células diferenciadas com PMA nas concentrações testadas foi superior a 90% ( $\approx$  93%), indicando que não há correlação entre a viabilidade dos macrófagos ao final do protocolo com a concentração inicial de PMA utilizada (80 – 200 nM).



**Gráfico 4.2. Viabilidade das células THP-1 em diferentes concentrações de PMA.** Células THP-1 submetidas a concentração de 80 nM, 120 nM, 160 nM e 200 nM de PMA. As barras pretas representam o percentual de viabilidade dos macrófagos THP-1 após 48 horas de indução com PMA. As barras cinzas representam o percentual de viabilidade dos macrófagos THP-1 após o tempo de descanso de 48 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . N=5

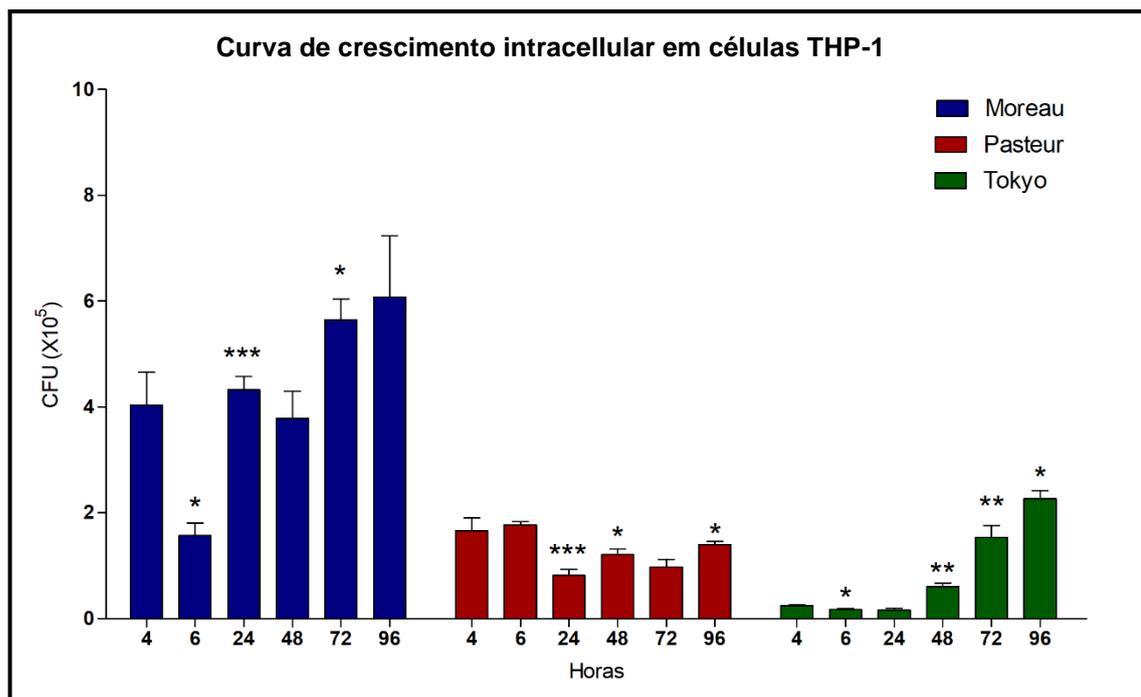
Diante dos dados obtidos ao longo dos experimentos de padronização da concentração de PMA, do tempo de indução e de descanso, optamos por prosseguir os experimentos com o protocolo de 200nM PMA por 48 horas, com posterior 48 horas de descanso.

Após a padronização dos protocolos de cultivo bacteriano e diferenciação das células THP-1 foi possível realizar os experimentos de infecção. Os monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM PMA por 48 horas com posterior 48 horas de descanso. A multiplicidade de infecção (MOI) adotada foi de 10:1 (bactéria:macrófago), e o tempo de infecção convencional de 4 horas, tempo este já utilizado na literatura para avaliar mudanças relacionadas ao perfil transcricional de micobactérias frente ao ambiente intracelular de macrófagos (Rienksma *et al.*, 2015).

### 4.3 – *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e BCG Tokyo apresentam aumento na sobrevivência intracelular em macrófagos THP-1 diferenciados por PMA

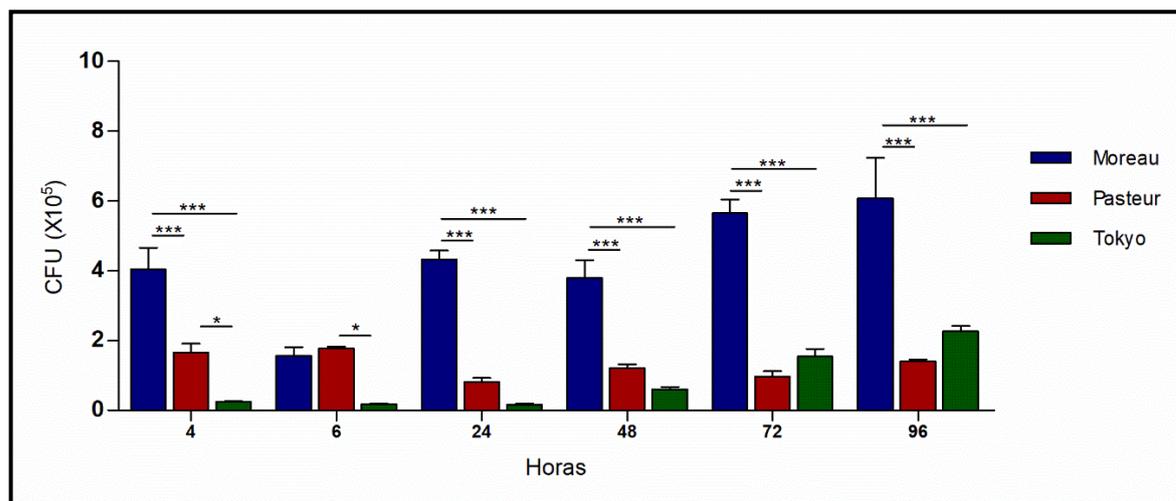
O crescimento das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) em placas de meio sólido

7H10 enriquecido com ADC, nos tempos de 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após infecção (Gráfico 4.3). O perfil de crescimento bacteriano foi similar para as cepas BCG Moreau e Tokyo, que apresentaram uma queda no crescimento no ponto de 6 h, mas com tendência ao aumento nos tempos subsequentes. Enquanto que a cepa BCG Pasteur apresentou uma queda no crescimento apenas no ponto de 24 horas e uma tendência à manutenção nos tempos posteriores. A significância da diferença no quantitativo bacteriano foi avaliada relativa ao tempo anterior.



**Gráfico 4.3. Cinética de crescimento das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo após infecção de células THP-1.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. As unidades formadoras de colônia (CFU) obtidas nos tempos de infecção de 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas em placas de meio 7H10 foram quantificadas 28 dias após o plaqueamento. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste t não pareado referente ao tempo anterior \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . N=4

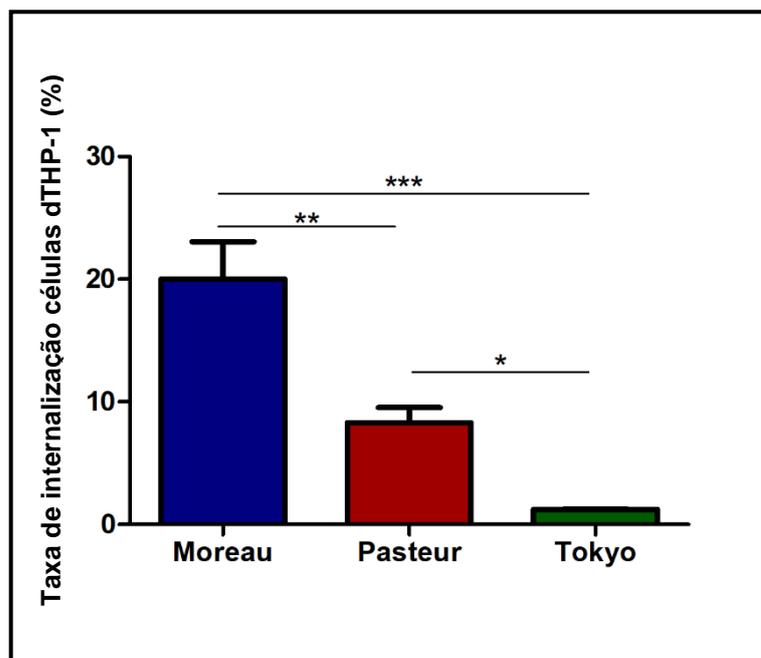
Além de analisarmos a cinética temporal de cada cepa, comparamos o crescimento bacteriano dessas cepas nos respectivos tempos observados (Gráfico 4.4). Foi possível detectar que a cepa BCG Moreau apresenta uma maior quantidade de bactérias em relação às cepas BCG Pasteur e Tokyo em todos os tempos observados, com exceção do tempo de 6 horas. E que a cepa BCG Pasteur possui quantidade bacteriana diferente da cepa BCG Tokyo apenas nos tempos de 4 e 6 horas.



**Gráfico 4.4. Comparação do crescimento das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo após infecção de células THP-1.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. A partir da infecção, as unidades formadoras de colônia (CFU) obtidas nos pontos de infecção de 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas em placas de meio 7H10 foram quantificadas 30 dias após o plaqueamento. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ . N=4

#### 4.4 – *Mycobacterium bovis* BCG Moreau apresenta maior taxa de internalização em macrófagos THP-1

No tempo de 4 horas, foi possível observar a taxa de internalização para cada cepa estudada. O percentual de internalização foi relativo ao quantitativo inicial de bactéria que foi utilizado para a infecção, sendo comum a todas as cepas ( $2 \times 10^6$  bactérias). A cepa BCG Moreau apresentou 20% das bactérias totais internalizadas, já as cepas Pasteur e Tokyo tiveram 8,5% e 1,3% de internalização (Gráfico 4.5), respectivamente, o que pode estar refletindo no quantitativo final observado ao longo da cinética.

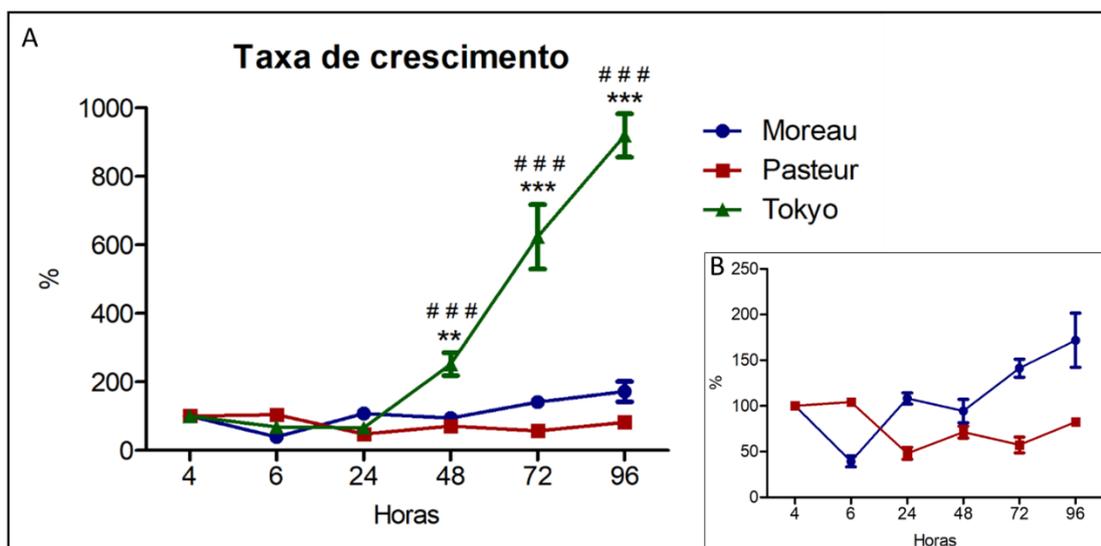


**Gráfico 4.5. Comparação da taxa de internalização das cepas de BCG Moreau, Pasteur e Tokyo por células dTHP-1 em 4 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. As unidades formadoras de colônia (CFU) obtidas nos pontos de infecção de 4 horas em placas de meio 7H10 foram quantificadas 30 dias após o plaqueamento e representam o quantitativo de bactérias fagocitadas no tempo estudado. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ . N=5

#### 4.5 – *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e Tokyo apresentam aumento do número de bactérias ao longo da infecção

Para observar se a taxa de internalização estaria contribuindo para o quantitativo final observado ao longo da cinética de infecção, nos propomos a observar a taxa de crescimento das bactérias dentro dos macrófagos THP-1. Para isso, consideramos o quantitativo de bactérias internalizadas em 4 horas como sendo 100% das bactérias intracelulares e comparamos com o quantitativo bacteriano obtido dos macrófagos nos demais tempos de infecção (Gráfico 4.6). Foi possível constatar que a cepa BCG Tokyo apresenta um crescimento distinto das demais cepas estudadas. Ao final da cinética podemos observar um aumento de CFU de aproximadamente, 900 % para BCG Tokyo em relação à quantidade de bactérias internalizadas em 4 horas. Estes valores foram de 170 % para BCG Moreau e 82 % para BCG Pasteur.

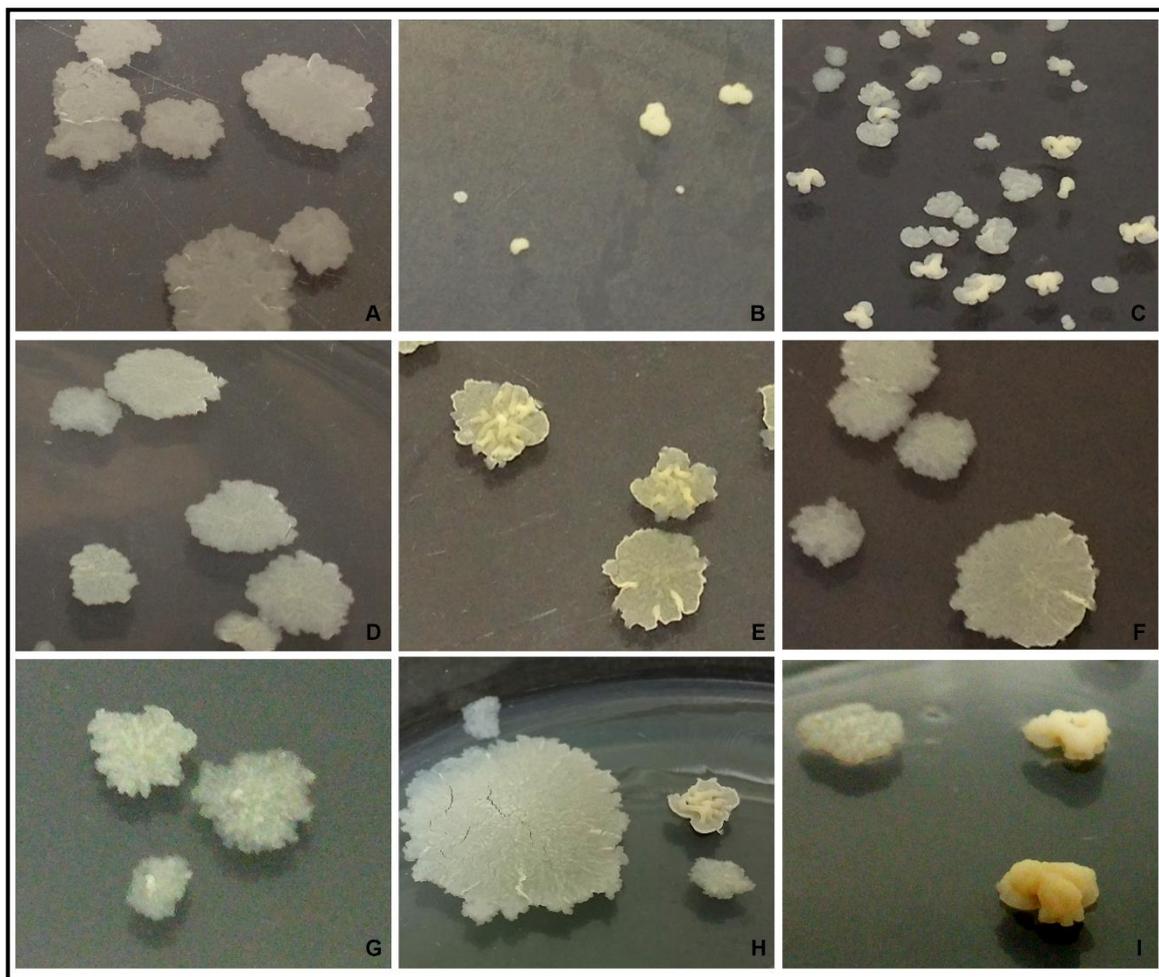
A cepa BCG Tokyo apresenta aumento significativo de CFU a partir de 48 horas, enquanto BCG Moreau tende a um modesto aumento a partir de 72 horas. Já a cepa BCG Pasteur parece manter estável esse quantitativo ao longo da cinética.



**Gráfico 4.6. Comparação da taxa de crescimento intracelular das cepas de BCG Moreau, Pasteur e Tokyo em células dTHP-1.** (A) Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. As unidades formadoras de colônia (CFU) obtidas nos pontos de infecção de 4 horas em placas de meio 7H10 foram quantificadas 30 dias após o plaqueamento e representam o quantitativo de bactérias internalizadas, o mesmo procedimento foi realizado nos demais pontos da cinética. Os pontos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas foram avaliados relativos ao quantitativo internalizado em 4 horas. (B) Detalhe da taxa de crescimento para as cepas BCG Moreau e Pasteur. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  (comparação entre BCG Moreau e Tokyo); ###  $p < 0,001$  (comparação entre BCG Pasteur e BCG Tokyo). N=4

#### 4.6 – *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e Pasteur apresentam mudanças na morfologia de colônia após a infecção

O crescimento das bactérias em placas 7H10 possibilitou, além da contagem das unidades formadoras de colônia (CFU), a observação de mudanças no perfil morfológico das colônias das cepas BCGs. Na figura 4.6 podemos observar imagens representativas das colônias de BCG Moreau, Pasteur e Tokyo, nos tempos iniciais de 4 e 6 horas e no tempo final de 96 horas de infecção. No tempo de 4 horas foi possível detectar colônias de BCG Moreau espalhadas e lisas (Figura 4.6A), diferente da morfologia rugosa, observada na figura 4.1G. Nos demais tempos a morfologia retornou ao padrão esperado. As colônias da cepa BCG Pasteur (Figura 4.6D-F) apresentam-se lisas e bem espalhadas, não recuperando a morfologia observada inicialmente, de colônias rugosas (Figura 4.1H). As colônias da cepa BCG Tokyo dos tempos de 4 e 6 horas (Figura 4.6 G-H) apresentam-se lisas e espalhadas e não foram observadas as colônias rugosas que coexistiam com as lisas, como visto na figura 4.1I. A partir do tempo de 24 até 96 horas observamos colônias lisas e rugosas (Figura 4.6I).



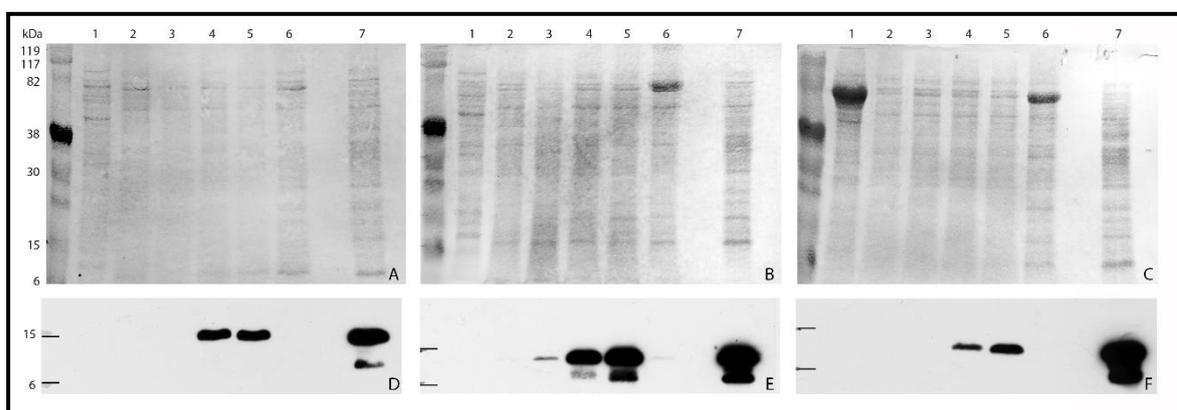
**Figura 4.6. Perfil representativo de colônias das cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo em placas 7H10 recuperadas após infecção em células THP-1.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. A partir da infecção, as unidades formadoras de colônia (CFU) obtidas nos pontos de infecção de 4, 6 e 96 horas em placas de meio 7H10 foram analisadas 28 dias após o plaqueamento. Cepas BCG Moreau (A-C), Pasteur (D-F) e Tokyo (G-I) nos tempos de 4 (A, D e G), 6 (B, E e H) e 96 horas (C, F e I) pós infecção. N=4

#### **4.7 – A cepa BCG Pasteur regula positivamente o *regulon* DevR em 6 horas, enquanto BCG Moreau apenas no tempo de 24 horas**

Dados preliminares do grupo, que caracterizou o perfil proteico intracelular das cepas BCG Moreau e Pasteur, demonstraram uma diferença na expressão da proteína HspX. Em *M. tb*, a proteína HspX é detectada apenas em culturas sob condições de hipóxia, indicando a regulação positiva do *regulon* DevR, responsável pela resposta à hipóxia (Majumdar *et al.*, 2012). Além disso, genes responsivos a esse *regulon* também foram induzidos dentro do contexto de macrófagos ativados (Samanovic *et al.*, 2015).

Experimentos preliminares de *western blotting* para avaliar a expressão da proteína bacteriana HspX nos tempos de 4, 6, 24 e 48 horas de infecção foram realizados. Como controle experimental utilizamos a cepa avaliada cultivada em meio 7H9, a cepa BCG Moreau cultivada em meio Sauton, além do canal contendo proteínas extraídas de macrófagos não infectados (Figura 4.7).

A expressão da proteína HspX foi detectada a partir de 24 horas em BCG Moreau e Tokyo, e permaneceu com expressão similar no tempo de 48 horas. Já na cepa BCG Pasteur, sua expressão foi detectada desde 6 horas de infecção, aumentando gradativamente (Figura 4.7).



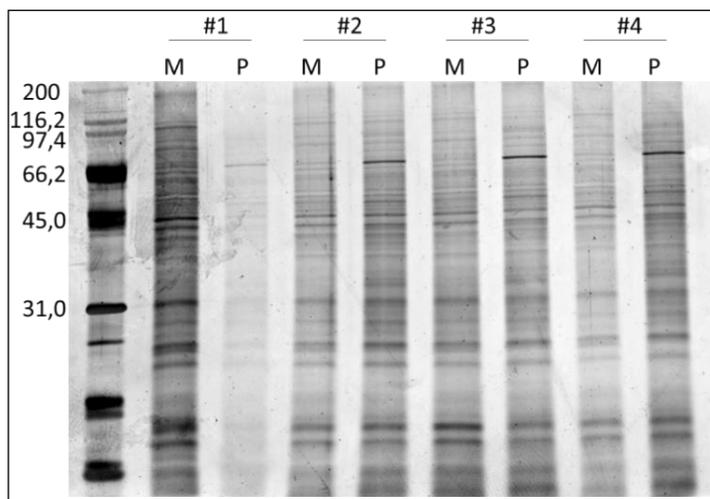
**Figura 4.7. Western blotting para avaliar a expressão da proteína HspX de BCG em resposta ao ambiente intracelular.** Proteínas intracelulares (10 µg por canal) de BCG Moreau (A e D), Pasteur (B e E) e Tokyo (C e F). Proteínas totais de macrófagos não infectado (canal 1); proteínas intracelulares das bactérias após 4 (canal 2), 6 (canal 3), 24 (canal 4) e 48 horas de infecção (canal 5); proteínas intracelulares de BCG crescido em meio 7H9 sob agitação (canal 6); proteínas intracelulares de BCG Moreau crescido em meio Sauton de forma estática (canal 7 – controle positivo). Marcador de peso molecular indicado à esquerda, em kDa. N=2.

