



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

PAULO RAFAEL CARDOSO DE SOUSA

INVESTIGAÇÃO DE VIAS APOPTÓTICAS EM CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS INDUZIDAS POR DIFERENTES CEPAS
VACINAIS DE *Mycobacterium bovis* BCG

FORTALEZA
2023

PAULO RAFAEL CARDOSO DE SOUSA

INVESTIGAÇÃO DE VIAS APOPTÓTICAS EM CÉLULAS MONONUCLEARES
HUMANAS INDUZIDAS POR DIFERENTES CEPAS VACINAIS DE
Mycobacterium bovis BCG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas.

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Lima Nogueira.

FORTALEZA
2023

PAULO RAFAEL CARDOSO DE SOUSA

INVESTIGAÇÃO DE VIAS APOPTÓTICAS EM CÉLULAS MONONUCLEARES
HUMANAS INDUZIDOS POR DIFERENTES CEPAS VACINAIS DE
Mycobacterium bovis BCG

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Patologia. Área de
concentração: Ciências da Saúde.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas (Orientador)
Fiocruz e Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Lucas Lima Nogueira (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Regis Bernardo Brandim Gomes
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Dedico este trabalho *in memoriam* à
Maria Luíza Trajano de Sousa, minha
avó, que me ensinou a amar
incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À Instituição CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio..

Ao Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas pela orientação e construção do projeto. Ao Prof. Dr. Lucas Lima Nogueira pela excelente co-orientação e auxílio no decorrer dos experimentos, além de todo o apoio na finalização deste projeto.

Aos professores participantes da banca examinadora Cristiane Cunha Frota e Regis Bernardo Brandim Gomes e Francisco Gustavo Silveira Correia pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos doadores das amostras, pelo tempo concedido.

A plataforma de citometria de fluxo de análise multiparamétrica do IOC Fiocruz/RJ; ao Serviço de Hemoterapia/HUCFF/UFRJ, pelo fornecimento das amostras de sangue (*buffy coat*) neste estudo; à Fundação Ataulpho de Paiva, pela disponibilização da vacina BCG Moreau RDJ; e ao Ambulatório Souza Araujo da Fiocruz/RJ, pela disponibilização da vacina BCG Russia.

Pela minha família, por todo o alicerce construído sobre mim, para que eu pudesse continuar caminhando. Pela minha amada avó, Maria Luíza Trajano, que se foi em vida, mas está eternizada em meu coração.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas. Às amigas técnicas, estudantes e servidoras do DPML, por toda a ajuda e por todos os momentos de conversas e aprendizados. Aos amigos de longa data pelo apoio, consideração e torcida mútuas.

A todos aqueles que me ajudaram de maneira direta ou indireta para que este projeto fosse possível.

Muito obrigado!

“A vacina é, certamente, o melhor instrumento de saúde pública já inventado.” (Carlos Fidelis da Ponte)

RESUMO

A tuberculose (TB) é considerada a principal causa de morte devida a um único agente infeccioso. E a BCG é a única vacina licenciada contra a TB, mas que possui eficácia variável. Esta eficácia vem sendo associada a indução de apoptose em monócitos/macrófagos, podendo ser uma das peças-chave entre as imunidades inata e adquirida. Alguns estudos sugerem explorar melhor as vias moleculares de modulação da apoptose induzida pela vacina BCG. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar *in vitro* a modulação de marcadores moleculares da via intrínseca da apoptose em células mononucleares humanas, por um período de infecção de 16 e 48 horas pelas cepas Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia da vacina BCG, bem como avaliar o perfil de morte celular e produção de citocinas. Os resultados de quantificação relativa do mRNA demonstraram incrementos significativos ($p < 0,0001$) de NOXA, PUMA e BCL-XL, principalmente para as cepas de BCG Moreau e Pasteur. O MCL-1 apresentou maiores níveis de expressão ($p = 0,0050$) para a BCG Dinamarquesa. Como um todo, as expressões de BAD, BAX e BAK parecem não ter sofrido qualquer influência importante. Os maiores níveis de apoptose ($p = 0,0427$) foram observados para a cepa Moreau, em relação à cepa Russia. Além disso, foram observados aumentos expressivos nos níveis de IFN- γ ($p = 0,0078$) e TNF ($p = 0,0429$) pela BCG Moreau, em relação ao controle negativo e à BCG Russia. O presente estudo sugere a expressão de um perfil mais imunomodulador dos alvos moleculares indutores de apoptose induzido pela cepa BCG Moreau, em relação às demais cepas avaliadas da vacina BCG.