#### 4.8 – Perfil proteômico intracelular de BCG após o tempo de 24 horas de infecção

A partir do resultado preliminar da expressão da proteína HspX, optamos por analisar de forma mais ampla o perfil proteico intracelular dos bacilos através da proteômica *shotgun*. Para isso, as amostras proteicas foram obtidas de bacilos intracelulares após 24 horas de infecção. As bactérias foram ressuspensas em tampão de lise contendo SDS/DTT, a fim de melhorar o perfil de lise e otimizar a extração proteica.

A quantificação de proteínas do extrato e o perfil unidimensional obtido para as quatro replicatas realizadas foi muito similar, com exceção da amostra da cepa BCG

Pasteur da replicata 1 (Figura 4.8). Essa replicata foi descartada para os experimentos subsequentes.



**Figura 4.8.** Gel unidimensional (1D) representativo do perfil de proteínas intracelulares de BCG Moreau (M) e Pasteur (P) após 24 horas de infecção em macrófagos THP-1. Em cada canal foram aplicados 5 ug de proteínas. Os géis SDS-PAGE (15%) foram corados com prata e as imagens digitalizadas no densitômetro GS - 800. Marcador de peso molecular indicado à esquerda, em kDa.

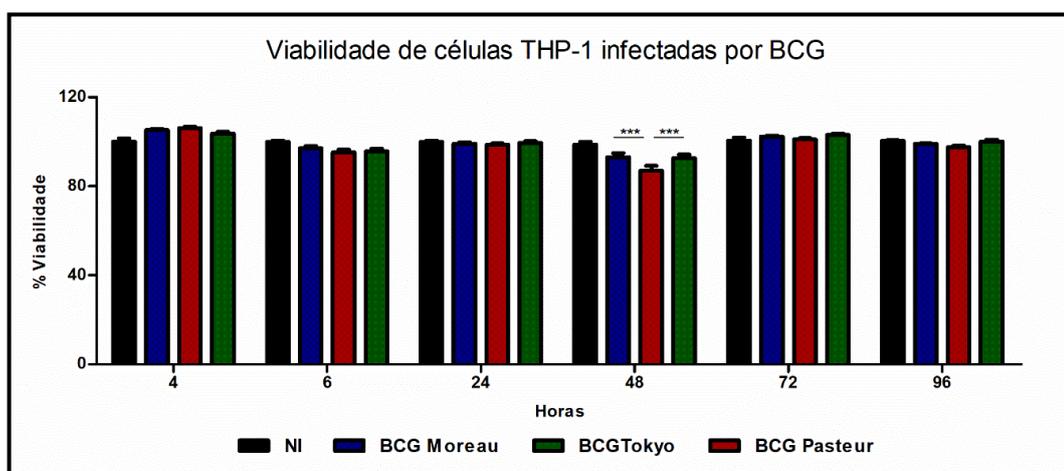
Após essa avaliação, as amostras seguiram para a metodologia *FASP* adaptada e a dosagem realizada no equipamento *NanoDrop* foi considerada satisfatória (Tabela 3.1) para o prosseguimento da análise. Diante da boa qualidade das amostras e da concentração, seguiu-se para a avaliação da composição proteica no equipamento *Orbitrap*. As análises das amostras serão realizadas assim que os resultados forem liberados pela Plataforma Proteômica PDTIS/FIOCRUZ.

Tabela 3.1: Concentração peptídica das amostras, após a realização do protocolo de *FASP* adaptado.

Amostra	Concentração (mg/mL)
BSA	0,626
Moreau replicata 2	0,558
Pasteur replicata 2	0,623
Moreau replicata 3	0,437
Pasteur replicata 3	0,531
Moreau replicata 4	0,541
Pasteur replicata 4	0,910

#### 4.9 - O perfil de viabilidade dos macrófagos THP-1 infectados por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo não é alterado ao longo da cinética de infecção

Além do crescimento bacteriano, investigamos a viabilidade dos macrófagos frente à infecção com as diferentes cepas nos tempos estudados; para isso foi utilizado o ensaio com o composto resazurina. O gráfico 4.7 apresenta a viabilidade das células THP-1 infectadas com as cepas BCGs ao longo da cinética. A viabilidade dos macrófagos infectados é relativa ao controle de células não infectadas de cada tempo. O perfil de viabilidade dos macrófagos é similar, com exceção do tempo de 48 horas.



**Gráfico 4.7. Perfil de viabilidade de macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. A partir da infecção, a viabilidade dos macrófagos THP-1 foi avaliada através de ensaios com resazurina, tendo como controle os macrófagos não infectados. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\* $p < 0,001$ . N=5

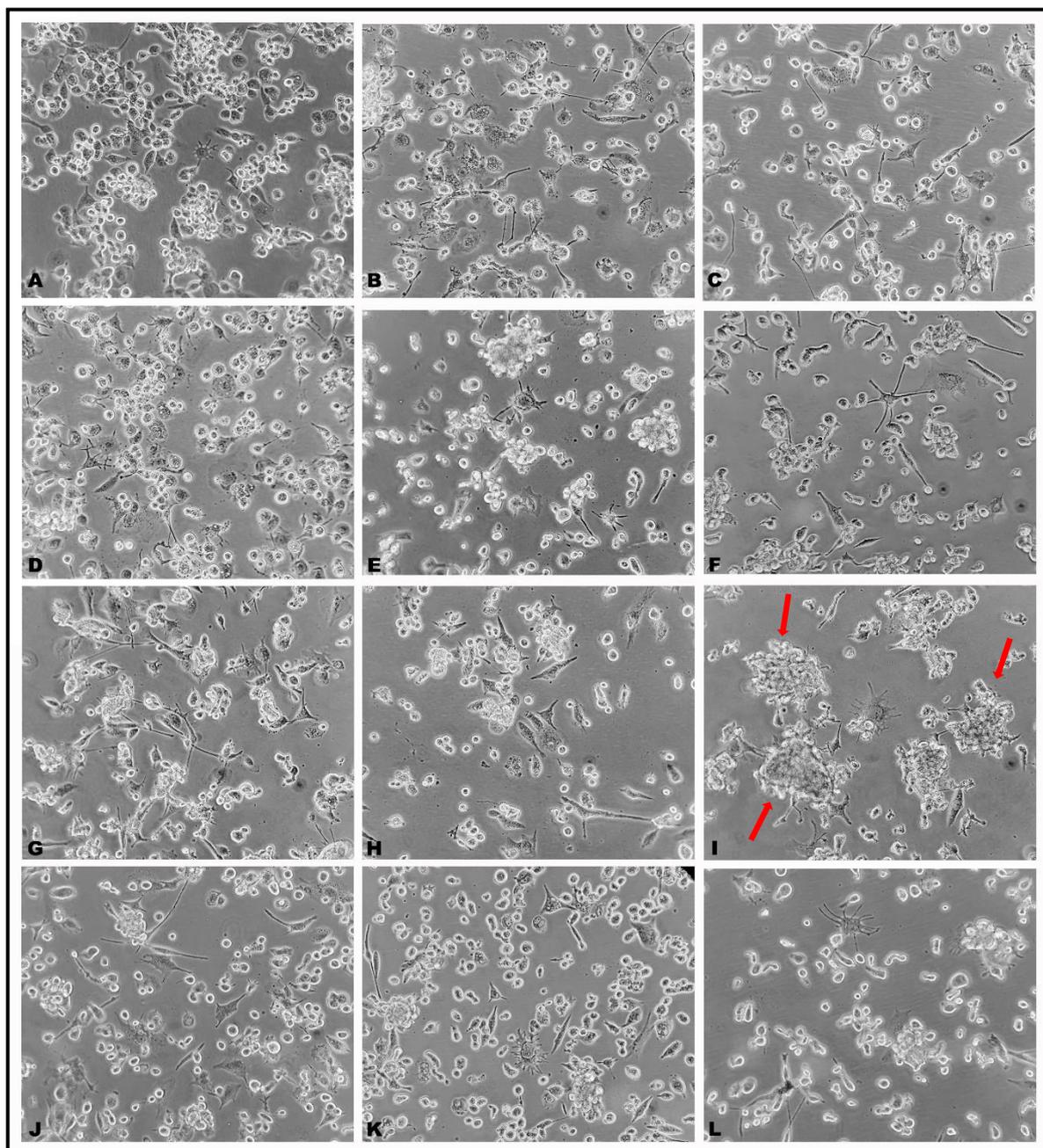
No tempo de 48 horas observamos uma redução significativa na viabilidade dos macrófagos que foram infectados com BCG Pasteur,

#### 4.10 – O perfil morfológico dos macrófagos THP-1 infectados não apresenta alteração cepa-específica

Ao longo da realização dos experimentos de infecção, nos tempos de 4, 24 e 48 h, buscamos avaliar se as cepas estudadas estavam causando mudanças morfológicas nas células THP-1 quando comparadas às mesmas células antes de serem infectadas (Figura 4.9). Após 4 horas de infecção, foi possível observar

alterações na morfologia dos macrófagos, provavelmente associadas à sua ativação frente ao estímulo da infecção.

Não observamos mudanças que poderiam ser cepa-específicas, com exceção da formação de um “aglomerado” de macrófagos quando infectados por BCG Pasteur, no tempo de 48 horas, indicados na figura pelas setas vermelhas. Cabe ressaltar uma diminuição aparente no quantitativo dos macrófagos THP-1 infectados pela cepa Pasteur no ponto de 48 horas, como demonstrado no gráfico 4.3.



**Figura 4.9. Perfil de viabilidade de macrófagos THP-1 infectados por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 4, 24, 48 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas (A, B e C). Macrófagos THP-1 infectados por BCG Moreau (D, E, F), Pasteur (G, H e I) e Tokyo (J, K e L), nos tempos de 4 (D, G e

J), 24 (E, H e K) e 48 horas (F, I e L) pós infecção. Imagens representativas obtidas com microscópio Nikon Eclipse Ci, aumento 20 X. As setas em vermelho indicam os grumos de células THP-1. N=3

#### **4.11 – Avaliação do perfil de citocinas secretadas e da produção de Óxido Nítrico por macrófagos THP-1 em resposta à infecção com as diferentes cepas de BCG**

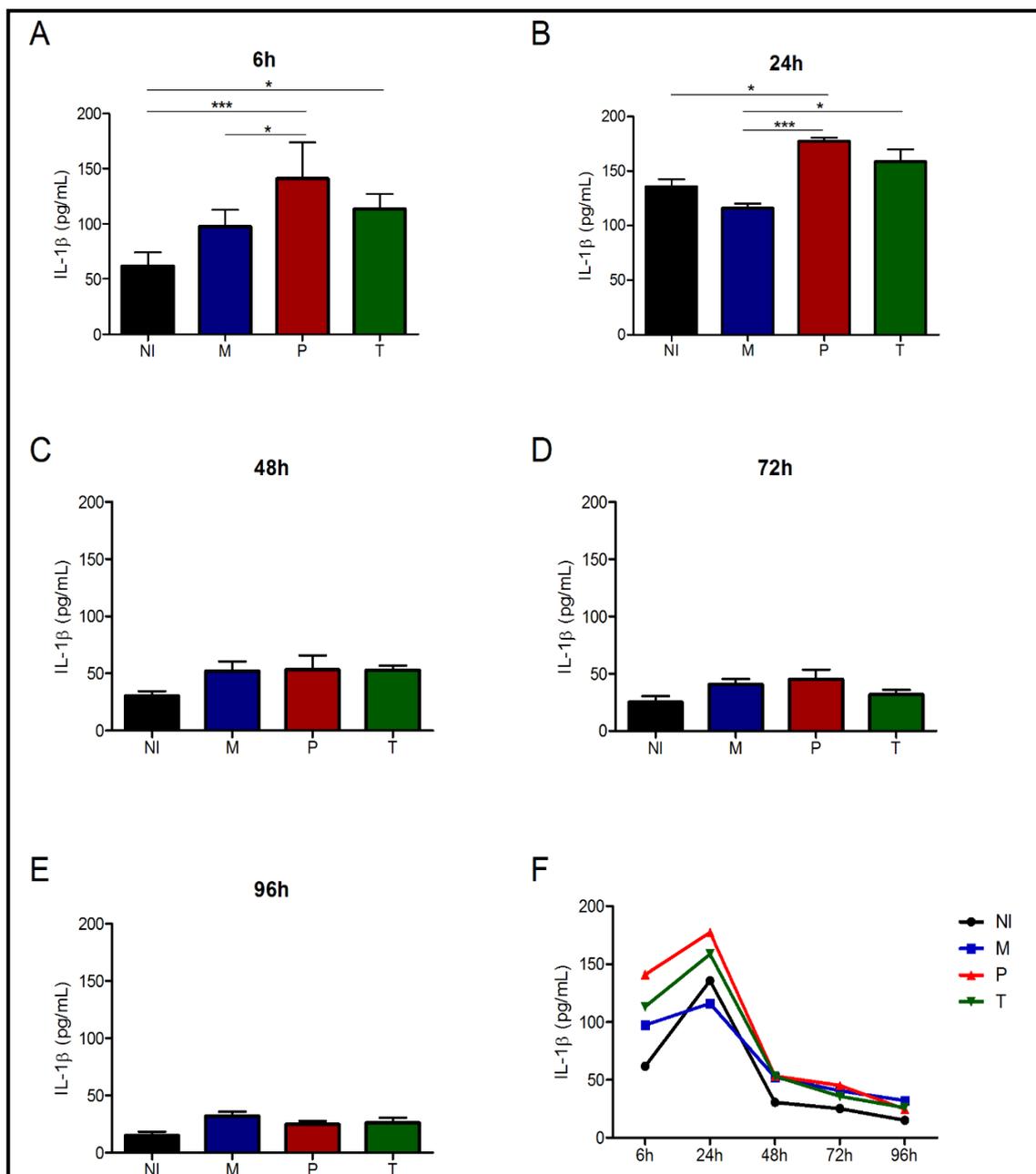
Para avaliar a possível participação de citocinas no contexto da infecção, o sobrenadante dos macrófagos não infectados (NI) e infectados foram coletados a cada 24 horas, sendo o primeiro ponto em 6 horas. Os sobrenadantes foram avaliados pela técnica de Elisa (para quantificação de IL1- $\beta$ , IL-6, IL10 e MCP-1) ou pela técnica de CBA (para quantificação de TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10). No entanto, não foi possível detectar a citocina IL-10, em ambas as técnicas aplicadas, Elisa e CBA.

Também buscamos avaliar a produção de óxido nítrico (NO) pelas células infectadas por BCG, utilizando para isso a técnica de Griess, mas os níveis de NO não foram detectáveis.

##### **4.11.1 – A cepa BCG Pasteur induz maior secreção da citocina IL1- $\beta$ nos tempos de 6 e 24 horas quando comparada à cepa Moreau**

Inicialmente, optamos por avaliar a expressão da citocina IL-1 $\beta$  pela técnica de Elisa (Gráfico 4.8), que foi confirmada pelo ensaio de CBA (dados não mostrados). No gráfico 4.8 observamos a expressão dessa citocina nos tempos de 6 (A), 24 (B), 48 (C), 72 (D) e 96 (E) horas, sendo o gráfico F representativo da cinética de cada condição experimental. Os dados são provenientes de 4 replicatas biológicas. Observamos um aumento na expressão dessa citocina no tempo de 6 horas nas células infectadas com BCG Pasteur e BCG Tokyo, quando comparadas às células não infectadas. O pico de secreção foi detectado no tempo de 24 horas, com uma maior secreção de IL-1 $\beta$  nas células infectadas com a cepa BCG Pasteur em relação as demais. A partir de 24 horas a secreção da citocina IL-1  $\beta$  cai a níveis detectados nos macrófagos não infectados.

A citocina IL-1 $\beta$  também foi dosada através da técnica de CBA e o perfil de secreção dessa citocina pelas células infectadas permaneceu o mesmo (dados não mostrados).

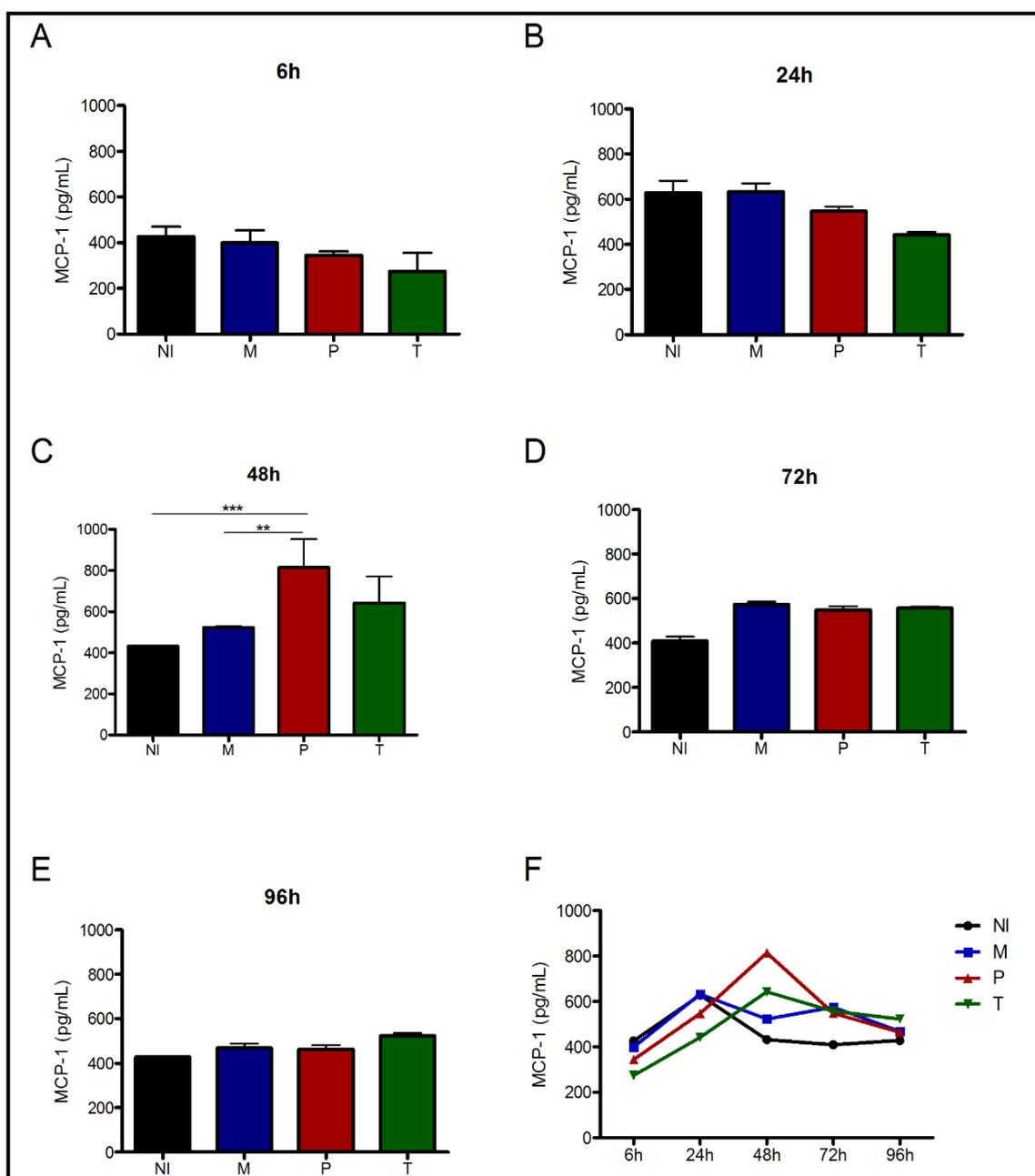


**Gráfico 4.8. Perfil de expressão da citocina IL-1 $\beta$  em macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau (M), Pasteur (P) e Tokyo (T) nos tempos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. O sobrenadante de cultura foi recolhido a cada 24 horas, iniciado no tempo de 6 horas. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ . N=4

---

**4.11.2 – A cepa BCG Pasteur induz maior secreção da citocina MCP-1 no tempo de 48 horas quando comparada à cepa Moreau**

Avaliamos a expressão da citocina MCP-1 pela técnica de Elisa. No gráfico 4.9 observamos a expressão dessa citocina nos tempos de 6 (A), 24 (B), 48 (C), 72 (D) e 96 (E) horas, sendo o gráfico F representativo da cinética de cada condição experimental. Os dados são provenientes de 4 replicatas biológicas. Observamos um aumento na expressão dessa citocina no tempo de 48 horas nas células infectadas com BCG Pasteur, quando comparadas as células não infectadas e infectadas por BCG Moreau. O pico de secreção foi detectado no tempo de 48 horas, com uma maior secreção de MCP-1 nas células infectadas com a cepa BCG Pasteur em relação as demais. Em 96 horas a secreção da citocina MCP-1 cai a níveis detectados nos macrófagos não infectados.

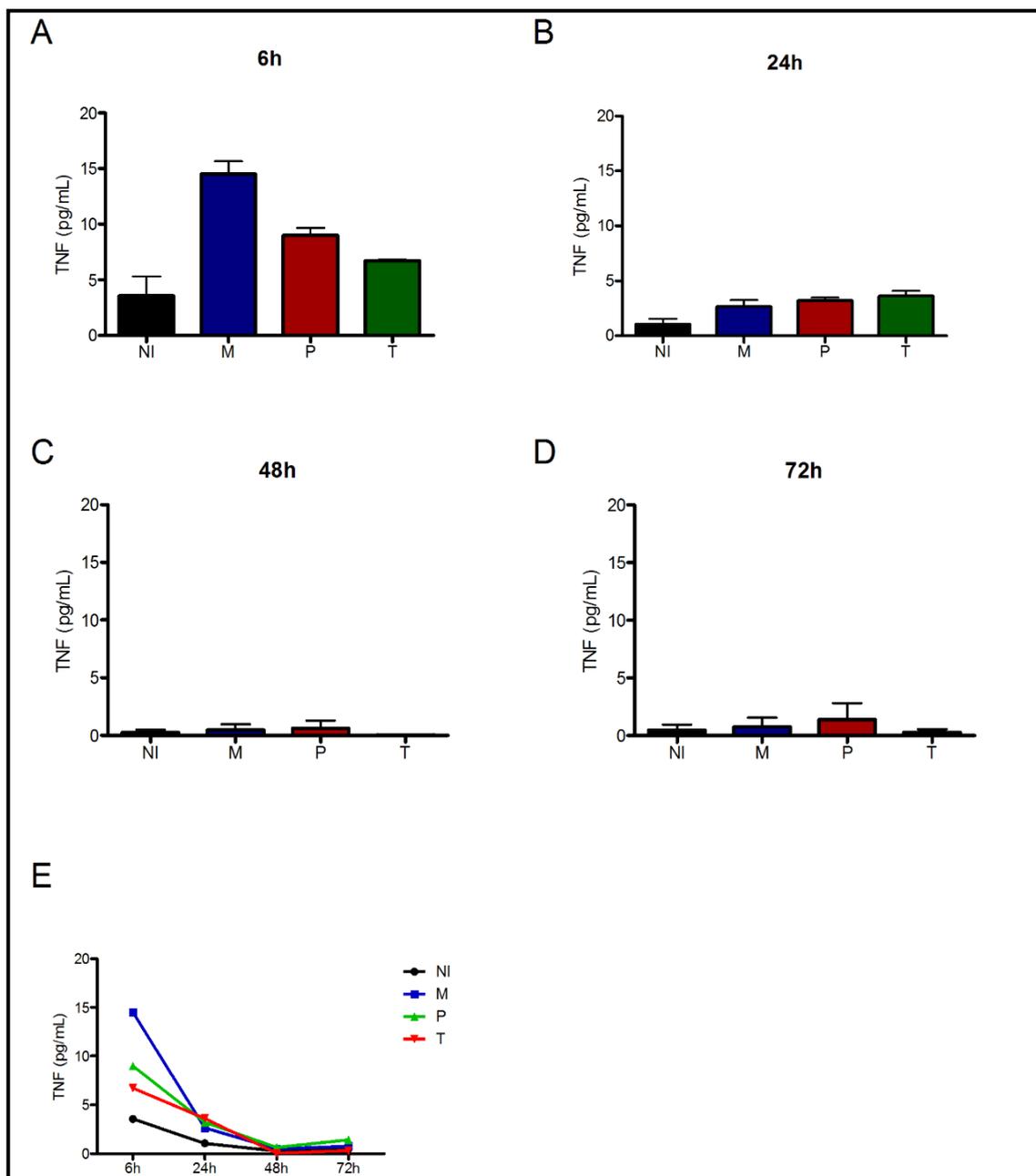


**Gráfico 4.9. Perfil de expressão da citocina MCP-1 em macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau (M), Pasteur (P) e Tokyo (T) nos tempos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. O sobrenadante de cultura foi recolhido a cada 24 horas, iniciado no tempo de 6 horas. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ . N=4

---

**4.11.3 – A cepa Moreau induz um aparente aumento na secreção da citocina TNF- $\alpha$  no tempo de 6 horas quando comparada à cepa Pasteur**

Avaliamos a expressão da citocina TNF- $\alpha$  pela técnica de CBA. No gráfico 4.10 observamos a expressão dessa citocina nos tempos de 6 (A), 24 (B), 48 (C), 72 (D) e 96 (E) horas, sendo o gráfico F representativo da cinética de cada condição experimental. Os dados são provenientes de 2 replicatas biológicas. Observamos uma tendência ao aumento na expressão dessa citocina já no tempo de 6 horas em todas as células infectadas, principalmente nas células infectadas por BCG Moreau. A partir do tempo de 24 horas podemos observar uma diminuição na secreção dessa citocina a níveis detectados nos macrófagos não infectados.

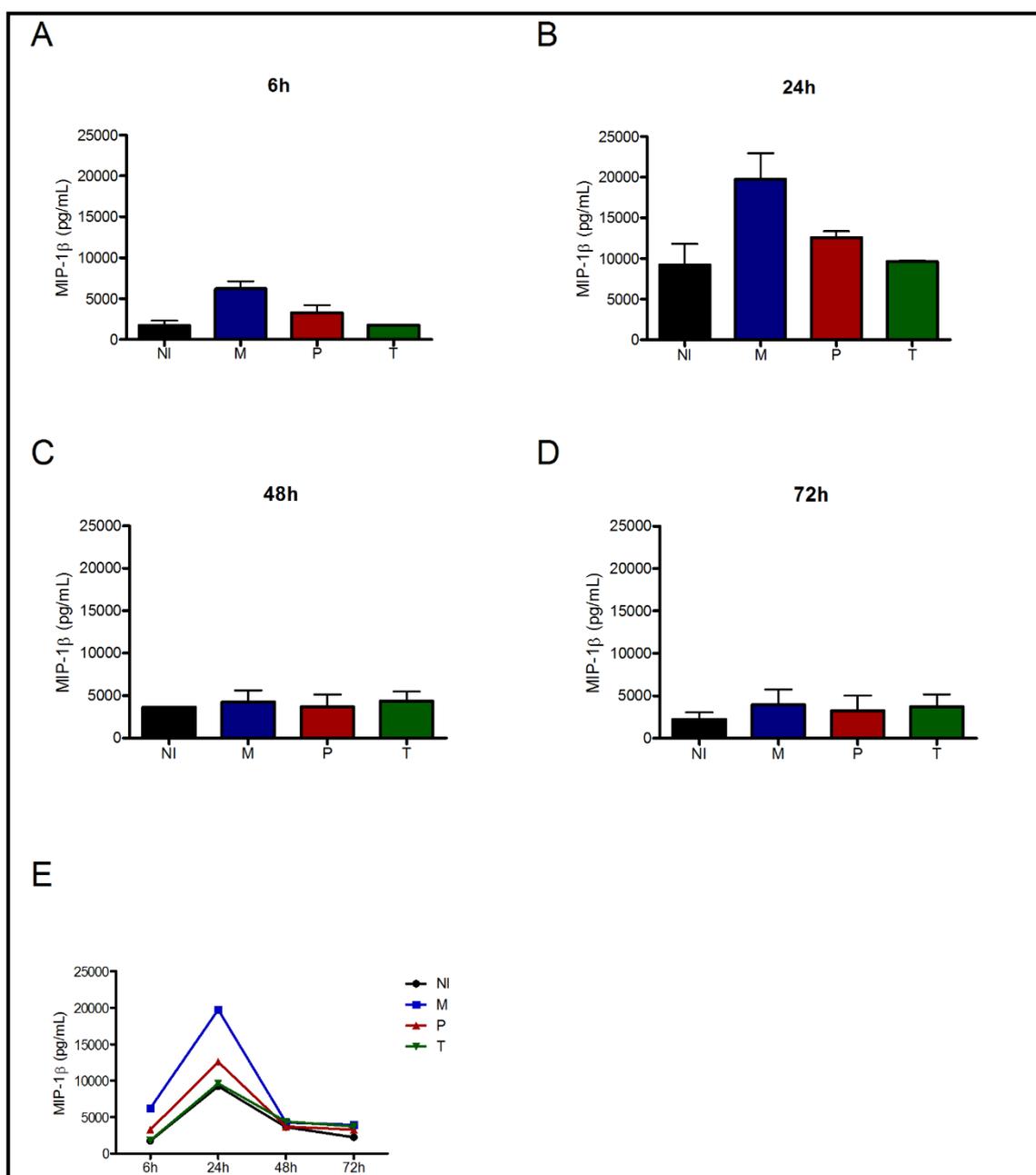


**Gráfico 4.10. Perfil de expressão da citocina TNF- $\alpha$  em macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau (M), Pasteur (P) e Tokyo (T) nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. O sobrenadante de cultura foi recolhido a cada 24 horas, iniciado no tempo de 6 horas. N=2

---

**4.11.4 – A cepa BCG Moreau induz um aparente aumento na secreção da citocina MIP-1 $\beta$  no tempo de 24 horas quando comparada à cepa Pasteur**

Avaliamos a expressão da citocina MIP-1 $\beta$  pela técnica de CBA. No gráfico 4.11 observamos a expressão dessa citocina nos tempos de 6 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 (D), sendo o gráfico E representativo da cinética de cada condição experimental. Os dados são provenientes de 2 replicatas biológicas. Observamos uma tendência ao aumento na expressão dessa citocina já no tempo de 6 horas, com pico proeminente em 24 horas, nas células que foram infectadas por BCG Moreau. A partir do tempo de 48 horas podemos observar uma diminuição na secreção dessa citocina a níveis detectados nos macrófagos não infectados.

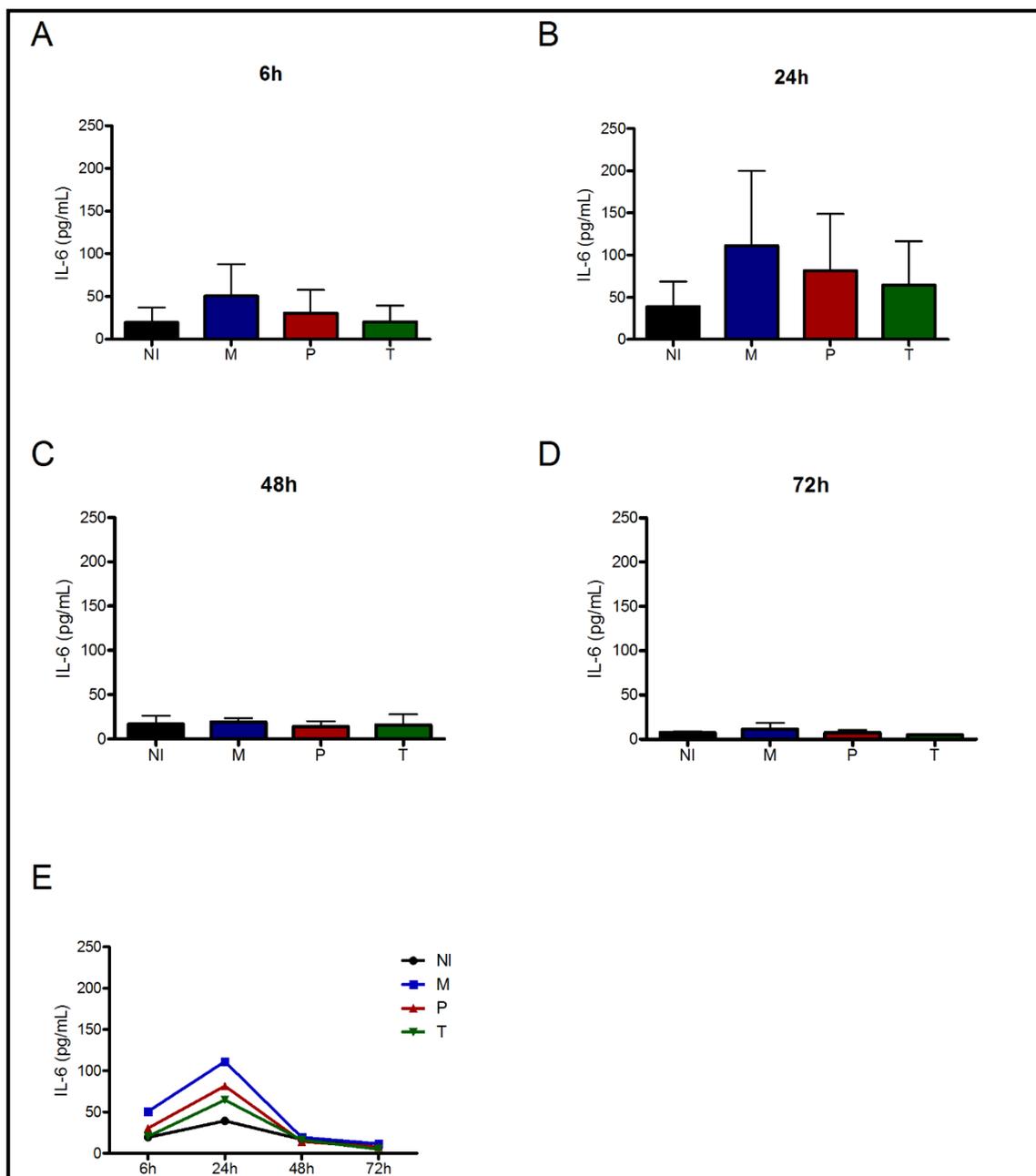


**Gráfico 4.11. Perfil de expressão da citocina MIP-1 $\beta$  em macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau (M), Pasteur (P) e Tokyo (T) nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. O sobrenadante de cultura foi recolhido a cada 24 horas, iniciado no tempo de 6 horas. N=2

---

**4.11.5 – A cepa BCG Moreau induz um aparente aumento na secreção da citocina IL-6 no tempo de 24 horas quando comparada à cepa Pasteur**

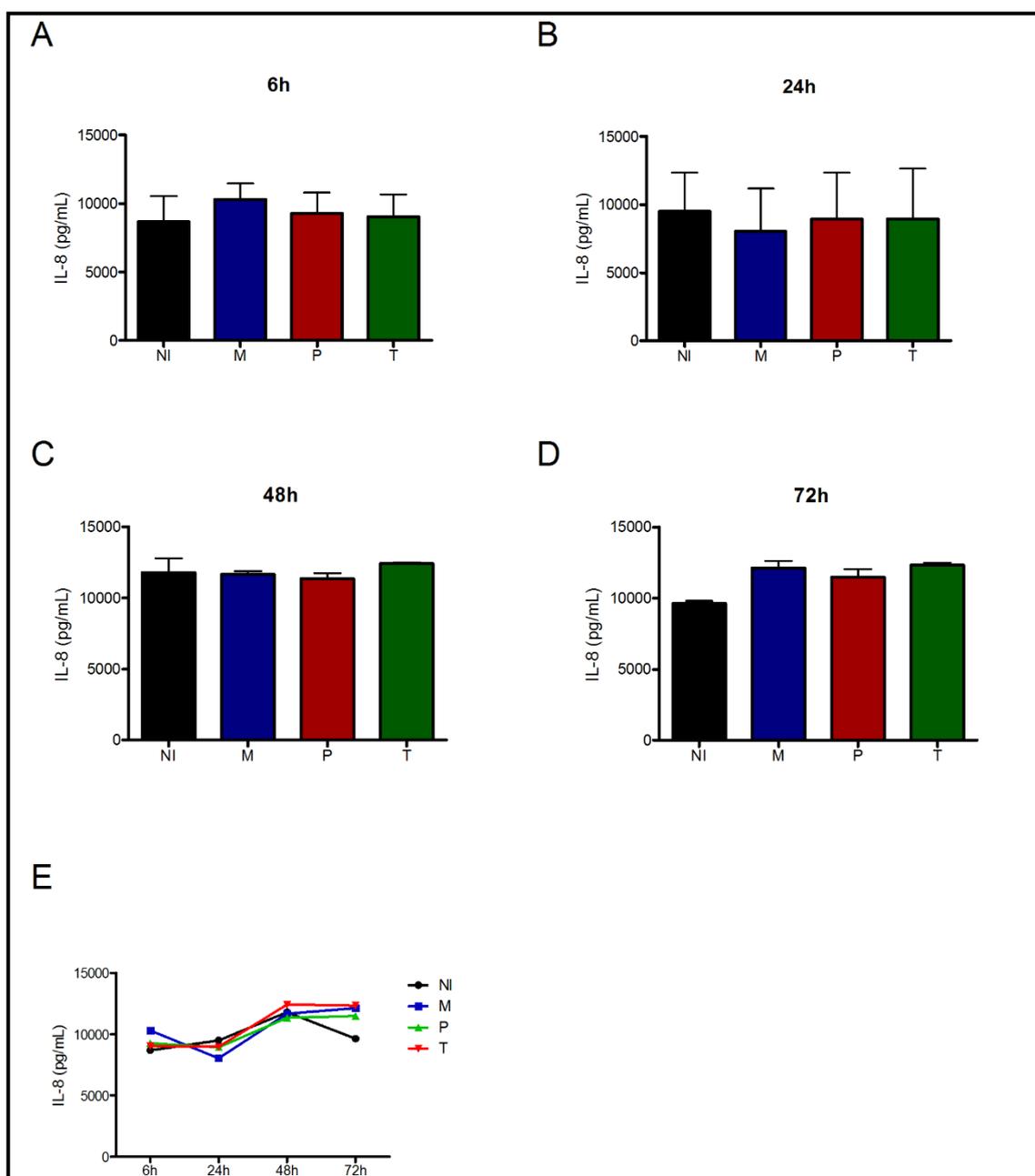
Avaliamos a expressão da citocina IL-6 pela técnica de CBA. No gráfico 4.12 observamos a expressão dessa citocina nos tempos de 6 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 (D), sendo o gráfico E representativo da cinética de cada condição experimental. Os dados são provenientes de 2 replicatas biológicas. Observamos uma tendência ao aumento na expressão dessa citocina já no tempo de 6 horas, com pico em 24 horas, nas células que foram infectadas por BCG Moreau. A partir do tempo de 48 horas podemos observar uma diminuição na secreção dessa citocina a níveis detectados nos macrófagos não infectados.



**Gráfico 4.12. Perfil de expressão da citocina IL-6 em macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau (M), Pasteur (P) e Tokyo (T) nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. O sobrenadante de cultura foi recolhido a cada 24 horas, iniciado no tempo de 6 horas. N=2

**4.11.6 – A cepa BCG Moreau, Pasteur e Tokyo parecem não induzir modulação na secreção da citocina IL-8**

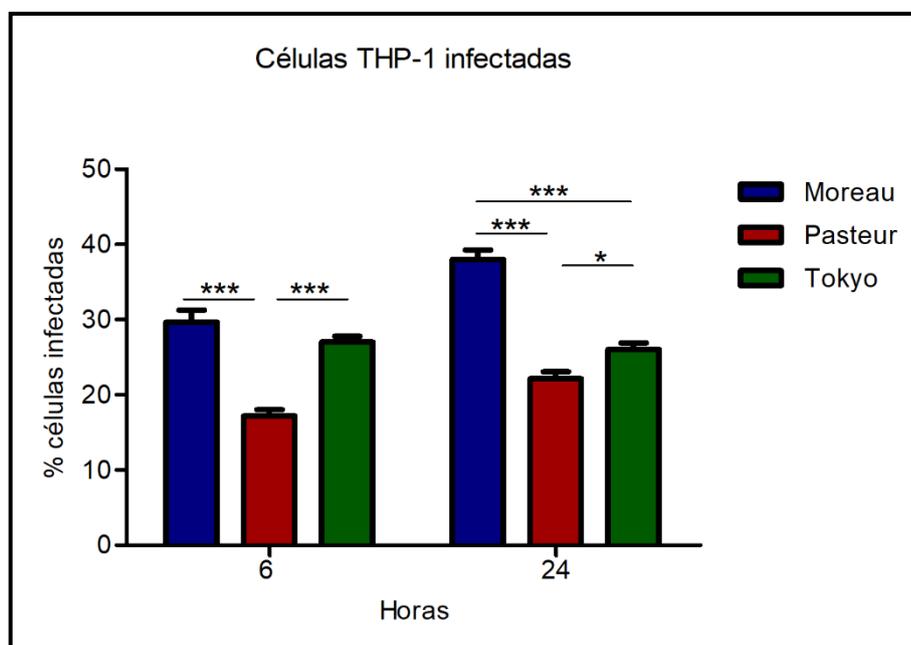
Avaliamos a expressão da citocina IL-8 pela técnica de CBA. No gráfico 4.13 observamos a expressão dessa citocina nos tempos de 6 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 (D), sendo o gráfico E representativo da cinética de cada condição experimental. Os dados são provenientes de 2 replicatas biológicas. Observamos nas células infectadas por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo um perfil de secreção da citocina IL-8 compatível aos níveis detectados nos macrófagos não infectados. Sugerindo a não modulação dessa citocina nos tempos observados.



**Gráfico 4.13. Perfil de expressão da citocina IL-8 em macrófagos THP-1 não infectados (NI) e frente a infecção com as cepas BCG Moreau (M), Pasteur (P) e Tokyo (T) nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. O sobrenadante de cultura foi recolhido a cada 24 horas, iniciado no tempo de 6 horas. N=2

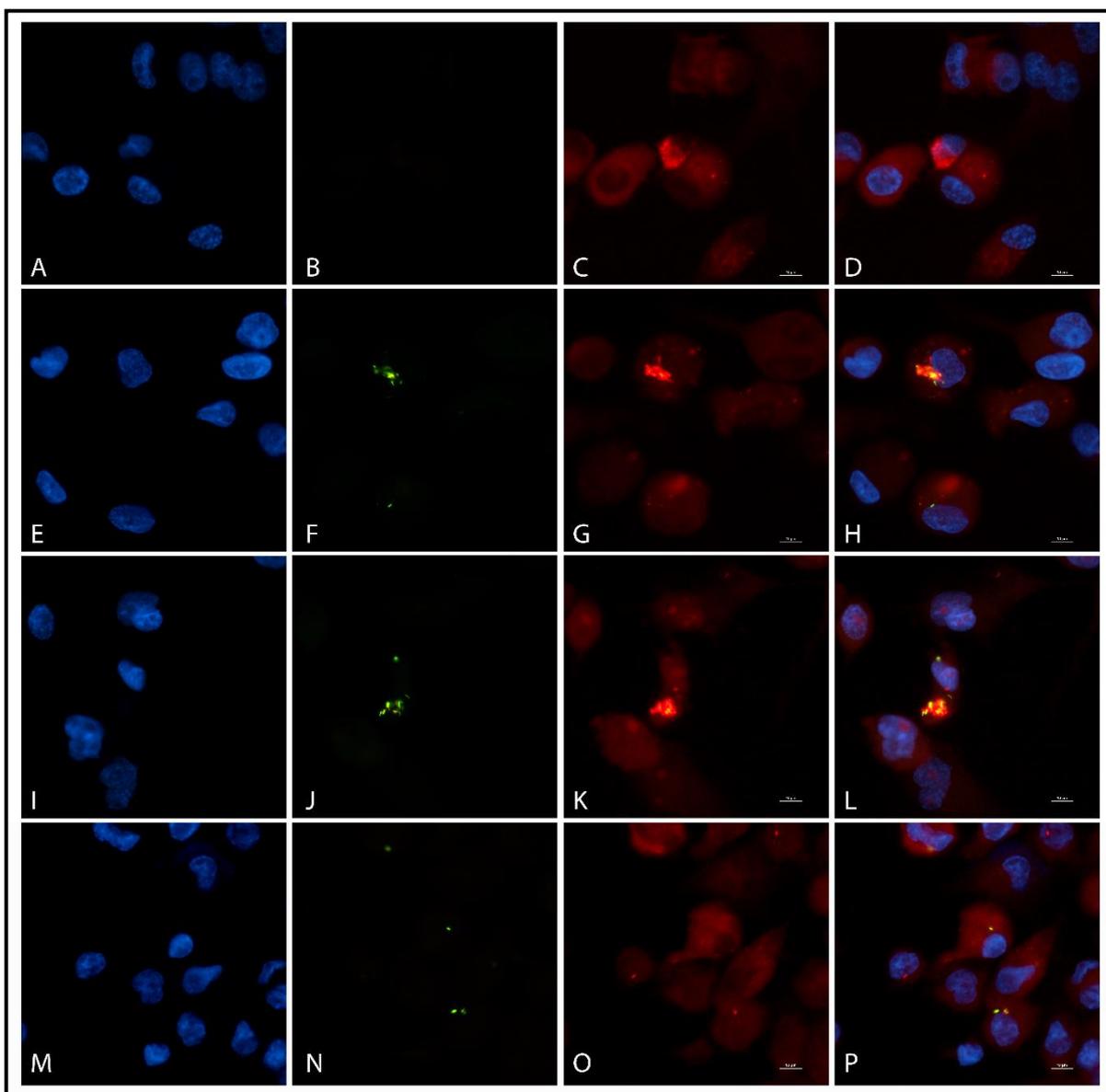
#### 4.12 – *Mycobacterium bovis* BCG Moreau resiste em fagossomas acidificados até 24 horas

Outro parâmetro avaliado foi a colocação das bactérias com vesículas acidificadas, através da marcação com o fluoróforo *LysoTracker*. Para isso, as bactérias foram marcadas previamente com o fluoróforo *Live* e utilizadas para infectar as células THP-1 diferenciadas. A marcação com o fluoróforo *Live* possibilitou quantificar o percentual de células infectadas (Gráfico 4.14). Foram analisadas no mínimo 250 células em cada condição estudada. No tempo de 6 horas foi possível observar uma maior infecção por BCG Moreau e Tokyo (29% e 27%, respectivamente), comparados a 17% para a cepa BCG Pasteur. No tempo de 24 horas, 38% das células estavam infectadas por BCG Moreau, enquanto que apenas 22% e 26% estavam infectadas por BCG Tokyo e BCG Pasteur, respectivamente.