Palavras-chave: tuberculose; apoptose intrínseca; bacilo Calmette-Guérin; citocinas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death by a single infectious agent, and BCG is the only licensed vaccine for TB with a considerably variable efficacy. This efficacy has been associated with the induction of apoptosis in monocytes/macrophages, and may be the key link between innate and acquired immunity. A few studies suggest better exploring the modulation of molecular pathways of vaccine-induced apoptosis as an important factor to shape the immune response by the BCG vaccine. Thus, the aim of this study was to compare the modulation by Moreau, Danish, Pasteur, and Russia BCG vaccine strains *in vitro* for 16 and 48 hours, regarding the induction of molecular markers of the apoptosis intrinsic pathway in human mononuclear cells, as well as the cell death profile and cytokine production. The results of mRNA relative quantification showed increased levels ($p < 0.0001$) of NOXA, PUMA, and BCL-XL mainly by the Moreau and Pasteur BCG strains. An MCL-1 higher expression ($p = 0.0050$) was induced by the Danish BCG. As a whole, the expressions of BAD, BAX, and BAK were unaffected. The higher apoptosis levels ($p = 0.0427$) were found for the Moreau BCG strain, compared with the Russia strain. Additionally, significant increases in the levels of IFN- γ ($p = 0.0078$) and TNF ($p = 0.0429$) were observed for the Moreau BCG, compared with baseline and Russia BCG. This study suggests an immunomodulatory profile induced by the Moreau BCG strain, compared with the other BCG vaccine strains.

Keywords: tuberculosis; intrinsic apoptosis; Bacillus Calmette-Guérin; cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso.....	35
Figura 2	– Taxas estimadas de incidência de tuberculose, 2021.....	37
Figura 3	– Declínio desejado nas taxas globais de incidência de tuberculose até 2035.....	38
Figura 4	– Genealogia refinada das vacinas BCG.....	43
Figura 5	– Mecanismos moleculares de ativação das vias de apoptose.....	52
Figura 6	– Ativação direta e indireta da via apoptótica intrínseca.....	53
Figura 7	– Esquema de construção dos iniciadores para os ensaios de PCR.....	64
Figura 8	– Produto de amplificação do GAPDH a partir da sequência de iniciadores selecionados.....	66
Figura 9	– Fórmula para o cálculo da quantificação relativa (QR).....	68
Figura 10	– Gráficos <i>dotplot</i> representativos de estratégia dos dados em citometria de fluxo para identificar os níveis de expressão (porcentagem) das populações de células com morte por apoptose (Anexina-V+/PI-) e por necrose (Anexina-V+/PI+).....	70
Figura 11	– Curvas de <i>melting</i> para cada produto amplificado em amostras de CMSP....	73
Figura 12	– Cálculos de eficiência dos genes endógenos a partir de análises de qPCR.....	74
Figura 13	– Valores do <i>ranking</i> de estabilidade dos genes de referência testados em CMSP.....	75
Figura 14	– Expressão relativa dos alvos sensibilizadores pró-apoptóticos em amostras de CMSP estimuladas com diferentes cepas vacinais de BCG.....	77
Figura 15	– Expressão relativa dos alvos inibidores (anti-apoptóticos) em amostras de CMSP estimuladas com diferentes cepas vacinais de BCG.....	78
Figura 16	– Expressão relativa dos alvos efetores pró-apoptóticos em amostras de CMSP estimuladas com diferentes cepas vacinais de BCG.....	79

Figura 17	– Medidas de <i>Fold Change</i> dos alvos apoptóticos em amostras de CMSP estimuladas com diferentes cepas vacinais de BCG em relação ao controle positivo THP-1 estimulado com brefeldina.....	81
Figura 18	– Gráfico <i>dotplot</i> para identificação dos níveis (porcentagem) de apoptose e necrose em células THP-1 estimuladas com brefeldina e as cepas de BCG Moreau e Russia.....	82
Figura 19	– Percentual de apoptose e necrose de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de adultos saudáveis após diferentes estímulos.....	83
Figura 20	– Níveis (pg/mL) de citocinas induzidas após estímulo das vacinas BCG Moreau e Russia em Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP).....	84
Figura 21	– Modelos de indução de apoptose proposto para as cepas BCG Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia.....	96