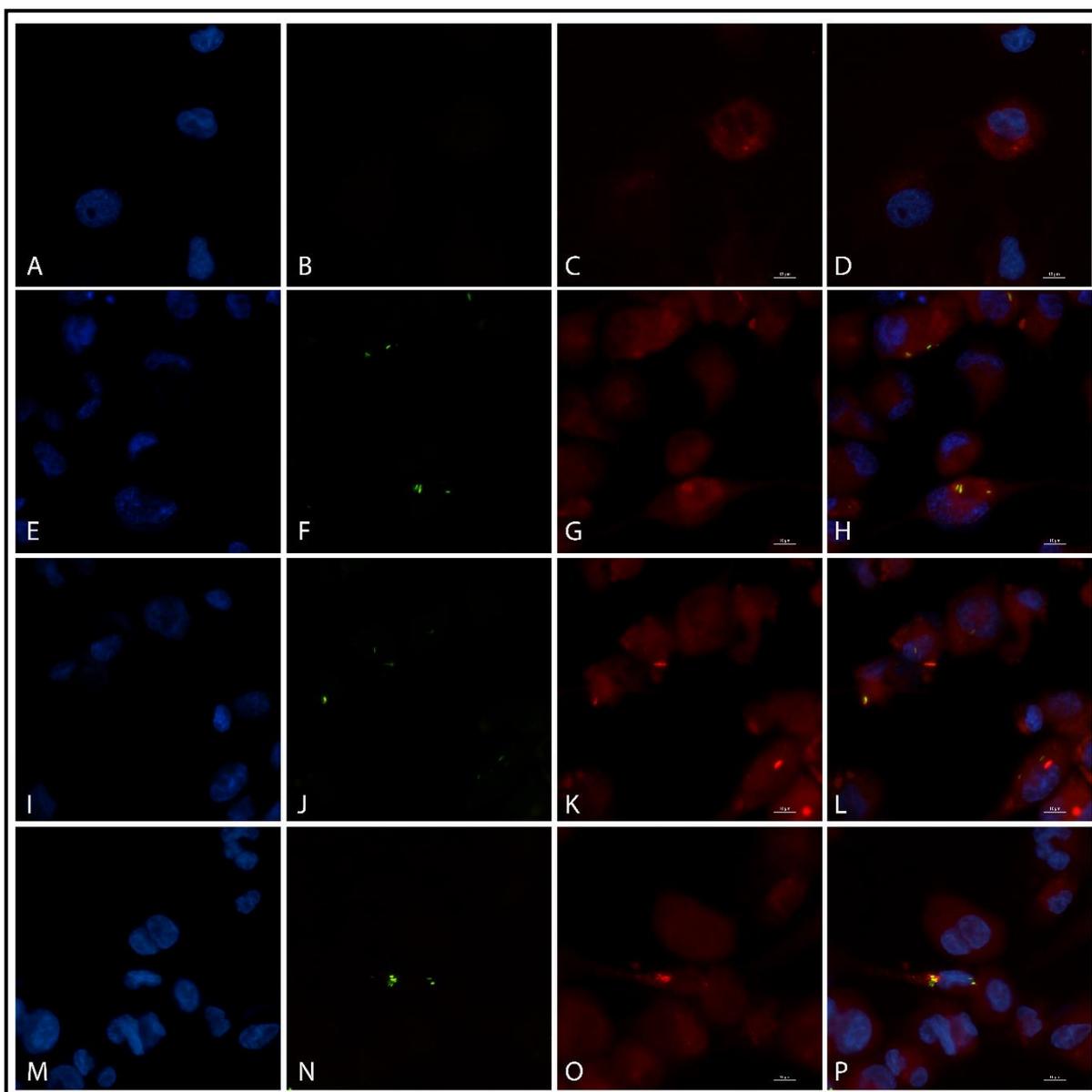


**Gráfico 4.14. Porcentagem de células THP-1 infectadas por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6 e 24 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Foram analisadas pelo menos 250 células em cada condição. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . N=3

Avaliamos também o percentual de colocação das diferentes cepas BCG com vesículas acidificadas. As figuras 4.12 e 4.13 são representativas desta análise, nos tempos de 6 e 24 horas, respectivamente.



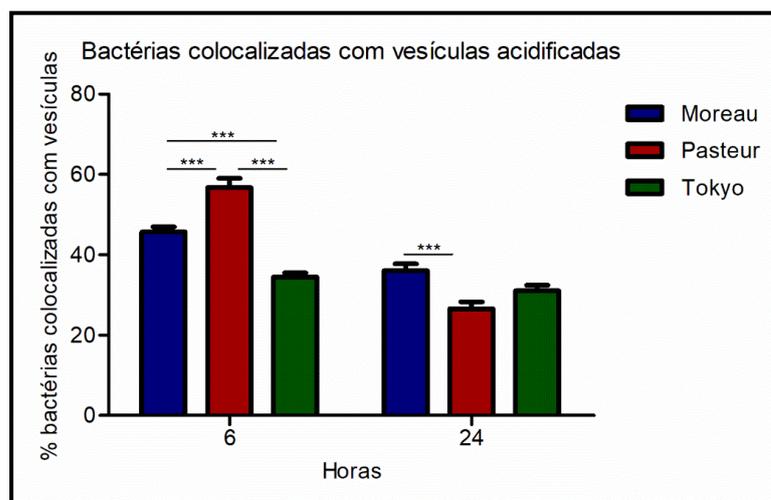
**Figura 4.10. Perfil representativo de colocalização das cepas BCG com vesículas acidificadas no tempo de 6 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Células THP-1 não infectadas (A-D) e infectadas por BCG Moreau (E-H), Pasteur (I-L) e Tokyo (M-P). Imunofluorescência detectando o núcleo (A, E, I e M), marcado com DAPI (azul); BCG Moreau (F), Pasteur (J) e Tokyo (N) marcados com *Live* (verde); vesículas acidificadas (C, G, K, O) marcadas com *LysoTracker* (vermelho). Sobreposição virtual das imagens (D, H, L e P). Barra de escala = 10  $\mu$ m. N=3



**Figura 4.11 Perfil representativo de colocalização das cepas BCG com vesículas acidificadas no tempo de 24 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Células THP-1 não infectadas (A-D) e infectadas por BCG Moreau (E-H), Pasteur (I-L) e Tokyo (M-P). Imunofluorescência detectando o núcleo (A, E, I e M), marcado com DAPI (azul); BCG Moreau (F), Pasteur (J) e Tokyo (N) marcados com *Live* (verde); vesículas acidificadas (C, G, K, O) marcadas com *LysoTracker* (vermelho). Sobreposição virtual das imagens (D, H, L e P). Barra de escala = 10  $\mu$ m. N=3

O gráfico 4.15 representa o percentual de bactérias que colocalizaram com vesículas acidificadas. Foram analisadas pelo menos 50 bactérias distribuídas em cinco campos aleatórios por experimento (Barker *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2004). No tempo de 6 horas observamos 45% das bactérias BCG Moreau colocalizadas com vesículas acidificadas, 56% de Pasteur e 34% de Tokyo. No tempo de 24 horas a porcentagem de colocalização para a cepa BCG Moreau diminuiu para 36%, na

cepa BCG Pasteur para 26% e permaneceu inalterado para a cepa BCG Tokyo (31%).



**Gráfico 4.15. Vesículas acidificadas colocalizadas com BCG Moreau, Pasteur e Tokyo nos tempos de 6 e 24 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Foram analisadas pelo menos 50 bactérias isoladas em cada condição. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,01$ . N=3

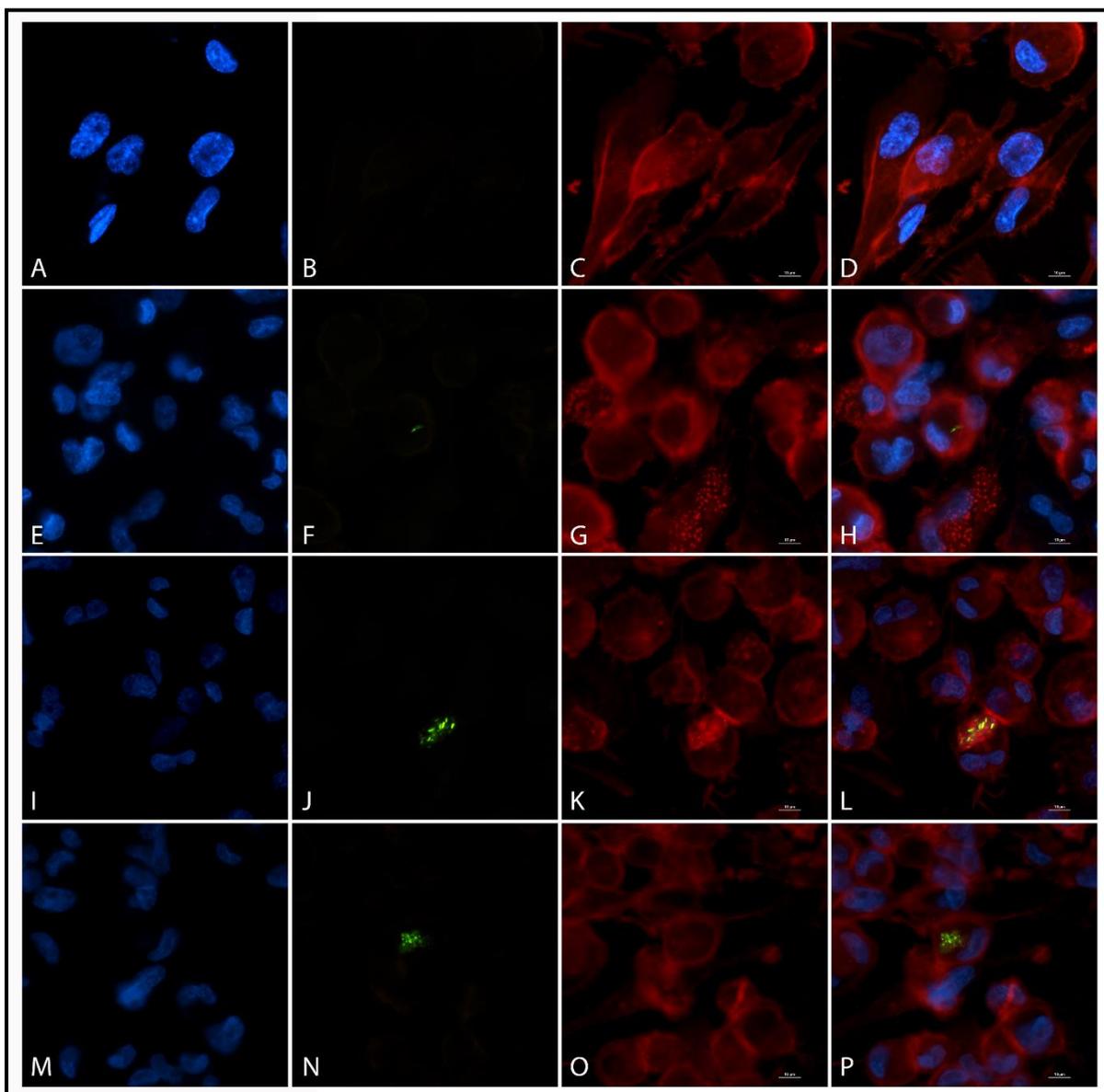
Podemos observar que entre o tempo de 6 e 24 horas a quantidade das bactérias viáveis de BCG Moreau aumenta, aproximadamente, 2,6 vezes e esse aumento reflete no aumento da quantidade de células infectadas. O aumento de bactérias viáveis associado ao aumento das células infectadas, faz com que proporcionalmente, a taxa de bactérias colocalizadas com vesículas acidificadas diminua, demonstrando que BCG Moreau consegue resistir a acidificação até 24 horas.

No caso de BCG Pasteur, observamos um evento oposto, com a maior taxa de colocalização com vesículas acidificadas no tempo de 6 horas e consequente queda na viabilidade bacteriana entre o período de 6 e 24 horas. Essa queda na viabilidade pode ser reflexo da taxa de colocalização com vesículas acidificadas.

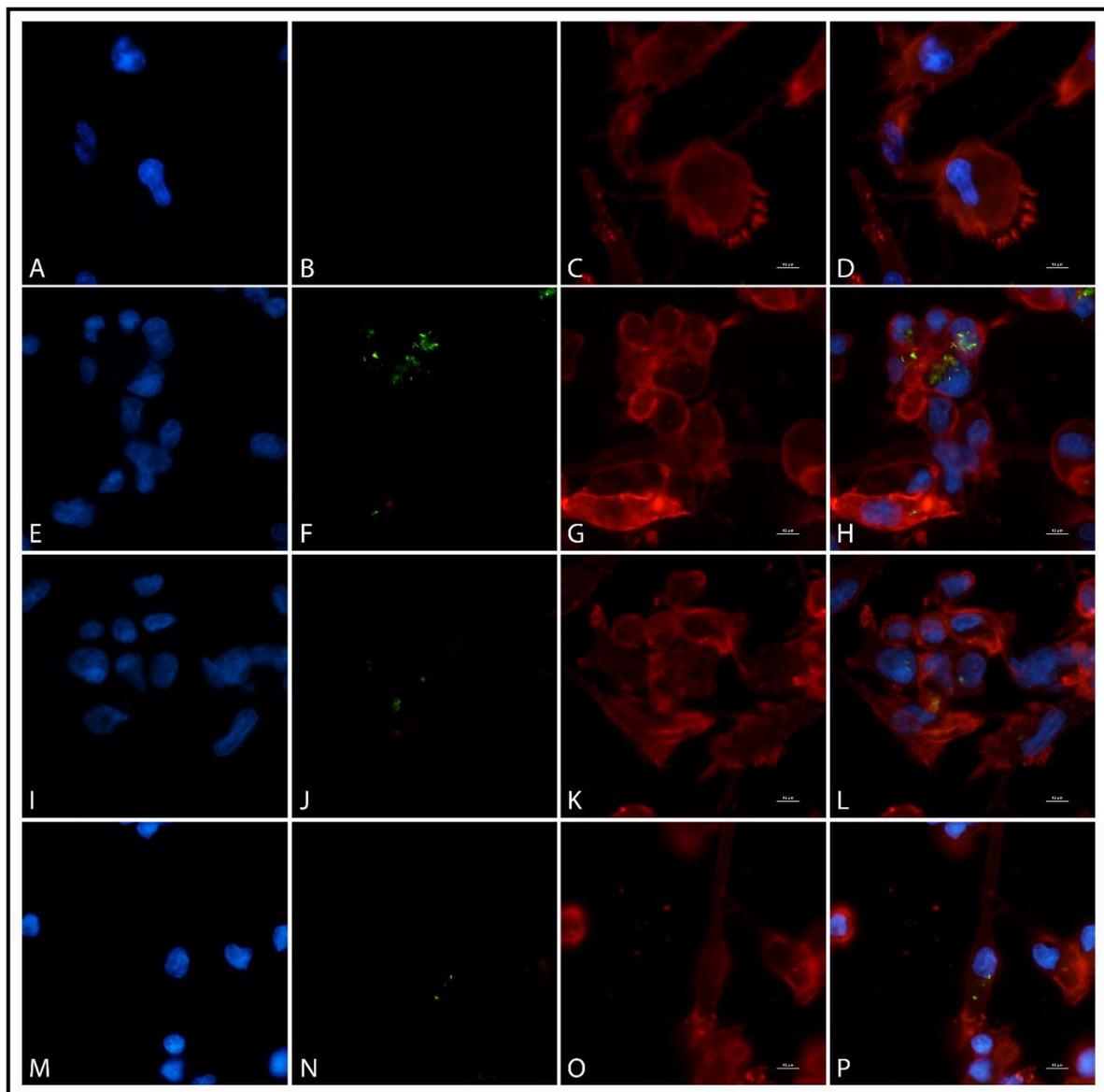
Nas células infectadas por BCG Tokyo, podemos observar que no período entre 6 e 24 horas não houve alteração no quantitativo bacteriano, bem como na quantidade de células infectadas e na quantidade de bactérias colocalizadas.

Para minimizar o problema da localização intracelular dos bacilos, foi realizada uma marcação para filamentos de actina através da faloidina e corados por rodamina, uma vez que a microscopia de fluorescência tradicional poderia deixar dúvidas. A faloidina interage fortemente com os filamentos de actina e essa

marcação é revelada através da molécula fluorescente rodamina. Desta forma, foi possível visualizar a rede formada por esses filamentos, formando o arcabouço da célula eucariótica e inferir a localização bacteriana. Como demonstrado nas figuras 4.12 e 4.13, nos tempos de 6 e 24 horas, respectivamente, os bacilos parecem estar de fato dentro dos macrófagos, corroborando com os dados de infecção obtidos anteriormente.



**Figura 4.12. Perfil representativo da organização dos filamentos de actina em células infectadas por BCG moreau, Pasteur e Tokyo no tempo de 6 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Células THP-1 não infectadas (A-D) e infectadas por BCG Moreau (E-H), Pasteur (I-L) e Tokyo (M-P). Imunofluorescência detectando o núcleo (A, E, I e M), marcado com DAPI (azul); BCG Moreau (F), Pasteur (J) e Tokyo (N) marcados com *Live* (verde); filamentos de actina marcados com rodamina faloidina (vermelho) (C, G, K, O). Sobreposição virtual das imagens (D, H, L e P). Barra de escala = 10  $\mu$ m. N=3



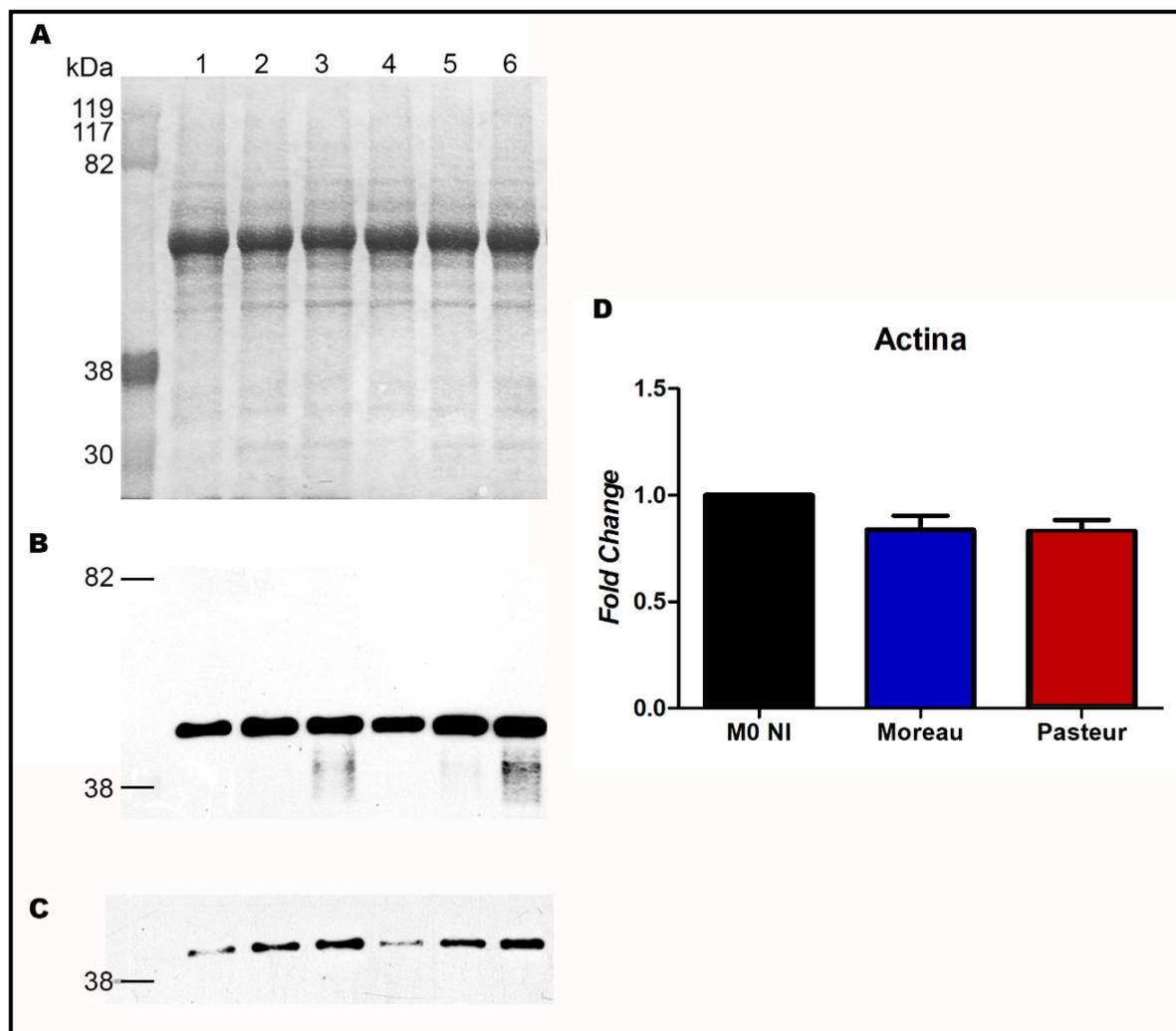
**Figura 4.13. Perfil representativo da organização dos filamentos de actina em células infectadas por BCG Moreau, Pasteur e Tokyo no tempo de 24 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Células THP-1 não infectadas (A-D) e infectadas por BCG Moreau (E-H), Pasteur (I-L) e Tokyo (M-P). Imunofluorescência detectando o núcleo (A, E, I e M), marcado com DAPI (azul); BCG Moreau (F), Pasteur (J) e Tokyo (N) marcados com *Live* (verde); filamentos de actina marcados com rodamina faloidina (vermelho) (C, G, K, O). Sobreposição virtual das imagens (D, H, L e P). Barra de escala = 10  $\mu$ m. N=3

Ao comparar o perfil de disposição do arcabouço dos filamentos de actina em 6 e 24 horas, foi possível constatar um desarranjo. A fim de compreendermos se esse desarranjo era provocado por uma modulação na expressão da actina, ou simplesmente uma alteração na disposição desses filamentos, foi realizado um experimento de *western blotting*.

A figura 4.14 mostra o perfil unidimensional de proteínas da fração intracelular de macrófagos não infectados e infectados por BCG Moreau e Pasteur após 24 horas de infecção. O gel SDS-PAGE (15%) foi transferido para membrana de nitrocelulose e corado com MemCode (Figura 4.14A). O resultado de *western blotting* (Figura 4.14 B e C) mostra o padrão de reconhecimento de anticorpos monoclonais contra as proteínas actina (Figura 4.14B D) e GAPDH (Figura 4.14 C). Estes resultados foram confirmados em duas replicatas biológicas.

As análises das imagens de *western blotting*, através do programa *Quantity One*, permitiram mensurar a intensidade de pixels referentes às bandas reconhecidas por cada anticorpo nas duas cepas (Figura 4.14 B e C). Calculamos então a razão (Actina/GAPDH) entre o valor da intensidade de pixels totais de cada banda, com a intenção de normalizar os valores obtidos (Figura 4.14 D).

Na figura 4.14D, podemos observar que não há uma aparente variação na expressão da actina, sugerindo que a infecção está causando uma provável alteração na organização dos filamentos de actina no tempo de 24 horas.



**Figura 4.14. Western blotting para avaliar a expressão das proteínas actina (B) e GAPDH (C) em macrófagos infectados por BCG (24h).** (A) Foram aplicadas 20 µg de proteínas totais por canal, proteínas intracelulares de macrófagos não infectados (canais 1 e 4), infectados por BCG Moreau (canais 2 e 5) e BCG Pasteur (canais 3 e 6). Foram resolvidas em géis SDS-PAGE 15%, transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com MemCode. Western blotting para avaliar a expressão intracelular das proteínas actina (B) e GAPDH (C) em macrófagos infectados por BCG.; marcador de peso molecular indicado à esquerda, em kDa. (D) Quantificação da análise de western blot relativa à expressão diferencial da proteína actina nos macrófagos infectados por BCG Moreau e Pasteur. Gráfico dos valores das médias e desvios. N=2.

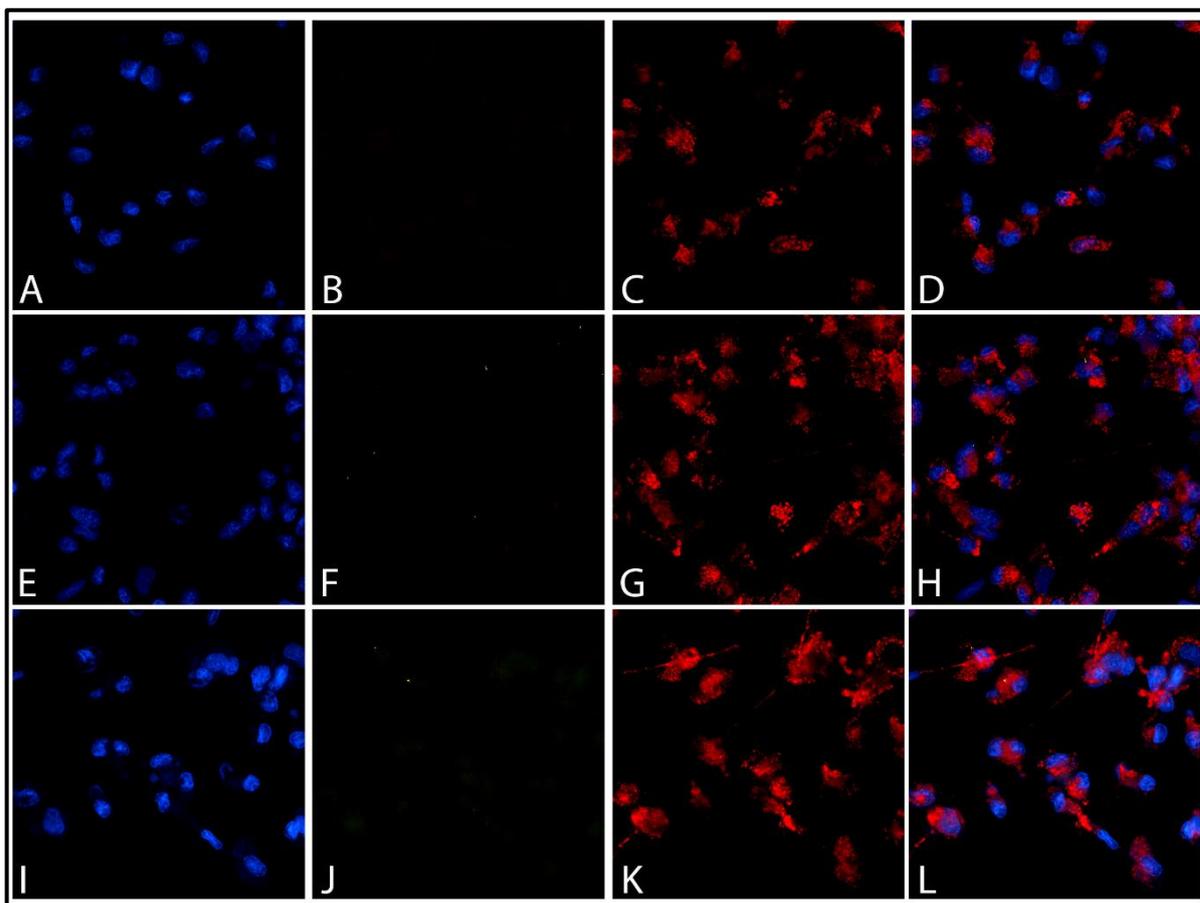
#### 4.13 – *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur induz a acumulação de corpúsculos lipídicos em macrófagos THP-1 no tempo de 24 horas

Diferentes espécies de micobactérias são capazes de induzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos nas células hospedeiras, dentre elas o *M. tuberculosis* (Russell *et al.*, 2009), *M. avium* (Caire-Brandli *et al.*, 2014) e *M. marinum* (Barisch & Soldati, 2017).

O acúmulo de corpúsculos lipídicos induzido pelas cepas de BCG Moreau e Pasteur foi avaliado através da coloração com *oil red o* (oro). O corante ORO tem

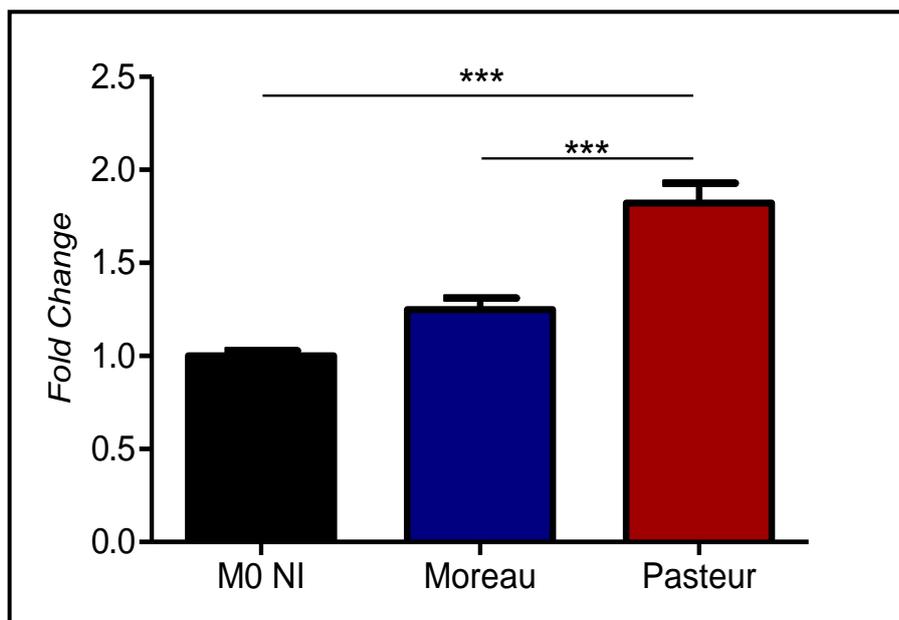
afinidade por lipídeos neutros e pode ser visualizado por microscopia de fluorescência ou campo claro (Koopman *et al.*, 2001).

Para isso, as bactérias foram marcadas previamente com o fluoróforo *Live* e utilizadas para infectar as células THP-1, os corpúsculos lipídicos marcados com oro e os núcleos das células eucarióticas com DAPI (Figura 4.17).



**Figura 4.15 Perfil representativo da presença de corpúsculo em células infectadas por BCG Moreau e Pasteur no tempo de 24 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Células THP-1 não infectadas (A-D) e infectadas por BCG Moreau (E-H) e Pasteur (I-L). Imunofluorescência detectando o núcleo (A, E, I e M), marcado com DAPI (azul); BCG Moreau (F) e Pasteur (J) marcados com Live (verde); corpúsculos lipídicos marcados com ORO (vermelho) (C, G, K). Sobreposição virtual das imagens (D, H e L). Barra de escala =50 µm. N=3

Foram analisadas no mínimo 250 células de cada condição estudada, em campos aleatórios. Foi possível observar um acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados por BCG Pasteur, aproximadamente, 2 vezes maior quando comparados aos macrófagos não infectados, um aumento discreto quando nas células infectadas por BCG Moreau, em torno de 1,3 vezes (Gráfico 4.16).



**Gráfico 4.16. Quantificação relativa de corpúsculo lipídico através da marcação com ORO nas células THP-1 infectadas por BCG Moreau e Pasteur no tempo de 24 horas.** Monócitos THP-1 foram diferenciados a macrófagos com 200 nM de PMA por 48 horas, com posterior descanso de 48 horas. Os macrófagos foram infectados com as cepas estudadas, utilizando a MOI de 10:1 por 4 horas. Foram analisadas pelo menos 250 células em cada condição. Teste ANOVA com pós teste Bonferroni \*\*\*  $p < 0,01$ . N=3

## 5. Discussão

A proposta principal deste trabalho foi avaliar o perfil de comportamento da cepa BCG Moreau, comparado às cepas BCG Pasteur e, eventualmente, a cepa Tokyo, frente ao ambiente intracelular de macrófagos.

A caracterização inicial das diferentes cepas em estudo a partir de cultivos em meio axênico revela poucas diferenças fenotípicas entre elas. Os dados obtidos mostram que os bacilos possuem tamanhos médios diferentes, mas um perfil de morfologia de colônias similar, com exceção da cepa BCG Tokyo, que apresenta duas morfologias.

A cepa BCG Tokyo possui duas subpopulações gerando colônias lisas (tipo I) e rugosas (tipo II). Essa diferença morfológica foi relacionada, inicialmente, com uma deleção de 22 pb no gene *rv3405c*. Colônias do tipo I possuíam a deleção enquanto a do tipo II não (Bedwell *et al.*, 2001). Essa observação foi confirmada por Naka e colaboradores, que mostraram também a diferença no perfil lipídico entre estas subcepas. As colônias do tipo II não expressam PGL/PDIM, devido a uma mutação no gene *ppsA*, enquanto no tipo I esses lipídeos foram observados (Naka *et al.*, 2011). No entanto, ainda não foi claramente determinado qual é o evento responsável pelas diferenças fenotípicas observadas, ou se seria um conjunto de eventos.

A análise da viabilidade bacteriana demonstra que a maior parte da população dos lotes-semente preparados está viável, cerca de 90%, visto que bactérias mortas poderiam influenciar na análise de colocalização com vesículas acidificadas. *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG viáveis residem em fagossomas que resistem à acidificação, são menos maduros e menos fusogênicos com lisossomas quando comparados a partículas inertes (Via *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 2005; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994).

A padronização do protocolo de indução de diferenciação dos monócitos THP-1 a macrófagos foi realizada com base em um levantamento bibliográfico, que continha artigos publicados entre os anos de 2009-2014. Foi possível constatar que não há um consenso na literatura quanto à concentração de uso do PMA, bem como o tempo de exposição a esse composto. A primeira análise realizada foi relativa à morfologia das células diferenciadas a partir dos três protocolos detalhados anteriormente, em Resultados. A morfologia de macrófagos diferenciados é

caracterizada pela redução da razão entre núcleo e citoplasma, devido ao aumento do volume citoplasmático, bem como o aumento do tamanho de projeções citoplasmáticas (Sokol *et al.*, 1987). A partir dos ensaios dos diferentes protocolos de indução foi possível constatar que não há necessariamente uma correlação direta entre o aumento da concentração de indutor e a maior quantidade de células diferenciadas, comparando os protocolos utilizando 30 nM PMA com indução de 48 horas e 80 nM com indução de 24 horas. Além da concentração do indutor, o tempo de contato com as células pode ser crítico, uma vez que o tempo de 48 horas utilizado no protocolo de 30 nM PMA foi mais eficiente em diferenciar as células THP-1 do que o tempo de 24 horas utilizado no protocolo de 80 nM PMA.

A quantidade de células com morfologia compatível a macrófagos obtida ao final do protocolo utilizando 200 nM PMA foi maior do que com o protocolo de 30 nM PMA. Esse fato pode ter ocorrido devido às lavagens realizadas para a retirada do indutor. As células que foram submetidas ao protocolo de 30 nM PMA que não haviam iniciado o processo de diferenciação, não estavam aderidas e foram perdidas ao longo do processo, uma vez que a capacidade de diferenciação de monócito para macrófago em estágio terminal de diferenciação está relacionada com a capacidade de adesão (Spano *et al.*, 2007).

Apesar do resultado promissor obtido com o protocolo de 30 nM, optamos por excluí-lo. A diferenciação das células com 30 nM de PMA por 72 horas leva a uma significativa fração de população celular com níveis intermediários de diferenciação, transição entre monócito e macrófago, formando uma cultura heterogênea. Como descrito na literatura, essa cultura após a retirada do indutor e o descanso em meio suplementado com soro fetal bovino torna-se capaz de se desenvolver tanto em macrófagos quanto em células dendríticas (Spano *et al.*, 2013).

A questão do tempo de repouso antes da infecção após a indução com PMA foi levada em consideração para a avaliação do protocolo mais adequado ao estudo proposto, uma vez que células submetidas a um protocolo de 200 nM PMA por 72 horas sem tempo de recuperação, possuíam um fenótipo parecido com o monócito inicial (Daigneault *et al.*, 2010).

Levando em consideração a questão do repouso e da concentração da droga, prosseguimos com o protocolo de 80 nM PMA por 24 horas, agora com 24 horas de repouso, e de 200 nM PMA por 48 horas e 48 horas de descanso. Isso porque, concentrações iguais ou acima de 60 nM são descritas como sendo suficientes para

induzir a diferenciação terminal de macrófagos na linhagem de células THP-1 (Kohro *et al.*, 2004; Traore *et al.*, 2005).

Além das mudanças morfológicas, a diferenciação também é marcada pelo aumento de granulosidade das células (McCullough *et al.*, 1999). Essa granulosidade é proveniente do aumento do número de organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e lisossomos (Cohn *et al.*, 1996; Daigneault *et al.*, 2010). A marcação realizada para vesículas acidificadas mostrou que o protocolo de 200 nM PMA é mais eficiente em induzir a formação dessas vesículas. Comparando os dados obtidos com os descritos por Daigneault e colaboradores, o perfil de vesícula acidificada do protocolo de 80 nM foi próximo ao obtido em monócito sem diferenciação, enquanto que os macrófagos estimulados com 200 nM apresentaram um perfil compatível aos macrófagos derivados de medula (Daigneault *et al.*, 2010). Afim de melhorar o protocolo de 80 nM PMA, aumentamos o tempo de exposição também para 48 horas, com posterior descanso de 48 horas.

Devido às concentrações utilizadas nos protocolos testados anteriormente, 80 nM e 200 nM, foi necessário investigar a viabilidade dessas células diferenciadas. Segundo Spano e colaboradores a retirada do PMA e a recuperação em meio completo levaria à apoptose celular, evento relacionado positivamente com a concentração do indutor. Experimentos utilizando 6 nM, 30 nM e 60 nM PMA por 72 horas, com repouso de 72 horas, mostraram que a maior concentração do indutor está relacionada com a maior incidência de apoptose das células (Spano *et al.*, 2013).

Entretanto Daigneault e colaboradores utilizando o protocolo de indução de 200 nM por 72 horas com posterior 5 dias de repouso observaram uma regulação positiva na proteína anti-apoptótica Mcl-1 e uma resistência ao estímulo apoptótico em células THP-1 diferenciadas (Daigneault *et al.*, 2010). A proteína Mcl-1 é um regulador da resistência a apoptose e sua expressão varia dependendo do nível de diferenciação do macrófago (Liu *et al.*, 2001). Com isso, macrófagos derivados de medula seriam menos susceptíveis aos mesmos estímulos que induzem a apoptose em monócitos (Liu *et al.*, 2001; Munn *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos através dos ensaios com resazurina apontam que não há diferença na viabilidade celular após o uso do PMA nas concentrações de 80 nM a 200 nM e que a viabilidade das células é de cerca de 90% em todos os casos. Esses dados são corroborados pelo já descrito por Daigneault e colaboradores, onde foi

observado que a fragmentação de ácidos nucleicos de células diferenciadas com 200 nM PMA é similar à de macrófagos derivados de medula e macrófagos THP-1, sendo equivalente a cerca de 10 %. Quando essas células são induzidas ao mecanismo de apoptose, essa fragmentação aumenta para 60% em monócitos THP-1 e de 15%-20% em macrófagos diferenciados por PMA e derivados de medula, confirmando a resistência de macrófagos em estágio terminal de diferenciação ao estímulo a apoptose (Daigneault *et al.*, 2010).

Um outro parâmetro que poderia ser considerado para comprovar a diferenciação de monócitos a macrófagos THP-1 seria a expressão de receptores celulares. Daigneault e colaboradores utilizou como marcadores os receptores CD14 e TLR2, típicos de monócitos, mas pouco expressos em macrófagos. A partir dessa análise, pode-se observar que os receptores CD14 e TLR2 são menos expressos em macrófagos THP-1 diferenciados com PMA quando comparados com monócitos THP-1 e que não há diferença de expressão dos receptores nas células THP-1 diferenciadas com PMA quando comparados ao grupo MDM (Daigneault *et al.*, 2010)

Mediante todos os dados analisados ao longo da padronização da diferenciação das células THP-1 optamos por utilizar o protocolo de 200 nM para a realização dos experimentos de infecção, uma vez que esse protocolo foi satisfatório quando avaliamos as mudanças morfológicas, aumento do número de vesículas acidificadas e a taxa de viabilidade celular nas concentrações entre 80 nM – 200 nM PMA.

Os experimentos de infecção foram realizados com monócitos diferenciados com 200 nM PMA durante 48 horas, com posterior 48 horas de repouso. Após esse tempo, os macrófagos foram infectados com as cepas em estudo, BCG Moreau, Pasteur e Tokyo, durante 4 horas. A curva de viabilidade bacteriana de cada cepa aponta uma queda na viabilidade de BCG Moreau e Tokyo nas primeiras 6 horas de infecção, tendendo ao aumento ao longo dos tempos avaliados, diferentemente de Pasteur. BCG Pasteur apresenta queda na viabilidade apenas no tempo de 24 horas e a sua viabilidade tende a permanecer constante ao longo da cinética.

Quando comparamos a quantidade de bactérias intracelulares de cada cepa no respectivo tempo, podemos observar que o número de bacilos da cepa BCG Moreau é o maior entre as cepas estudadas. No tempo de 6 horas não observamos diferença entre a cepa BCG Moreau e a cepa Pasteur. Mas nos demais tempos,

observamos diferenças significativas entre as quantidades de bacilos intracelulares da cepa BCG Moreau, quando comparada as cepas Pasteur e Tokyo. Já a quantidade bacteriana de BCG Pasteur e Tokyo é diferente apenas nos tempos de 4 e 6 horas, mas tende a um número similar ao longo dos tempos observados. Essa queda inicial observada em BCG Moreau e Tokyo no tempo de 6 horas e em BCG Pasteur em 24 horas, pode ser um reflexo do padrão de adaptação das cepas frente ao estresse intracelular.

A comparação do crescimento intracelular entre *M. bovis* e BCG Pasteur em macrófagos J774 mostrou que ambas as cepas são rapidamente mortas até 1 dia (*M. bovis*) ou 3 dias (BCG Pasteur). No entanto, *M. bovis* é capaz de reverter para uma fase de crescimento, enquanto o BCG Pasteur mantém níveis constantes de bactérias vivas por células até o sétimo dia de infecção. Esse processo que visa eliminar as bactérias em macrófagos ocorreria em dois momentos: o primeiro relacionado com a diminuição do pH e os processos dependentes de espécies reativas de nitrogênio; e o segundo seria independente de ambos (Jordao *et al.*, 2008).

A cinética observada por Jordao e colaboradores, comparando *M. bovis* e BCG Pasteur, reflete parcialmente o que observamos no modelo de células THP-1, em que detectamos uma diminuição na viabilidade em BCG Moreau e Tokyo primeiro do que na cepa BCG Pasteur. Após a queda na viabilidade, BCG Moreau e Tokyo recuperam o crescimento enquanto que BCG Pasteur mantém o número de bacilos intracelulares praticamente estável até o final da cinética estudada. Esse fenômeno pode ser reflexo da “genealogia” da vacina BCG, visto que as cepas BCG Moreau e Tokyo são mais próximas geneticamente do BCG original, e por consequência de *M. bovis* (Kernodle, 2010).

Além disso, o aumento da produção de antioxidantes foi observado com a evolução *in vitro* das cepas filhas e inclui duplicação de algumas regiões no genoma (Brosch *et al.*, 2007). A razão pela qual esse fenômeno acontece ainda é desconhecida, mas uma possível explicação reside no fato de que os antioxidantes são capazes de melhorar o crescimento micobacteriano *in vitro* devido a detoxificação de produtos gerados pelo metabolismo aeróbico (Sadagopal *et al.*, 2007). Apesar de serem cepas vacinais obtidas a partir da atenuação do *M. bovis*, estudos demonstram que há diferença na proteção contra a tuberculose pulmonar (Kernodle, 2010) e essa diferença de proteção vem sendo relacionada a supressão

do sistema imune devido a secreção de antioxidantes micobacterianos (Sadagopal *et al.*, 2007). Com isso, cepas mais primitivas, como BCG Moreau e Tokyo produziram menos antioxidantes, seriam mais susceptíveis ao estresse intracelular e estariam sensibilizando mais o sistema imune, do que a cepa BCG Pasteur, uma cepa mais recente (Kernodle *et al.*, 2010).

Dessa forma, as cepas BCG Moreau e Tokyo passariam por uma fase de adaptação ao estresse mais precoce do que a cepa BCG Pasteur, possibilitando o aumento da quantidade de bactérias ao longo da cinética.

Além da curva de viabilidade intracelular das cepas, foi possível observar mudanças no perfil morfológico das colônias oriundas das bactérias após passagem nos macrófagos. Tanto a cepa BCG Moreau quanto a cepa BCG Pasteur apresentaram mudanças morfológicas desde o tempo de 4 horas de infecção. No entanto, o padrão original de morfologia foi restaurado na cepa BCG Moreau já a partir de 6 horas, com algumas poucas colônias lisas. No caso de BCG Pasteur, o padrão não foi restabelecido no período de estudo (até 96 h). Como a cepa BCG Tokyo já apresenta dois tipos de morfologia de colônia essa avaliação fica prejudicada, mas foi possível observar que no tempo de 4 e 6 horas as colônias são predominantemente lisas e a partir do tempo de 24 horas já podemos detectar a presença das duas morfologias.

A mudança morfológica observada das colônias provavelmente ocorreu devido a alterações na composição lipídica da parede micobacteriana, como forma de plasticidade adaptativa ao ambiente intracelular. A alteração dos componentes da parede celular pode modificar as propriedades da superfície da célula, alterando as interações célula-célula, resultando em diferentes morfologias de colônia (Alexander *et al.*, 2004).

Em diferentes espécies de micobactérias foram encontradas colônias lisas variantes das clássicas colônias rugosas. As colônias lisas, em geral, apresentam um fenótipo menos virulento em modelo murino, com deficiência na formação de biofilme e perda de diferentes lipídeos, que são encontrados na cepa parental (Hunter *et al.*, 2006).

Em *M. tb* virulento cultivado em ágar sólido pode-se observar colônias de espalhamento irregular com superfície altamente texturizada (fenótipo rugoso), enquanto que culturas de *M. tb* atenuado geralmente apresentam colônias com superfície lisas (Darzins & Fahr, 1956).

A alteração morfológica das colônias observada após a passagem em macrófagos já foi relatada para a cepa de *M. tb* H37Rv. O fenótipo de colônia lisa da cepa H37Rv foi detectado apenas após a infecção em macrófagos derivados de monócitos (MDM), mas não havia sido observado em cultura de meio axênico (Giovannini *et al.*, 2012). Esse padrão de colônia lisa em meio sólido é relacionado a microorganismos atenuados, que crescem em meio líquido sem fazer biofilme na superfície (Hunter *et al.*, 2006), e seria resultado da privação de nutrientes e do estresse oxidativo, caracterizando a sobrevivência dentro dos macrófagos ativados (Jacob *et al.*, 2004).

Tanto os dados de viabilidade quanto de morfologia de colônia, indicam que BCG Moreau e Tokyo sofrem um período de adaptação nos tempos iniciais de infecção e que se recuperam ao longo da cinética, com a morfologia voltando ao normal concomitante ao aumento na quantidade de bacilos. Já na cepa BCG Pasteur a viabilidade praticamente não é alterada ao longo dos tempos de infecção e a morfologia não se restaura, corroborando com a ideia de que cepa BCG Pasteur nos tempos avaliados ainda está passando por uma fase de adaptação ou utilizando uma estratégia alternativa para sobreviver e resistir dentro do macrófago.

A alteração da composição lipídica da parede celular e redução da multiplicação bacteriana, para que permaneça indetectável ao sistema imune do hospedeiro, podem ser consideradas estratégias adaptativas do *M. tb* para sobreviver ao ambiente adverso intrafagossomal. Dessa forma, o fenótipo característico da colônia lisa de *M. tb* H37Rv seria menos virulento, formando uma população de bacilos intracelulares heterogênea, alcançando uma coexistência duradoura com o hospedeiro humano, que teria seu sistema imunológico ativado mais fracamente, até que condições favoráveis fossem retomadas (Giovannini *et al.*, 2012).

Além das diferenças morfológicas e de viabilidade intracelular, foi possível observar uma taxa de internalização distinta para as cepas BCG Moreau e Pasteur, que poderia ser reflexo da composição lipídica da parede. Esta poderia estar influenciando a formação de aglomerados bacterianos, dificultando a fagocitose

As colônias de H37Rv rugosas e lisas são constituídas por bactérias que possuem composição lipídica qualitativamente similar, mas a quantidade de cada componente lipídico difere, resultando em morfologia de colônia distinta. Com isso, a taxa de fagocitose inicial comparativa entre bactérias provenientes dos dois

morfotipos de colônias de H37Rv foi significativamente maior para os bacilos provenientes da colônia lisa. Essa maior fagocitose pode estar relacionada a ausência de aglomerados micobacterianos na população lisa, favorecendo o englobamento (Giovannini *et al.*, 2012).

Bactérias oriundas de colônias lisas de H37Rv expressariam menos PDIM e super expressariam triacilglicerol (TAG) em sua parede. A repressão de um novo *operon* relacionado a biossíntese de PDIM (Rv0096-Rv0101) foi relatada para o crescimento de *M. tb* em meio sintético, dentre eles o meio líquido 7H9, mas é constantemente induzido pelo crescimento em meio Sauton (Giovannini *et al.*, 2012). As cepas BCG Moreau, Japão e Glaxo são naturalmente deficientes na produção de PDIM e PGLs, entretanto as demais cepas, incluindo BCG Pasteur produzem níveis abundantes de PDIMs e PGLs (Chen *et al.*, 2007).

A fim de compreendermos a resposta ao estresse e a adaptação das cepas ao ambiente intracelular, avaliamos a expressão da proteína HspX. A proteína HspX é membro da família  $\alpha$ -cristalina de resposta a choque térmico ( *$\alpha$ -crystallin-like heat shock protein -  $\alpha$ -HSP*) (de Jong *et al.*, 1998). Possui função de chaperona, prevenindo a agregação de outras proteínas em resposta à temperatura (Chang *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1996). Também foi relacionada ao espessamento da parede celular na fase estacionária tardia de crescimento (Cunningham & Spreadbury; 1998) e ao estágio de latência *in vivo*, por ser um antígeno imunodominante produzido por *M. tb* durante essa fase. Essa proteína corresponde a 25% do total de proteínas expressas durante o crescimento de *M. tb* de forma estática ou sob a privação de oxigênio, ambos os modelos usados para simular o ambiente de latência *in vitro* (Yuan *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1998). Além de ser um marcador de estresse sofrido pela bactéria, vem sendo estudada como possível alvo para desenvolvimento de vacinas de subunidade (Taylor *et al.*, 2012).

Dentro do contexto de latência, o papel proposto para a proteína HspX é o de estabilizar estruturas celulares (Cunningham & Spreadbury; 1998) e outras proteínas (Yuan *et al.*, 1996), auxiliando o bacilo a sobreviver por um longo tempo nessa condição. A presença da proteína HspX em culturas sob hipóxia foi confirmada por Majumdar e colaboradores (Majumdar *et al.*, 2012). Nas culturas aeradas de *M. tb* não foi possível detectar a proteína HspX através de western blotting. Contudo, em culturas sob hipóxia, a proteína foi detectada, mostrando a regulação positiva do *regulon* DevR, responsável pela resposta à hipóxia (Majumdar *et al.*, 2012).

A proteína HspX foi detectada na cepa BCG Moreau e Tokyo a partir do tempo de 24 horas enquanto que na cepa BCG Pasteur foi possível detectar essa proteína já em 6 horas de infecção. Isso indica indução do *operon* em momentos distintos, a expressão na cepa BCG Pasteur parece acontecer de forma gradativa, enquanto nas demais cepas a expressão se mantém similar.

A abertura do *regulon* em tempos iniciais em BCG Pasteur parece corroborar com a hipótese de estratégia alternativa para sobreviver e resistir dentro do macrófago, uma vez que a abertura do *operon* de latência e diminuição do crescimento bacteriano, proporcionaria a sobrevivência do bacilo a longo prazo até que fosse possível condições mais favoráveis à replicação e a ativação do metabolismo.

De forma complementar, a viabilidade dos macrófagos THP-1 frente à infecção com as diferentes cepas de BCG também foi avaliada. Foi possível observar que não há uma diferença significativa na viabilidade das células hospedeiras frente à infecção com as três cepas nos diferentes tempos avaliados, com exceção do tempo de 48 horas, em que houve uma redução na viabilidade dos macrófagos infectados com a cepa BCG Pasteur. As células THP-1 apresentam viabilidade de cerca de 90% ao longo de toda a cinética avaliada. Esse dado é corroborado por Molina-Torres e colaboradores que constataram que a toxicidade de BCG Pasteur em células THP-1 não é detectada até o sétimo dia, enquanto que cepas de *M. tb* apresentam um efeito citotóxico de 70% (Molina-Torres *et al.*, 2010). A diferença observada no tempo de 48 horas poderia ser reflexo da expressão de um fator ou citocina que influenciaria na viabilidade do macrófago.

Os macrófagos alveolares humanos podem responder a infecção intracelular de patógenos micobacterianos através da apoptose (Keane *et al.*, 2000). Essa resposta é dependente de TNF e necessita de um estímulo, visto que as células não ativadas não são sensíveis a citotoxicidade de TNF. A apoptose estimulada pela infecção pode ser um mecanismo do sistema imune contra esse quadro, no entanto cepas virulentas de micobactérias patogênicas conseguem evadir esse mecanismo (Keane *et al.*, 1997; Keane *et al.*, 2000). Células THP-1 diferenciadas a macrófagos sofrem apoptose em resposta a infecção com BCG, sendo esse efeito dose dependente. Cepas avirulentas (BCG e *M. tuberculosis* H37Ra) induzem altos níveis de apoptose quando comparadas às cepas virulentas (*M. bovis* e *M. tuberculosis* H37Rv). Além disso, a apoptose aumentada das células THP-1 está relacionada à diminuição da viabilidade intracelular de BCG, demonstrando que as células THP-1 são um modelo

válido para o estudo da apoptose em macrófagos induzida por *M. tuberculosis* (Riendeau e Kornfeld, 2003).

A diminuição da viabilidade dos macrófagos infectados por BCG Pasteur, juntamente com o controle da quantidade de bacilos intracelulares sugere que as células podem estar sofrendo apoptose como forma de conter a expansão bacteriana.

O efeito observado no tempo de 48 horas nas células infectadas com BCG Pasteur pode ser decorrente da secreção de citocinas nesse ponto, ou no tempo anterior.

A primeira citocina avaliada foi a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) que controla a carga bacteriana através do recrutamento de efetores microbianos (Jayaraman *et al.*, 2013). Os experimentos de CBA e ELISA apontam um aumento de expressão da citocina IL-1 $\beta$  em 6 horas de infecção, atingindo o pico em 24 horas, com tendência a expressão normalizada a níveis similares aos macrófagos não infectados nos demais tempos. Esse pico de expressão de 24 horas, pode levar a indução de efetores antimicrobianos, como TNF, afim de conter a infecção. O TNF então dispararia o mecanismo de apoptose, o que levaria a uma diminuição na viabilidade nos macrófagos e bacilos.

Essa diminuição de viabilidade do macrófago foi observada no tempo de 48 horas em células infectadas pela cepa BCG Pasteur. Além disso, temos uma manutenção na quantidade bacilar intracelular da mesma cepa, sugerindo possivelmente que o mecanismo microbicida disparado por IL-1 $\beta$  estaria afetando a viabilidade da cepa BCG Pasteur. No entanto, nas cepas BCG Moreau e Tokyo, esse aumento de expressão da citocina IL-1 $\beta$  é menor, talvez insuficiente para gerar uma resposta na mesma proporção da observada em BCG Pasteur. Por isso, a viabilidade dos macrófagos é maior do que comparada às células infectadas por BCG Pasteur, bem como a quantidade de bacilos intracelulares das cepas BCG Moreau e Tokyo, que continuam aumentando ao longo dos tempos observados.

No entanto, não podemos atribuir o quadro de apoptose e controle de carga bacteriana observado à secreção da citocina TNF- $\alpha$ , induzida por IL-1  $\beta$ , uma vez que não observamos um aumento significativo da secreção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos infectados por BCG Pasteur. Com isso, o controle de carga bacteriana pode estar relacionado ao aumento da secreção de IL-1  $\beta$ , mas sem relação

conjunta com a secreção de TNF, e a redução da viabilidade dos macrófagos estaria ocorrendo mediada por outro mecanismo, que não a apoptose disparada por TNF.

O aumento da secreção da citocina IL-1 $\beta$  pode estar correlacionado com a ativação da via de inflamossoma. A citocina IL-1  $\beta$  é sintetizada como pró-IL-1  $\beta$  inativa e necessita ser convertida a sua forma ativa pela caspase-1 para ser secretada. A caspase 1 é ativada através das diferentes proteínas do complexo que formam o inflamossoma. A ativação da via de inflamossoma, seguida do aumento da secreção da citocina IL-1  $\beta$  pode estar favorecendo o processo de morte celular por piroptose (Huante *et al.*, 2017).

O aumento da secreção da citocina MCP-1 (CCL2) observado em macrófagos infectados por BCG Pasteur no tempo de 48 horas pode estar refletindo o aumento da resposta imune contra a infecção micobacteriana. A indução da secreção das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 já foi observada em macrófagos obtidos de PBMC e na linhagem THP-1 quando infectados por BCG (Luo *et al.*, 2007; Méndez-Sampaio *et al.*, 2010).

A infecção por *M. bovis* BCG induz a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas pela NADPH oxidase. O acúmulo de ROS tem papel importante como molécula sinalizadora na regulação da secreção da quimiocina CCL2, contribuindo para a resposta molecular na sinalização do processo inflamatório (Méndez-Sampaio *et al.*, 2010). Assim, de forma análoga, poderíamos inferir que a cepa BCG Pasteur estaria induzindo uma maior formação de espécies reativas de oxigênio, que estariam sendo neutralizadas devido à maior produção de antioxidante nessa cepa, quando comparadas às cepas mais primitivas.

As demais citocinas (TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10) foram avaliadas pelo método CBA e esses resultados precisam ser confirmadas em mais replicatas biológicas. No entanto, os dados consistentes obtidos a partir das duas replicatas biológicas independentes nos permitem inferir comportamentos diferentes dos macrófagos frente à infecção com as cepas estudadas.

A cepa BCG Moreau induziu uma maior secreção da citocina TNF- $\alpha$  quando comparada às demais cepas, no tempo de 6 horas. A citocina TNF-  $\alpha$  foi relatada como indutor da apoptose em células THP-1 e estaria relacionada com a diminuição da viabilidade intracelular em BCG (Riendeau e Kornfeld, 2003). No entanto, sua secreção também foi diretamente correlacionada com virulência e viabilidade intracelular (Engele *et al.*, 2002), promovendo o crescimento de *M. tb* em monócitos

(Byrd, 1997). Componentes micobacterianos aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , em macrófagos/monócitos e esse nível elevado é apontado como causa para a persistência e virulência micobacteriana dentro do macrófago humano (Kim *et al.*, 2011).

O aumento inicial da secreção de TNF-  $\alpha$  por macrófagos infectados por BCG Moreau, juntamente com a cinética de viabilidade intracelular bacteriana reforça a hipótese da relação entre a expressão dessa citocina e características bacterianas de virulência e viabilidade, uma vez que podemos observar a manutenção da viabilidade, bem como o crescimento intracelular ao longo dos tempos observados da cepa BCG Moreau.

As cepas BCG Moreau e Pasteur parecem estimular a secreção da citocina MIP-1 $\beta$  nos tempos de 6 e 24 horas. A cepa BCG Moreau parece induzir uma maior secreção de MIP-1 $\beta$  no tempo de 6 horas e com pico em 24 horas, sendo discrepante das demais cepas. Esse aumento da secreção pode estar sendo reflexo do pico de secreção da citocina TNF, induzida pela cepa BCG Moreau, no tempo de 6 horas. Isso porque, a secreção de MIP-1 $\beta$  já foi relatada como sendo induzida pelo TNF (Maurer & von Stebut, 2004).

Pacientes infectados por *M. tb* apresentam em seu fluido do lavado broncoalveolar uma expressão predominante de MIP-1 $\beta$  (Ashenafi *et al.*, 2014), sendo associada significativamente com o aumento da susceptibilidade à TB (Jamieson *et al.*, 2004), indicando seu papel imunorregulador.

Quanto à secreção das citocinas IL-6 e IL-8 não foi possível avaliar nenhuma diferença significativa entre os macrófagos infectados com as cepas estudadas. Isso porque obtivemos resultados de apenas 2 replicatas biológicas para essas citocinas através da metodologia de CBA.

Nas células infectadas com as cepas de BCG observamos uma tendência de aumento na secreção da citocina IL-6 no tempo de 6 horas, com maior detecção em 24 horas. Ressaltando um aumento provocado cepa BCG Moreau, em comparação às demais cepas, no tempo de 6 horas. Enquanto que para citocina IL-8 não foi possível observar nenhuma modulação em relação a sua secreção provocada pela infecção com as cepas de BCG.

A citocina IL-6 é conhecida por estimular a secreção de INF- $\gamma$ , uma citocina essencial para a ativação dos macrófagos infectados por *M. tb* (Henrique *et al.*, 2013). Além disso, pacientes com TB ativa possuem níveis séricos aumentados para

essa citocina (Djoba Siawaya *et al.*, 2009), indicando a relevância de IL-6 no diagnóstico de TB (Namuganga *et al.*, 2017; Jacobs *et al.*, 2016; Phalane *et al.*, 2013).

A secreção da citocina IL-8 vem sendo destacada como um potencial biomarcador para diferenciar TB ativa e latente (Yao *et al.*, 2017). Dessa forma, a não modulação da IL-8 frente a infecção pelas cepas BCG seria uma vantagem ao uso dessa citocina como marcador para diagnosticar TB, sendo esta ativa ou latente.

As análises por fluorescência demonstraram que o percentual de células infectadas com a cepa BCG Moreau é maior do que com as demais cepas nos tempos de 6 e 24 horas. Esse resultado já era esperado, uma vez que a cinética de viabilidade apontou que a cepa BCG Moreau foi capaz de infectar mais células do que as demais, refletindo numa maior quantidade de bacilos intracelulares. A diferença observada entre BCG Pasteur e Tokyo pode estar relacionada com a quantidade de bacilo por célula infectada. Apesar do número de bactérias intracelulares de BCG Tokyo no tempo de 6 horas ser inferior ao observado para a cepa Pasteur, podemos ter uma quantidade maior de bacilos da cepa Pasteur infectando uma mesma célula. Desta forma, teríamos mais células infectadas pela cepa BCG Tokyo e mais bacilos por célula infectada pelo BCG Pasteur. Esse fato é corroborado com o tempo de 24 horas, em que a quantidade intracelular das cepas BCG Pasteur e Tokyo não apresenta uma diferença significativa e o percentual de células infectadas também.

A cepa BCG Tokyo apresenta a mesma porcentagem de bactérias colocalizadas com vesículas acidificadas nos tempos de 6 e 24 horas, enquanto que a cepa Pasteur possui a maior porcentagem de bacilos colocalizados no tempo de 6 horas, situação que se inverte no tempo de 24 horas.

A maior taxa de colocalização das células infectadas por BCG Pasteur em 6 horas sugere que esses bacilos não estão conseguindo evadir de forma satisfatória os mecanismos microbicidas e que provavelmente serão eliminados. Essa diminuição da quantidade de bactérias da cepa Pasteur foi verificada no tempo de 24 horas na cinética de crescimento da bactéria. As cepas BCG Moreau e Tokyo no tempo de 24 horas apresentam taxa de colocalização similar.

A sobrevivência de micobactérias patogênicas dentro de fagossoma baseia-se na capacidade da bactéria de controlar a maturação fagossomal diferentemente das não patogênicas. Ensaios com células J774 infectadas com BCG Pasteur por 3

horas apresentam cerca de 40% dos bacilos colocalizados com vesículas acidificadas e a curva de viabilidade do bacilo intracelular com diminuição na quantidade bacilar no tempo de 24 horas (Butler *et al.*, 2010), corroborando com os dados obtidos.

A marcação realizada para actina com rodamina-faloidina foi mais um indício de que as bactérias de fato estariam internalizadas. Também possibilitou constatar mais uma mudança estrutural que indica a diferenciação de macrófagos, a formação de pseudopodos. Na figura 4.14G foi possível observar um grupo de marcação para actina formando podosomos. Os podosomos são estruturas adesivas típicas de macrófagos aderidos ao substrato (Spano *et al.*, 2013).

Filamentos do citoesqueleto como actina e vimentina são responsáveis por migração celular, aderência ao substrato, manutenção da forma, integridade do citoplasma, fagocitose de agentes bacterianos e a eliminação intracelular dos patógenos (Espitia *et al.*, 2012). Mudanças na morfologia em macrófagos RAW264.7 infectados por BCG também foram detectadas; alteração da forma esférica para polarizada, tanto no caso da infecção com BCG viáveis como quando expostas a componentes micobacterianos (Lasunskiaia *et al.*, 2006). Sendo assim, o desarranjo na trama de actina poderia retardar a ligação do lisossoma com o fagossoma, e consequentemente frear a eliminação intracelular dos patógenos.

A infecção bacteriana em macrófago dispara a liberação de citocinas e NO, além da modulação de lipídios, que favorecem o escape do patógeno (Nicolaou *et al.*, 2012). O acúmulo de CLs em macrófagos infectados por *M. bovis* BCG foi associado ao TLR, à modulação das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ , bem como a presença de PGE2 (D'Avila *et al.*, 2006).

O uso dos ácidos graxos como fonte de carbono pelo *M. tb* durante a infecção é amplamente reconhecido (Russell, 2003). A micobactéria pode estocar ácido graxo na forma de triacilglicerol, sendo detectado durante a dormência (Daniel *et al.*, 2004; Deb *et al.*, 2009) e também no escarro de pacientes com TB (Garton, *et al.*, 2002; Garton *et al.*, 2008). A utilização desse triacilglicerol ocorre quando o *M. tb* é privado de nutrientes (Deb *et al.*, 2006) e quando o BCG é reativado depois de um estado de hipóxia, não replicativo (Low *et al.*, 2009), evidenciando um importante papel funcional do armazenamento lipídico intracelular durante a fase não replicativa e na reativação do patógeno no hospedeiro (Low *et al.*, 2010).

Dessa forma, o maior acúmulo de CLs observado nos macrófagos infectados por BCG Pasteur poderia favorecer sua persistência dentro do ambiente intrafagossomal, uma vez que a formação de CL está correlacionada com a inibição da autofagia e da acidificação fagossomal (Singh *et al.*, 2012), possivelmente sugerindo que BCG Pasteur encontra-se em um contexto de bacilo viável, mas não replicativo.

A cepa BCG Moreau apresentou comportamento mais próximo às cepas virulentas quando comparada ao BCG Pasteur, sugerindo uma maior mobilização do sistema imune e conseqüentemente um maior efeito protetor. BCG Moreau se mostrou menos susceptível ao ambiente intrafagossomal, no que diz respeito a elementos como a redução de disponibilidade de oxigênio (hipóxia) e a acidificação fagossomal. Além disso, seu crescimento intracelular e maior taxa de infecção de macrófagos sugerem que a cepa Moreau apresenta uma melhor adaptação ao ambiente da célula hospedeira e possivelmente um tempo maior de persistência do estímulo bacteriano.

As informações obtidas contribuem para o entendimento da resposta das cepas BCG Moreau e BCG Pasteur frente ao ambiente intracelular de macrófagos em modelo de células THP-1. Esses dados funcionais contribuem para elucidar os mecanismos que podem resultar nas diferenças de eficácia protetora descritas para diferentes cepas de BCG, abrindo perspectivas para o melhoramento da cepa vacinal brasileira.

A recente informação (Regiane Jordão, PNI, Ministério da Saúde, comunicação no II Workshop em BCG, Salvador, BA, 2017) sobre a suspensão da produção da vacina BCG pela Fundação Atauilpho de Paiva (utilizando a cepa BCG Moreau) e a importação de vacina produzida na Índia (utilizando a cepa BCG Rússia) é bastante preocupante. O Brasil utiliza a cepa Moreau para a produção da vacina BCG desde meados dos anos 1920 (Benévolo-de-Andrade *et al.*, 2005) e a mudança no tipo de cepa utilizada na imunização poderia acarretar em diferenças na resposta vacinal, com impactos negativos no controle da TB.

O Programa de Imunização Extendida (EPI) recomenda que a vacina BCG dada aos neonatos nos países com alta prevalência de TB seja baseada nas cepas BCG Dinamarca, Japão ou Rússia, vacinas aprovadas pela OMS (Shann, 2015). No entanto, a literatura indica uma pobre imunogenicidade desencadeada por BCG Rússia, quando comparada às demais cepas, como BCG Japão e Dinamarca

(Shann, 2015; Davids *et al.*, 2006; Ritz *et al.*, 2008). Adicionalmente, o tempo de persistência da modulação do sistema imune desencadeada pela vacinação com BCG Rússia não ultrapassou 12 semanas (Fatoumatta *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado no Cazaquistão, a vacinação em neonatos reduziu o risco de desenvolver a TB diagnosticada clinicamente em 69% dos bebês vacinados com BCG Tokyo, 43 % após BCG Servia e 22 % após BCG Russia (Favorov *et al.*, 2012). Esses dados sugerem que existe uma ampla diferença na efetividade das diferentes cepas BCG.

Em 2014, o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) forneceu 86 milhões de doses da vacina BCG Rússia (menor proteção efetiva no Cazaquistão), apenas 31 milhões de doses de BCG Japão (a cepa mais protetiva no Cazaquistão) e apenas 5 milhões de doses de BCG Dinamarca (a cepa que reduziu a mortalidade neonatal em 48% na Guiné-Bissau). A compra realizada pela UNICEF das diferentes cepas foi limitada de acordo com a capacidade de fornecimento pelos produtores das cepas de BCG Japão e BCG Dinamarca (UNICEF, 2015).

Essas informações ressaltam a importância de cautela no momento de optar por uma outra cepa vacinal para implementação no calendário vacinal. Essa escolha não deveria ser norteada apenas pela capacidade de entrega dos lotes das vacinas, mas também pelo efeito protetor e a capacidade de proteção a longo prazo.

A cepa BCG Moreau é reconhecida como uma das cepas mais imunogênicas (Antas *et al.*, 2008; Antas, 2016), com efeito protetor considerado satisfatório em neonatos e com longevidade protetora de mais de duas décadas (Barreto *et al.*, 2005), além de ser produzida no Brasil desde 1930, reforçando a experiência na produção dos lotes e na capacidade de atender à demanda nacional. Dessa forma, cabe a reflexão se a melhor opção seria efetivamente a troca da cepa BCG Moreau por BCG Russia ou investir na melhoria da infraestrutura de produção nacional da vacina BCG Moreau.

## 5. Conclusões

- ✓ Padronizamos um protocolo de diferenciação de monócitos THP-1 em macrófagos utilizando a concentração de 200 nM de PMA por 48 horas indução, com posterior 48 horas de descanso;
- ✓ As cepas de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e Tokyo apresentam aumento na quantidade de bacilos viáveis durante a infecção em células THP-1, nos tempos estudados; já a cepa Pasteur apresenta uma tendência à estabilidade da viabilidade bacteriana nas mesmas condições avaliadas;
- ✓ A cepa BCG Moreau sempre apresenta maior número de bactérias viáveis durante a cinética de infecção estudada, quando comparada às cepas Pasteur e Tokyo, exceto pelo tempo de 6 horas quando o número de bactérias das cepas Moreau e Pasteur são equivalentes;
- ✓ Observamos uma maior taxa de internalização da cepa BCG Moreau por macrófagos THP-1 do que para as cepas BCG Tokyo e Pasteur;
- ✓ As cepas BCG Moreau e Pasteur apresentam mudanças na morfologia de colônias das bactérias obtidas após 4 horas de infecção em macrófagos THP-1. No entanto, BCG Moreau retorna à morfologia de colônia anterior à infecção;
- ✓ A cepa BCG Pasteur expressa a proteína HspX, marcadora de hipóxia, mais precocemente do que as cepas Moreau e Tokyo, evidenciando um perfil diferenciado de resposta ao estresse provocado pela infecção em macrófagos.
- ✓ A viabilidade dos macrófagos THP-1 não é alterada pela infecção com as cepas BCG estudadas, exceto por uma discreta, porém significativa, redução de viabilidade observada no tempo de 48h em resposta à infecção por BCG Pasteur;
- ✓ A morfologia dos macrófagos apresenta-se alterada em resposta à infecção pelas cepas BCG estudadas; entretanto, não observamos alterações cepa-específicas;

- ✓ A cepa BCG Pasteur induz um aumento na secreção das citocinas IL-1 $\beta$  e MCP-1 pelos macrófagos quando comparada à cepa BCG Moreau;
- ✓ A cepa BCG Moreau induz um aumento na secreção das citocinas TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  pelos macrófagos quando comparada à cepa BCG Pasteur;
- ✓ A cepa BCG Moreau parece induzir um aumento sutil na secreção da citocina IL-6 pelos macrófagos quando comparada a cepa BCG Pasteur;
- ✓ A infecção não altera a secreção da citocina IL-8 pelos macrófagos, nas condições estudadas;
- ✓ Não foi possível detectar a secreção da citocina IL-10 nem a produção de óxido nítrico pelos macrófagos THP-1, nas condições estudadas;
- ✓ A cepa BCG Moreau resiste à acidificação fagossomal por até 24 horas, enquanto que a cepa BCG Pasteur apresenta uma maior taxa de colocação com vesículas acidificadas no tempo de 6 horas após a infecção;
- ✓ A infecção por BCG provoca um desarranjo na organização dos filamentos de actina, mas não detectamos alterações na expressão desta proteína;
- ✓ A infecção por BCG Pasteur aumenta em aproximadamente 2 vezes o acúmulo de corpúsculos lipídicos nos macrófagos quando comparados às células não infectadas, enquanto que a infecção por BCG Moreau não induziu aumento significativo destas organelas.

## **7. Referências Bibliográficas**

- Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, Naeem R, Ansari H, Malas TB, Adroub SA, Verboom T, Ummels R, Zhang H, Panigrahi AK, McNerney R, Brosch R, Clark TG, Behr MA, Bitter W, Pain A. Genomic expression. Catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep*. 2015 Oct;21(5):15443;
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 12:783–801;
- Alexander DC, Jones JR, Tan T, Chen JM, Liu J. PimF, a mannosyltransferase of mycobacteria, is involved in the biosynthesis of phosphatidylinositol mannosides and lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 2004; 279:18824e33
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Aug;16(8):1296-9;
- Alves L, de Mendonça Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, Pessolani MC, Barker LP. Mycobacterium leprae infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Sep 15;238(2):429-37
- Antas PR. Crucial requirement for standardization during the development of novel recombinant BCG vaccines: Does the corresponding substrain background matter? *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Dec;12(12):3099-3102;
- Antas PRZ, Castello-Branco LRR. New vaccines against tuberculosis: lessons learned from BCG immunization in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008 March 13 Review; 102, 628-630;
- Ashenafi S, Aderaye G, Bekele A, Zewdie M, Aseffa G, Hoang AT, Carow B, Habtamu M, Wijkander M, Rottenberg M, Aseffa A, Andersson J, Svensson M, Brighenti S. Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3. *Clin Immunol*. 2014 Apr;151(2):84-99.
- Aston C, Rom WN, Talbot AT, Reibman J. Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jun;157(6 Pt 1):1943-50;

- Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991, v. 47, n.1, p. 22-29;
- Awuh JA, Flo TH. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages. *Cell Mol Life Sci.* 2017 May;74(9):1625-1648. Review;
- Baker JJ, Johnson BK, Abramovitch RB. Slow growth of *Mycobacterium tuberculosis* at acidic pH is regulated by *phoPR* and host associated carbon sources. *Mol Microbiol* 2014;94:56–69;
- Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG: Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 1998, 161:2636;
- Barisch C, Soldati T., *Mycobacterium marinum* degrades both triacylglycerols and phospholipids from its *Dictyostelium* host to synthesise its own triacylglycerols and generate lipid inclusions, *PLoS Pathog.* 2017 Jan 19;13(1):e1006095;
- Barker LP, George KM, Falkow S, Small PL. Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun.* 1997 Apr;65(4):1497-504;
- Barreto MB, Cunha SS, Pereira SM, Genser B, Hijjar MA, Ichihara MY. Neonatal protects children and young adults against all forms of tuberculosis in Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2005; 10: 1171-3;
- Bartz R, Zehmer JK, Zhu M, Chen Y, Serrero G, Zhao Y, Liu P. Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res* 2007, 6:3256–3265;
- Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, Britton WJ. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *Immunology.* 1999;162(6):3504–11;
- Bedwell, J., Kairo, S. K., Behr, M. A., and Bygraves, J. A. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 2001; 19, 2146–2151
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999 May 28;284(5419):1520-3;

- Behr MA. BCG–different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis.* 2002 Feb;2(2):86–92;
- Behr MA. Comparative genomics of BCG vaccines. *Tuberculosis* 2001;81(1-2):165-8;
- Bekker, LG, S. Freeman, P. J. Murray, B. Ryffel, and G. Kaplan. TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J Immunol* 2001, 166 (11):6728-34;
- Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LR. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Aug;100(5):459-65. Review;
- Berrêdo-Pinho M, Kalume DE, Correa PR, Gomes LH, Pereira MP, da Silva RF, Castello-Branco LR, Degraive WM, Mendonça-Lima L. Proteomic profile of culture filtrate from the Brazilian vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Moreau compared to *M. bovis* BCG Pasteur. *BMC Microbiol.* 2011 Apr 20;11:80;
- Berrington WR & Hawn *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *TR Immunol Rev.* 2007 Oct;219:167-86;
- Besra GS, Khoo KH, McNeil MR, Dell A, Morris HR, Brennan PJ. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry.* 1995 Apr 4;34(13):4257-66;
- Bhatt K, Salgame P.J Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Immunol.* 2007 Jul;27(4):347-62. Review;
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000, 12:64–76;
- Brennan PJ & Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev Biochem* 1995; 64:29-63;
- Brewer TF Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis.* 2000 Sep;31 Suppl 3:S64-7;

- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, et al: Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104 (13): 5596-5601. 10.1073
- Brosch, R., Gordon, S. V., Pym, A., Eiglmeier, K., Garnier, T., and Cole, S. T. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000, 290, 143–152;
- Bruns H, Stegelmann F, Fabri M, Döhner K, van Zandbergen G, Wagner M, Skinner M, Modlin RL, Stenger S. Abelson tyrosine kinase controls phagosomal acidification required for killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *J Immunol.* 2012 Oct 15;189(8):4069-78;
- Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M. V. The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. *Photophysics and Photochemical Reaction. Photochemistry and Photobiology.* 2002 76 (4): 385–90.
- Butler RE, Cihlarova V, Stewart GR. Effective generation of reactive oxygen species in the mycobacterial phagosome requires K<sup>+</sup> efflux from the bacterium. *Cell Microbiol.* 2010 Aug;12(8):1186-93.
- Byrd, T. F. Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) promotes growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes iron-mediated growth suppression is correlated with decreased release of TNF $\alpha$  from iron-treated infected monocytes. *J. Clin. Invest.* 1997; 99, 2518–2529.
- Caire-Brändli I, Papadopoulos A, Malaga W, Marais D, Canaan S, Thilo L, de Chastellier C. Reversible lipid accumulation and associated division arrest of *Mycobacterium avium* in lipoprotein-induced foamy macrophages may resemble key events during latency and reactivation of tuberculosis, *Infect Immun.* 2014 Feb;82(2):476-90.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Primary Health Care Providers*, 2016;
- Chan J, Xing Y, Magliozzo R, Bloom B: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992, 175:1111;
- Chang, Z., T. P. Primm, J. Jakana, I. H. Lee, I. Serysheva, W. Chiu, H. F. Gilbert, and F. A. Quiocho. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3)

- functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:7218–7223;
- Chegou NN, Black GF, Kidd M, van Helden PD, Walzl G. Host markers in Quantiferon supernatants differentiate active TB from latent TB infection: preliminary report. *BMC Pulm Med* 2009; 9: 21.
- Chen, J. M., Islam, S. T., Ren, H. & Liu, J. Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. *Vaccine* 25, 8114–8122 (2007).
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011, 332:1519–1523;
- Cohn ZA, Benson B. The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry, and biochemistry. *J Exp Med.* 1965 Jan 1;121:153-70.
- Cohn ZA, Fedorko ME, Hirsch JG. The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. V. The formation of macrophage lysosomes. *J Exp Med* 1996; 123: 757–766;
- Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics.* 1995 Jul;96(1 Pt 1):29-35;
- Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 1994 Mar 2;271(9):698-702;
- Cole AM, Shi J, Ceccarelli A, Kim YH, Park A, Ganz T. Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. *Blood* 2001; 97:297–304;
- Coulombe F, Divangahi M, Veyrier F, de Léséleuc L, Gleason JL, Yang Y, Kelliher MA, Pandey AK, Sasseti CM, Reed MB, Behr MA. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J Exp Med.* 2009 Aug 3;206(8):1709-16;
- Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Sep;53 (Pt 5):1305-14;

- Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 1998; 180: 801–808;
- Daffé M & Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol*. 1998; 39:131-203. Review;
- Daigneault M1, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010 Jan 13;5(1):e8668.
- Daniel, H. Maamar, C. Deb, T.D. Sirakova, P.E. Kolattukudy, Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages, *PLoS Pathog*. 7 2011, e1002093;
- Daniel, J., Deb, C., Dubey, V. S., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Morbidoni, H. R., and Kolattukudy, P. E. (2004) *J. Bacteriol*. 186, 5017–5030;
- Darzens EMD, Fahr GMD. Cord-forming propel-ty, lethality and pathogenicity of Mycobacteria. *American College of Chest Physicians. Dis Chest*. 1956 Dec;30(6):642-8
- Davids V, Hanekom WA, Mansoor N, Gamielidien H, Gelderbloem SJ, Hawkrigde A, et al. The effect of bacille Calmette-Guerin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis* (2006) 193(4):531–6;
- D'Avila, H., R. C. Melo, G. G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 2006, 176 (5):3087-97;
- de Jong, W. W., G. J. Caspers, and J. A. Leunissen. Genealogy of the alpha-crystallin–small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol*. 1998; 22:151–162;
- de Pinho RT, da Silva WS, de Castro Côrtes LM, da Silva Vasconcelos Sousa P, de Araujo Soares RO, Alves CR. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. *Exp Parasitol*. 2014 Dec; 147:72-80;
- Deb, C., Daniel, J., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Dubey, V. S., and Kolattukudy, P. E. (2006) *J. Biol. Chem*. 281, 3866–3875)

- Deb, C., Lee, C. M., Dubey, V. S., Daniel, J., Abomoelak, B., Sirakova, T. D., Pawar, S., Rogers, L., and Kolattukudy, P. E. (2009) PLoS ONE 4, e6077
- Dinareello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 2009, 27:519–550;
- Ding Y, Yang L, Zhang S, Wang Y, Du Y, Pu J, Peng G, Chen Y, Zhang H, Yu J, Hang H, Wu P, Yang F, Yang H, Steinbuchel A, Liu P. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets. *J Lipid Res* 2012, 53:399–411;
- Djoba Siawaya JF, Beyers N, van Helden P, Walzl G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(1):69–77.
- Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet.* 2006 Mar 18; 367(9514):938-40;
- Engel M, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P, Rollinghoff M, Stenger S: Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002, 168:1328;
- Ernst JD, Trevejo-Nuñez G, Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest.* 2007 Jul;117(7):1738-45. Review;
- Espitia C, Rodríguez E, Ramon-Luing L, Echeverría-Valencia G, and Vallecillo AJ, “Host-pathogen interactions in tuberculosis,” in *Understanding Tuberculosis—Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*, P.-J. Cardona, Ed., pp. 43–76, InTech, Vienna, Austria, 2012
- Evans TG. Reasons for optimism in the search for new vaccines for tuberculosis. *Epidemiol Infect.* 2017 Jul;145(9):1750-1756;
- Fatoumatta Darboe, Jane U. Adetifa, John Reynolds, Safayet Hossin, Magdalena Plebanski, Mihai G. Netea, Sarah L. Rowland-Jones, Jayne S. Sutherland, Katie L. Minimal Sex-Differential Modulation of Reactivity to Pathogens and Toll-Like Receptor Ligands following Infant Bacillus Calmette–Guérin Russia Vaccination. *Flanagan Front Immunol.* 2017; 8: 1092. Published online 2017 Sep 8
- Favorov M, Ali M, Tursunbayeva A, et al. Comparative tuberculosis (TB) prevention effectiveness in children of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines from diferente sources, Kazakhstan. *PLoS One* 2012; 7:e32567

- Fine PE Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. 1995 Nov 18;346(8986):1339-45. Review. Erratum in: *Lancet* 1996 Feb 3;347(8997):340;
- Flesch IE, Hess JH, Oswald IP, Kaufmann SH. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alpha and by IL-10. *Int Immunol* 1994; 6:693 –700;
- Flynn JL & Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19:93, 2001;
- Frahm M, Goswami ND, Owzar K, Hecker E, Mosher A, Cadogan E, Nahid P, Ferrari G, Stout JE. Discriminating between latent and active tuberculosis with multiple biomarker responses. *Tuberculosis (Edinb)* 2011; 91: 250–256
- Galagan, J. E. Genomic insights into tuberculosis. *Nat. Rev. Genet.* 2014, 15, 307–320.
- Garton, N. J., Christensen, H., Minnikin, D. E., Adegbola, R. A., and Barer, M. R. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum. *Microbiology* 2002; 148, 2951–2958;
- Garton, N. J., Waddell, S. J., Sherratt, A. L., Lee, S. M., Smith, R. J., Senner, C., Hinds, J., Rajakumar, K., Adegbola, R. A., Besra, G. S., Butcher, P. D., and Barer, M. R. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persistor-like bacilli in tuberculous sputum. *PLoS Med.* 2008; 5, e75.
- Geijtenbeek, T.B. & Gringhuis, S.I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2016 16, 433–448;
- Gengenbacher M, Nieuwenhuizen NE, Kaufmann S. BCG - old workhorse, new skills. *Curr Opin Immunol.* 2017 Aug;47:8-16;
- Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BM, Islam NM, Sarkar SN, Dasgupta S, Kirsebom LA. Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 30;106(26):10781-6;
- Gibson AL, Huard RC, Gey van Pittius NC, Lazzarini LC, Driscoll J, Kurepina N, Zozio T, Sola C, Spindola SM, Kritski AL, Fitzgerald D, Kremer K, Mardassi H, Chitale P, Brinkworth J, Garcia de Viedma D, Gicquel B, Pape JW, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Warren RM, van Helden PD, Rastogi N, Suffys PN, Lapa e Silva J, Ho JL. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1259-67;

- Giovannini D, Cappelli G, Jiang L, Castilletti C, Colone A, Serafino A, Wannenes F, Giacobbe L, Quintiliani G, Fraziano M, Nepravishta R, Colizzi V, Mariani F. Microb A new Mycobacterium tuberculosis smooth colony reduces growth inside human macrophages and represses PDIM Operon gene expression. Does an heterogeneous population exist in intracellular mycobacteria? Pathog. 2012 Sep;53(3-4):135-46.
- Gomes LH, Otto TD, Vasconcellos EA, Ferrão PM, Maia RM, Moreira AS, Ferreira MA, Castello-Branco LR, Degraive WM, Mendonça-Lima L. Genome sequence of Mycobacterium bovis BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. J Bacteriol. 2011 Oct;193(19):5600-1;
- Gordon SV, Bottai D, Simeone R, Stinear TP, Brosch R. Pathogenicity in the tubercule bacillus: molecular and evolutionary determinants. Bioessay 2009; 31:378-388;
- Guerreiro LT, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, Rosa PS, Sandoval FG, Jardim MR, Antunes SG, Shannon EJ, Sarno EN, Pessolani MC, Williams DL, Moraes MO. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. PLoS One. 2013 Jun 14;8(6):e64748;
- Harding, C.V. & Boom, W.H. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. Nat. Rev. Microbiol.2010, 8, 296–307;
- Hawgood BJ. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. Toxicon. 1999 Sep;37(9):1241-58;
- Henrique F, Lopes A, Botelho KP, Frota CC, Victor M, Freitas C. Serum levels of interleukin-6 in contacts of active pulmonary tuberculosis. J Bras Patol Med Lab. 2013;49:410–4
- Hossain, M.M. & Norazmi, M.N. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection – the double-edged sword? Biomed. Res. Int. 2013, 179174;
- Huante MB, Gupta S, Calderon VC, Koo SJ, Sinha M, Luxon BA, Garg NJ, Endsley JJ. Differential inflammasome activation signatures following intracellular infection of human macrophages with Mycobacterium bovis BCG or Trypanosoma cruzi. Tuberculosis (Edinb). 2016 Dec;101S:S35-S44.

- Hunter RL, Venkataprasad N, Olsen MR. The role of trehalose dimycolate (cord factor) on morphology of virulent *M. tuberculosis* in vitro. *Tuberculosis* 2006; 86:349e56
- Iruedo J, O'Mahony D, Mabunda S, Wright G, Cawe B. The effect of the Xpert MTB/RIF test on the time to MDR-TB treatment initiation in a rural setting: a cohort study in South Africa's Eastern Cape Province. *BMC Infect Dis.* 2017 Jan 21;17(1):91;
- Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, Kinoshita T, Akira S, Yoshikai Y, Yamasaki S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med.* 2009 Dec 21; 206(13):2879-88;
- Ishikawa E, Mori D, Yamasaki S. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria; Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors. *Trends Immunol.* 2017 Jan;38(1):66-76. Review;
- Jacob EB, Becker I, Shapira Y, Levine H. Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends Microbiol* 2004; 12:366e72.
- Jacobs R, Maasdorp E, Malherbe S, Loxton AG, Stanley K, van der Spuy G, Walzl G, Chegou NN. Diagnostic potential of novel salivary host biomarkers as candidates for the immunological diagnosis of tuberculosis disease and monitoring of tuberculosis treatment response. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160546;
- Jamieson SE, Miller EN, Black GF, Peacock CS, Cordell HJ, Howson JM, Shaw MA, Burgner D, Xu W, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun.* 2004 Jan;5(1):46-57.
- Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, Miyazaki T, Albrecht I, Massner J, Pieters J. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1- dependent activation of calcineurin. *Cell* 2007;130:37–50;
- Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Nishimura T, Anderson AC, Kuchroo VK, Remold HG, Behar SM. IL-1beta promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. *J Immunol* 2013; 190:4196–4204

- Jia X, Yang L, Dong M, Chen S, Lv L, Cao D, Fu J, Yang T, Zhang J, Zhang X, Shang Y, Wang G, Sheng Y, Huang H, Chen F. The Bioinformatics Analysis of Comparative Genomics of Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC) Provides Insight into Dissimilarities between Intraspecific Groups Differing in Host Association, Virulence, and Epitope Diversity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Mar 21;7:88;
- Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, Olkkonen VM, Neefjes J. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J Cell Biol* 2007; 176:459–471;
- Jordao L, Bleck CK, Mayorga L, Griffiths G, Anes E. On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cell Microbiol.* 2008 Feb;10(2):529-48. Epub 2007 Nov 6.
- Kalra M, Grover A, Mehta N, Singh J, Kaur J, Sable SB. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous mice. *Clin Immunol* 2007 Nov;125(2):173-83;
- Kaufmann SH, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis.* 2017 Mar;56:263-267. Review;
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11: 373–84;
- Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001; 345:1098–1104;
- Keane, J., H. G. Remold, and H. Kornfeld. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol.* 2000; 164:2016–2020
- Keane, J., M. K. Balcewicz-Sablinska, H. G. Remold, G. L. Chupp, B. B. Meek, M. J. Fenton, and H. Kornfeld. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* 1997; 65:298–304
- Kellar KL, Gehrke J, Weis SE, Mahmutovic-Mayhew A, Davila B, Zajdowicz MJ, Scarborough R, LoBue PA, Lardizabal AA, Daley CL, Reves RR, Bernardo J, Campbell BH, Whitworth WC, Mazurek GH. Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with Mycobacterium tuberculosis Antigens. *PLoS ONE* 2011; 6: e26545.

- Kernodle D.S. Decrease in the Effectiveness of Bacille Calmette-Guèrin Vaccine against Pulmonary Tuberculosis: A Consequence of Increased Immune Suppression by Microbial Antioxidants, Not Overattenuation. *Clin Infect Dis.* 2010 Jul 15;51(2):177-84;
- Kim, K.-H., Yang, C.-S., Shin, A.-R., Jeon, S.-R., Park, J.-K., Kim, H.-J., et al. (2011). Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin antigen activates Inflammatory responses through PI3-K/Akt, NF- $\kappa$ B, and MAPK pathways. *Immune Netw.* 11,123–133. doi: 10.4110/in.2011.11.2.123
- King HC, Khera-Butler T, James P, Oakley BB, Erenso G, Aseffa A, Knight R, Wellington EM, Courtenay O. Environmental reservoirs of pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. *PLoS One* 2017, 12(3):e0173811;
- Kishimoto, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010, 22 (5):347-52;
- Kisich, K. O., M. Higgins, G. Diamond, and L. Heifets. Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils. *Infect Immun* 2002,70 (8):4591-9;
- Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11(2):88-97.
- Koopman R, Schaart G, Hesselink MK. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol.* 2001; 116:63–68
- Kremlev SG, Phelps DS. Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol.* 1997 Jun;272(6 Pt 1):L1070-7;
- Kumar A, Farhana A, Guidry L, Saini V, Hondalus M, Steyn AJ. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Rev Mol Med.* 2011 Dec 16;13:e39. Review;
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):398-401;

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug; 227(5259):680-5;
- Lahey T & von Reyn CF. *Mycobacterium bovis* BCG and new vaccines for the prevention of tuberculosis. *Microbiol Spectr*. 2016 Oct;4(5);
- Lambert PH, Hawkrigde T, Hanekom WA. New vaccines against tuberculosis. *Clin Chest Med* 2009, 30:811–826, x;
- Lasunskaja EB, Campos MN, de Andrade MR, Damatta RA, Kipnis TL, Einicker-Lamas M, Da Silva WD. Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling. *J Leukoc Biol*. 2006 Dec;80(6):1480-90. Epub 2006 Sep 27.
- Lawe DC, Chawla A, Merithew E, Dumas J, Carrington W, Fogarty K, Lifshitz L, Tuft R, Lambright D, Corvera S. Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem* 2002;277:8611–8617;
- Lehner T, Wang Y, Whittall T, Seidl T. Innate immunity and HIV-1 infection. *ADR* 2011; 23: 19–22;
- Li Z, Thiel K, Thul PJ, Beller M, Kuhnlein RP, Welte MA. Lipid droplets control the maternal histone supply of *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 2012, 22:2104–2113;
- Lin Y, Gong J, Zhang M, Xue W, Barnes PF. Production of monocyte chemoattractant protein 1 in tuberculosis patients. *Infect Immun* 1998;66:2319–2322;
- Liu H, Perlman H, Pagliari LJ, Pope RM. Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *J Exp Med* 2001; 194: 113–126.
- Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin*. 2009 Feb;5(2):70–78;
- Low KL, Shui G, Natter K, Yeo WK, Kohlwein SD, Dick T, Rao SP, Wenk MR. Lipid droplet-associated proteins are involved in the biosynthesis and hydrolysis of triacylglycerol in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Biol Chem*. 2010 Jul 9;285(28):21662-70. doi: 10.1074/jbc.M110.135731. Epub 2010 May 6.

- Low, K. L., Rao, P. S., Shui, G., Bendt, A. K., Pethe, K., Dick, T., and Wenk, M. R. (2009) *J. Bacteriol.* 191, 5037–5043
- Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1998, 187:601– 608;
- Luo Y, Chen X, O'Donnell MA (2007). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) induces human CC- and CXC-chemokines in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol.* 147(2):370-8.
- Majumdar SD, Vashist A, Dhingra S, Gupta R, Singh A, Challu VK, Ramanathan VD, Kumar P, Tyagi JS. Appropriate DevR (DosR)-mediated signaling determines transcriptional response, hypoxic viability and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2012;7(4):e35847;
- Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, Rodrigues LC, Smith PG, Lipman M, Whiting PF, Sterne JA. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis.* 2014 Feb;58(4):470–480;
- Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol.* 2014 Jan 16;21(1):67-85, Review;
- Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1882–1886.
- McCullough KC, Basta S, Knotig S, Gerber H, Schaffner R, Kim YB, Saalmüller A, Summerfield A.. Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology* 1999; 98: 203–212
- Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):3920-7.;
- Mehta PK, King CH, White EH, Murtagh JJ Jr, Quinn FD. Comparison of in vitro models for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication. *Infect Immun.* 1996 Jul;64(7):2673-9;
- Melo RC, D'Ávila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;689:149-61. doi: 10.1007/978-1-60761-950-5\_9

- Melo RC, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog* 2012;8:e1002729;
- Méndez-Samperio P, Perez A, Alba L (2010). Reactive Oxygen Species-activated p38/ERK 1/2 MAPK Signaling Pathway in the Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin (BCG)- induced CCL2 Secretion in Human Monocytic Cell Line THP-1. *Archives of Medical Research*. 41:579e585.
- Mishra A, Akhtar S, Jagannath C, Khan A. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. *Mol Immunol*. 2017 Jul;87:240-248. Review;
- Molina-Torres CA1, Castro-Garza J, Ocampo-Candiani J, Monot M, Cole ST, Vera-Cabrera L. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of Mycobacterium tuberculosis. *J Med Microbiol*. 2010 Apr;59(Pt 4):384-91.
- Munn DH, Beall AC, Song D, Wrenn RW, Throckmorton DC. Activation-induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J Exp Med* 1995; 181: 127–136
- Naka T, Maeda S, Niki M, Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J, Ogura H, Kobayashi K, Fujiwara N. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 substrain. *J Biol Chem*. 2011 Dec 23;286(51):44153-61
- Namuganga AR, Chegou NN, Mubiri P, Walzl G, Mayanja-Kizza H. Suitability of saliva for Tuberculosis diagnosis: comparing with serum. *BMC Infect Dis*. 2017 Aug 31;17(1):600. doi: 10.1186/s12879-017-2687-z.;
- Nicolaou, G., A. H. Goodall, and C. Erridge. 2012. "Diverse bacteria promote macrophage foam cell formation via Toll-like receptor-dependent lipid body biosynthesis." *J Atheroscler Thromb* no. 19 (2):137-48.
- Niemann S, Rüscher-Gerdes S, Joloba ML, Whalen CC, Guwatudde D, Ellner JJ, Eisenach K, Fumokong N, Johnson JL, Aisu T, Mugerwa RD, Okwera A, Schwander SK. Mycobacterium africanum subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3398-405;

- Pereira SM, Dantas OM, Ximenes R, Barreto ML. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. *Rev Saude Publica* 2007 Sep; 41 Suppl 1:59-66. Review. Portuguese;
- Petrucci R, Lombardi G, Corsini I, Bacchi Reggiani ML, Visciotti F, Bernardi F, Landini MP, Cazzato S, Dal Monte P. Quantiferon-TB Gold In-Tube Improves Tuberculosis Diagnosis in Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2017 Jan;36(1):44-49;
- Phalane KG, Kriel M, Loxton AG, et al. Differential expression of host biomarkers in saliva and serum samples from individuals with suspected pulmonary tuberculosis. *Mediat Inflamm.* 2013;2013
- Piggot PJ & Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 2004 Dec;7(6):579-86. Review;
- Ploegh HL. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 2007, 448:435–438;
- Raja, A. 2004. "Immunology of tuberculosis." *Indian J Med Res* no. 120 (4):213-32.
- Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr 20;12(5):352-66. doi: 10.1038/nri3211. Review;
- Riedel DD, Kaufmann SH. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect. Immun.* 1997, 65:4620–4623;
- Riendeau CJ, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to *Mycobacterial* infection. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):254-9
- Rienksma RA, Suarez-Diez M, Mollenkopf HJ, Dolganov GM, Dorhoi A, Schoolnik GK, Martins Dos Santos VA, Kaufmann SH, Schaap PJ, Gengenbacher M. Comprehensive insights into transcriptional adaptation of intracellular mycobacteria by microbe-enriched dual RNA sequencing. *BMC Genomics.* 2015 Feb 5;16:34;
- Ritz N & Curtis N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains.. *Tuberculosis* 2009 (Edinb). Jul;89(4):248-51;
- 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 Aug;32(5):821-41. Review;
- Rodriguez-Campos, S., Smith, N. H., Boniotti, M. B., and Aranaz, A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for

- diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res. Vet. Sci. 2014, 97, S5–S19;
- Rosemberg J. Mecanismo imunitário da Tuberculose - síntese e atualização. Boletim de Pneumologia Sanitária 2001 - jan/jun - Vol.9 - Nº1;
- RUNYON EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am. 1959 Jan;43(1):273-90.
- Russell DG. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. Nat Cell Biol. 2003 Sep;5(9):776-8.
- Russell, D. G., P. J. Cardona, M. J. Kim, S. Allain, and F. Altare. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. Nat Immunol. 2009, 10 (9):943-8. doi: 10.1038/ni.1781;
- Russell, DG. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. Nat Rev Mol Cell Biol 2001, 2 (8):569-77.
- Rutledge BJ, Rayburn H, Rosenberg R, North RJ, Gladue RP, Corless CL, Rollins BJ High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. J Immunol 1995;155:4838–4843;
- Sadagopal S, Braunstein M, Hager CC, Wei J, Daniel AK, Bochan MR, Crozier I, Smith NE, Gates HO, Barnett L, Van Kaer L, Price JO, Blackwell TS, Kalams SA, Kernodle DS.. Reducing the activity and secretion of microbial antioxidants enhances the immunogenicity of BCG. PLoS One 2009; 4:e5531
- Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998, 19:513–521
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. Blood 1990; 75:40 – 47;
- Schlesinger LS1, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. J Immunol. 1990 Apr 1;144(7):2771-80.

- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P (1996) Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol.* 59:555–561;
- Shann F. Editorial commentary: different strains of bacillus Calmette-Guerin vaccine have very different effects on tuberculosis and on unrelated infections. *Clin Infect Dis.* 2015 Sep 15; 61(6): 960–962. Published online 2015 Jun 9. doi: 10.1093/cid/civ454
- Sharma S, Rajmani RS, Kumar A, Bhaskar A, Singh A, Manivel V, Tyagi AK, Rao KV. Differential proteomics approach to identify putative protective antigens of *Mycobacterium tuberculosis* presented during early stages of macrophage infection and their evaluation as DNA vaccines. *Indian J Exp Biol.* 2015 Jul;53(7):429-39. Erratum in: *Indian J Exp Biol.* 2015 Dec;53(12):868;
- Sherry B, Espinoza M, Manogue KR, Cerami A. Induction of the chemokine b peptides, MIP-1 a and MIP-1 b, by lipopolysaccharide is differentially regulated by immunomodulatory cytokines c-IFN, IL-10, IL-4, and TGF-b. *Mol Med* 1998; 4: 648;
- Shiratsuchi H, Johnson JL, Ellner JJ. Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. *J. Immunol.* 1991, 146:3165–3170;
- Silver RF, Li Q, Ellner JJ. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun.* 1998 Mar;66(3):1190-9;
- Singh V, Jamwal S, Jain R, Verma P, Gokhale R, Rao KV. *Mycobacterium tuberculosis*-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. *Cell Host Microbe.* 2012 Nov 15;12(5):669-81.
- Singhal N, Sharma P, Kumar M, Joshi B, Bisht D. Analysis of intracellular expressed proteins of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Proteome Sci.* 2012, 10(1):14;
- Sokol RJ, Hudson G, James NT, Frost IJ, Wales J. Human macrophage development: a morphometric study. *J Anat* 1987; 151: 27–35
- Spano A, Barni S, Sciola L. PMA withdrawal in PMA-treated monocytic THP-1 cells and subsequent retinoic acid stimulation, modulate induction of apoptosis

- and appearance of dendritic cells. *Cell Prolif.* 2013 Jun;46(3):328-47.1997;. 272, 13326–13331;
- Spano A, Monaco G, Barni S, Sciola L. Expression of cell kinetics and death during monocyte-macrophage differentiation: effects of Actinomycin D and Vinblastine treatment. *Histochem. Cell Biol.* 2007; 127, 79–94;
- Stewart G. R., Patel, J., Robertson, B. D., Rae, A., and Young, D. B. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog.* 2005; 1, 269–278;
- Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol.* 2003 Nov;1(2):97-105. Review;
- Stokes RW, Doxsee D. The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol.* 1999 Oct 10;197(1):1-9.
- Stokes RW, Haidl ID, Jefferies WA, Speert DP. Mycobacteria-macrophage interactions. Macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. *J Immunol.* 1993 Dec 15;151(12):7067-76.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994;263:678–681;
- Takeda K & Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3–9;
- Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010, 140, 805–820;
- Tanigawa, K., Y. Degang, A. Kawashima, T. Akama, A. Yoshihara, Y. Ishido, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microbial Pathogenesis* 2012, 52 (5):285-291;
- Taylor JL, Wieczorek A, Keyser AR, Grover A, Flinkstrom R, Karls RK, Bielefeldt-Ohmann H, Dobos KM, Izzo AA. HspX-mediated protection against tuberculosis depends on its chaperoning of a mycobacterial molecule. *Immunol Cell Biol.* 2012 Nov;90(10):945-54;

- Tessier P, Naccache P, Clark-Lewis I, Gladue R, Neote K, McColl S: Chemokine networks in vivo: Involvement of C-X-C and CC chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 1997, 159:3595;
- Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Infection and immunity*. 2004, 72(2):1169–1173;
- Tortoli E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006, 48:159–178;
- Tran V, Liu J, Behr MA. BCG Vaccines. *Microbiol Spectr*. 2014 Feb;2(1):MGM2-0028-2013. Review;
- Traore K1, Trush MA, George M Jr, Spannhake EW, Anderson W, Asseffa A. Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk Res*. 2005 Aug;29(8):863-79.
- Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Infectious Disease Epidemiology Unit, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK*. 2006;
- Uhía I, Williams KJ, Shahrezaei V, Robertson BD. *Mycobacterial Growth*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 May 8;5(10). Review;
- UNICEF. Supply Division. BCG vaccine: current supply & demand outlook [Internet]. 2014. Disponível em: [www.unicef.org/supply/files/BCG\\_Supply\\_Status\\_December\\_2014.pdf](http://www.unicef.org/supply/files/BCG_Supply_Status_December_2014.pdf). Acessado 10 Jan 2018
- Uplekar M, Weil D, Lonroth K, Jaramillo E, Lienhardt C, Dias HM, Falzon D, Floyd K, Gargioni G, Getahun H, Gilpin C, Glaziou P, Grzemska M, Mirzayev F, Nakatani H, Raviglione M; for WHO's Global TB Programme. *Lancet*. 2015 May 2;385(9979):1799-1801;
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*. 1997 Oct;47(4):1236-45;

- Vandal OH, Pierini LM, Schnappinger D, Nathan CF, Ehrh S. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 2008;14:849–854;
- Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A., and Deretic, V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol.*
- Vignal C, Guérardel Y, Kremer L, Masson M, Legrand D, Mazurier J, Ellass E. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF- $\alpha$  and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003 Aug 15;171(4):2014-23;
- Waddell SJ, Butcher PD, Stoker NG. RNA profiling in host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2007 Jun;10(3):297-302.
- Wang Z, Potter BM, Gray AM, Sacksteder KA, Geisbrecht BV, Laity JH. The solution structure of antigen MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* defines a new family of beta-grasp proteins. *J Mol Biol* 2007 Feb 16;366(2):375-81;
- Weiss G, Schaible UE Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Ver* 2015, 264:182–203;
- Welin, A. & Lerm, M. Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)* 2012, 92, 113–120;
- Welte MA .Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol* 2015, 25: R470–481;
- Wheeler PR & Ratledge C. 1994. in *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control* (ed. Bloom, B. R.) 353-385 (Am. Soc. Microbiol., Washington DC, 1994);
- World Health Organization (WHO). *Global tuberculosis control 2016*;
- World Health Organization (WHO). *Global tuberculosis control 2016*;
- World Health Organization (WHO). *TB, a global emergency. WHO report on the TB epidemic. Geneva; 1994*;
- World Health Organization. - *Report on Global Tuberculosis Control, 2005*;
- Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol.* 1994 Sep 15;153(6):2568-78.

- Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Investig.* 2000;80(5):759–67;
- Yamamoto S & Yamamoto T. Historical review of BCG vaccine in Japan..*Jpn J Infect Dis* 2007 Nov;60(6):331-6;
- Yao X, Liu Y, Liu Y, Liu W, Ye Z, Zheng C, Ge S. Multiplex analysis of plasma cytokines/chemokines showing different immune responses in active TB patients, latent TB infection and healthy participants. *Tuberculosis (Edinb).* 2017 Dec;107:88-94. doi: 10.1016/j.tube.2017.07.013. Epub 2017 Aug 3
- Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol.* 2009 May;17(5):183-8;
- Young SL, Slobbe L, Wilson R, Buddle BM, de Lisle GW, Buchan GS. Environmental strains of *Mycobacterium avium* interfere with immune responses associated with *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect Immun* 2007 Jun;75(6):2833-40;
- Yuan Y, Crane DD, Barry CEr. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 1996; 178: 4484–4492;
- Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 9578–9583;
- Zenteno-Cuevas R. Successes and failures in human tuberculosis vaccine development. *Expert Opin Biol Ther.* 2017 Sep 19:1-11;
- Zhang Y, Broser M, Cohen H, Bodkin M, Law K, Reibman J, Rom WN. Enhanced interleukin-8 release and gene expression. in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J. Clin. Invest.* 1995, 95:586–592;

## 8. Anexos

### Anexo I - Materiais

**Tabela 8.1: Meio de cultura 7H9, Tween 80 e glicerol**

7H9	4,7 g
Tween 80	0,05 g
Glicerol	2 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 900 mL

**Tabela 8.2: Solução de ADC**

Albumina fração V	50 g
Catalase	0,03 g
Dextrose	20 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 1000 mL*

\* A solução foi filtrada em filtro 0,22µm.

**Tabela 8.3: Meio de cultura sólido 7H10 e glicerol**

7H10	19,0 g
Glicerol	5 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 900 mL

**Tabela 8.4: Fucsina Fenicada**

Fucsina básica	3 g
Fenol	50 g
Etanol 95 %	100 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 1000 mL

**Tabela 8.5: Solução álcool-ácido**

HCl	3 %
Etanol	100 mL

**Tabela 8.6: Azul de metileno**

Azul de metileno	3 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 1000 mL

**Tabela 8.7: Tampão PBS 10X**

NaCl.	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
pH (ajustado com HCl)	7.4
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 1 L

**Tabela 8.8: Oligonucleotídeos para identificação genética**

Nome	Sequência (5' – 3')
<b>RD2 - REV</b>	TGA CCG GTT CTT ACT CGC
<b>RD2 - FOR</b>	CGA GAA GCG AAT TTA CAT ACG
<b>Rv3887- REV</b>	TTG ATA CGG TGC ATG AAT TAA AT
<b>Rv3887- FOR</b>	CCG CAG GAA CAT TAG CTG A

**Tabela 8.9: Ciclagem para a reação de PCR**

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
95 °C	5 minutos	1 ciclo
95 °C 62 °C 72 °C	30 segundos 30 segundos 2 minutos	35 ciclos
72 °C	30 segundos	1 ciclo
4 °C	-----	∞

**Tabela 8.10: Tampão TBE 10X**

Tris-base	108 g/L
Ácido bórico	55 g/L
EDTA	9,3 g/L

**Tabela 8.11: Meio RPMI completo contendo soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina**

RPMI (Sigma)	10,4 g
Soro Fetal Bovino (Sigma)	100 mL
Penicilina e Estreptomicina (Sigma)	10 mL
HEPES	5,95 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,0 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 1 L

**Tabela 8.12: Tratamento lamínulas de vidro**

Ferver 25 lamínulas em banho maria com sabão de coco
Ferver 3 vezes em banhos diferentes de água destilada (deixar sempre tempo suficiente para ferver);
Escoar o último banho de água destilada e trocar por álcool 70%;
Secar as lamínulas uma a uma com papel filtro limpo e ajuda de uma pinça;
Distribuir em placas de Petri forradas com papel filtro;
Embrulhar as placas prontas uma a uma, identificar e esterilizar em autoclave (1 atm / 20 min) ou em forno micro-ondas (15 min / potência máxima).

**Tabela 8.13: 4 % Paraformaldeído (PFA)**

PFA	4 g
PBS	q.s.p. 100 mL
pH (ajustado com NaOH)	7.4

**Tabela 8.14: 0,4 % azul de Tripán**

Azul de tripan	0,4 g
PBS	100 mL

**Tabela 8.15: Tampão MOPS 10X**

MOPS	41,9 g
Acetato de sódio	8,2 g
EDTA	3,72 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 1 L
pH (ajustado com NaOH)	7.4

**Tabela 8.16: Tampão de lise**

HEPES	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NH <sub>4</sub> Cl	60 mM
Glicerol	10 % (v/v)

**Tabela 8.17: Tampão de focalização isoeétrica - IEF.**

Uréia	8 M
CHAPS[3-(3-colamidopropil dimetilamonio)-1-propanosulfonato]	2 % (p/v)

**Tabela 8.18: Tampão para aplicação de amostras proteicas em gel SDS-PAGE (1X).**

Tris-HCl (pH6,8)	62,5 mM
SDS	2 %
β-mercaptoetanol	5 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,002 %
Glicerol	10 % (v/v)

**Tabela 8.19: Géis 15% SDS-PAGE**

Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	1,5 mL
Acrilamida 30 % / Bis Acrilamida 0,8 %	3,0 mL
SDS 10 %	60 µl
APS 10 %	60 µl
TEMED	6 µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 6 mL

**Tabela 8.20: Tampão de corrida Laemmli (Laemmli, 1970).**

Tris-base	24,6 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,5 %

**Tabela 8.21: Método de coloração por prata para géis SDS-PAGE de 7cm**  
(Ansorge, 1985)

<b>Solução</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Tempo (min)</b>
Etanol 10 % / Ácido acético 5 %	100 mL	10
CuCl <sub>2</sub> 2 % / TCA 12 % / EtOH 50 %	100 mL	20
Etanol 10 % / Ácido acético 5 %	100 mL	10
KMnO <sub>4</sub> 0,01 %	100 mL	10
Etanol 10 % / Ácido acético 5 %	100 mL	10
Etanol 10 %	100 mL	10
H <sub>2</sub> O	100 mL	10
AgNO <sub>3</sub> 0,1 %	100 mL	10
H <sub>2</sub> O	100 mL	5
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10 %	Mínimo	1
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2 % / formaldeído 0,01 %	50 mL	4 x 5
Etanol 10 % / Ácido acético 5 %	100 mL	10
H <sub>2</sub> O ou sol. Secagem ou Ácido acético 1 %	100 mL	-----

**Tabela 8.22: Solução UA**

Ureia	8 M
Tris-HCl	0,1 M
pH (ajustado com HCl)	8.5

**Tabela 8.23: Solução contendo iodoacetamida**

Iodoacetamida	0,05 M
UA	q.s.p. 2 mL

**Tabela 8.24: Solução DB**

Tris-HCl	0,05 M
pH (ajustado com HCl)	8.5

**Tabela 8.25: Tampão TBS 10X**

1M Tris-HCl, pH7,5	100 mL
NaCl	87 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p. 1 L

**Tabela 8.26: Anticorpos utilizados no estudo.**

Anticorpo primário	Título	Fabricante	Anticorpo secundário	Título
Anti HspX	1:20.000	Produzido no LAGFB	IgG de camundongo	1: 10.000
Anti Actina	1:500	Sigma-Aldrich A2066	IgG de coelho	1:10.000
Anti GAPDH	1:5000	Thermo Fisher Scientific Am4300	IgG de camundongo	1:10.000

---

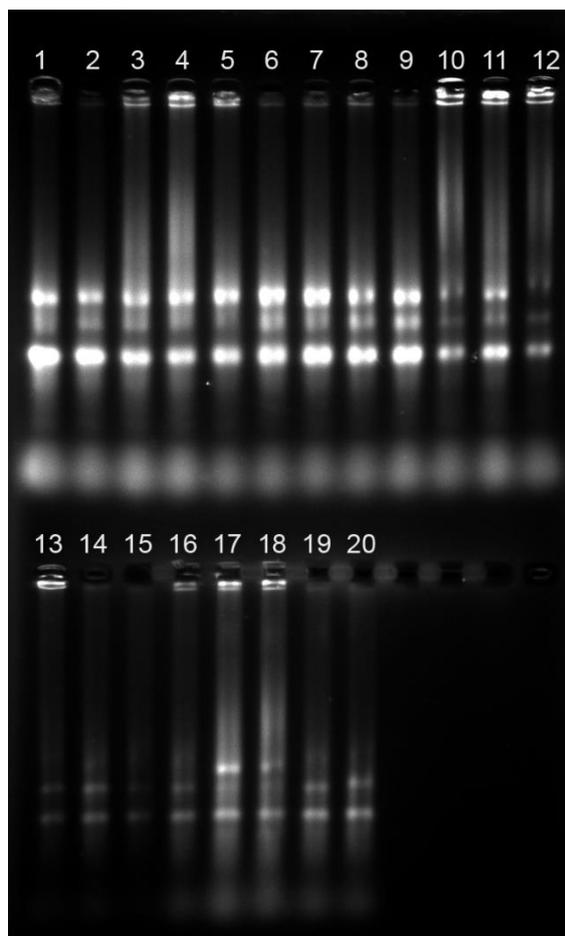
## Anexo II - Perspectivas

### **Perfil transcricional dos macrófagos infectados pela cepa BCG e dos bacilos intracelulares**

Para caracterizar possíveis genes modulados por macrófagos THP-1 em resposta a infecção por BCG Moreau e Pasteur; e determinar os genes bacterianos que estariam sendo regulados devido ao ambiente intrafagossomal, optamos por fazer a análise utilizando o qRT-PCR multiplex, utilizando a plataforma fuidigm.

Para isso, selecionamos previamente 48 genes eucariotos, relacionados com resposta a infecção por micobactéria (Guerreiro *et al.*, 2013), 48 genes micobacterianos descritos como modulados em infecção no modelo de células THP-1 (Rienksma *et al.*, 2015) e elegemos o tempo de 24 horas após a infecção.

O RNA foi extraído conforme descrito na metodologia e sua integridade foi avaliada através de gel de agarose (Figura 4.18). É possível observar as bandas referentes ao RNA ribossomal, dando o indicativo da integridade da amostra de RNA obtida. Os canais 1 -12 representam amostras de RNA de macrófagos não infectados (canais 1, 4, 7 e 10) e infectados por Moreau (canais 2, 5, 8 e 11) e Pasteur (canais 3, 6, 9 e 12). Os canais de 13 - 20 representam o RNA extraído do BCG Moreau (canais 13,15,17 e 19) e BCG Pasteur (canais 14, 16, 18 e 20) que foram obtidos a partir da infecção de células THP-1.



**Figura 4.41: Visualização da integridade do RNA extraído a partir de células THP-1 infectadas por BCG e de bacilos extraídos da infecção.** Géis de agarose 1,2 % corados com brometo de etídio para observar a integridade do RNA extraído através da metodologia do Trizol. Nos canais 1, 4, 7 e 10 temos amostra de RNA de células THP-1 não infectadas; nos canais 2, 5, 8 e 11, células THP-1 que foram infectadas por BCG Moreau; e nos canais 3, 6, 9 e 12, células THP-1 que foram infectadas por BCG Pasteur. Nos canais 13, 15, 17 e 18 temos amostra de RNA de bacilos de BCG Moreau que foram obtidos a partir da infecção de células THP-1 e nos canais 14, 16, 18 e 20, de BCG Pasteur. (N=4)

A partir da análise do gel de integridade e da satisfatória concentração do RNA, realizamos a etapa de síntese de cDNA com o equivalente a 1 µg de RNA. Esse cDNA está armazenado para posterior avaliação por multiplex.