LISTA DE TABELA

Tabela 1	– Descrição dos genes-alvo e iniciadores utilizados nos ensaios de PCR.....	65
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	Subunidade do RNA ribossomal eucariótico
ACTB	β -actina
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B2M	β -2-microglobulina
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BH	Domínio de homologia ao Bcl-2
cDNA	DNA complementar
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
COVID	<i>Corona Virus Disease</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i> – Ciclo de quantificação
CTL	Linfócito T Citotóxico
DC	Células Dendríticas
DD	Domínio de Morte
DED	Domínio Efetor de Morte
DISC	Complexo de Sinalização de Morte Induzida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desóxirribonucleico
DOTS	<i>Directly Observed Treatment, Short-course</i> – Tratamento Diretamente Observado, de curto curso
DU1	Duplicação em Tandem 1
DU2	Duplicação em Tandem 2
ESAT-6	Alvo Antigênico Secretor Precoce 6
ESX-1	Sistema de Secreção de Virulência em <i>Mtb</i>
FADD	Fas Associado ao Domínio de Morte
FasL	Ligante de Fas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz

GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HKG	Genes de Referência
IFN- γ	Interferon Gamma
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LTBI	Infecção por Tuberculose Latente
MDR-TB	Tuberculose Multidroga-resistente
MMP-9	Matrix Metaloproteinase 9
MOI	Multiplicidade da infecção
MR	Receptores de Manose
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
MTBC	Complexo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ b	Fator Nuclear Kappa B
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NLR	Receptores semelhantes a Nod (<i>Nod like</i>)
NOD	Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão Molecular Associados a Patógenos
PBS	Solução de Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Derivado Proteico Purificado
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
QR	Quantificação Relativa

RD	Região de Diferença
RFLP	Polimorfismo em Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA Mensageiro
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ROX	Corante de referência passiva
RT-qPCR	Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
SH-HUCFF	Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro
TDR-TB	Tuberculose Totalmente Resistente a Medicamentos
Th	Células T <i>helper</i>
THP-1	Células de Linhagem da Leucemia Monocítica Humana
TLR	Receptores semelhantes a <i>Toll</i> (<i>Toll like</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRADD	TNFRSF1A Associado ao Domínio de Morte
TST	Teste Cutâneo de Tuberculina
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
XDR-TB	Tuberculose Extensivamente Resistente a Medicamentos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	32
1.1 A biologia do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
1.2 Patogênese da tuberculose.....	33
1.3 Epidemiologia da tuberculose	36
1.4 Bacilo Calmette-Guérin (BCG).....	40
1.4.1 Histórico da BCG	40
1.4.2 Genealogia das cepas de BCG.....	42
1.5 Resposta imune frente à vacina BCG	44
1.5.1 Imunidade Inata	46
1.5.2 Imunidade Adaptativa	47
1.6 Papel dos monócitos na resposta imune do hospedeiro	49
1.7 Apoptose	49
1.7.1 Via extrínseca	50
1.7.2 Via intrínseca.....	51
1.7.3 A apoptose e a resposta imune	54
2. JUSTIFICATIVA.....	56
3. OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo geral	58
3.2 Objetivos específicos	58
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1 Delineamento do estudo	59
4.2 População de estudo e considerações éticas.....	60
4.3 Purificação das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) humanas	60
4.4 Cultivo celular das amostras de linhagem celular THP-1	61
4.5 Ensaio de infecção de CMSP com as cepas de BCG, e estimulação da	

linhagem celular THP-1 com brefeldina-A	62
4.6 Extração e quantificação de RNA das amostras	62
4.7 Ensaios de Transcrição Reversa	63
4.8 Preparo dos iniciadores para as reações de qRT-PCR em tempo real.....	64
4.8.1 Desenho e padronização dos iniciadores	64
4.8.2 Ensaios de especificidade dos iniciadores.....	66
4.8.3 Análise de eficiência dos iniciadores e determinação da concentração de uso 66	
4.9 Análise de estabilidade dos genes de referência (<i>housekeeping genes</i>)	67
4.10 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real	68
4.11 Detecção dos níveis de apoptose e necrose por citometria de fluxo.....	69
4.11.1 Marcação celular com Anexina-V e PI.....	69
4.11.2 Seleção da região de análise da população monocítica	69
4.12 Dosagem de citocinas pelo ensaio de Luminex.....	71
4.13 Análise estatística	71
5. RESULTADOS	73
5.1 Análise da especificidade dos iniciadores.....	73
5.2 Determinação da eficiência analítica dos iniciadores	74
5.3 Seleção dos genes de referência para os ensaios de expressão gênica relativa	75
5.4 Expressão relativa dos genes apoptóticos	75
5.5 Determinação do perfil de morte celular por citometria de fluxo das amostras de THP-1 estimuladas com brefeldina-A e de CMSP infectadas com as cepas BCG Moreau e Russia.....	82
5.6 Avaliação do perfil de citocinas pelo método de Luminex das amostras infectadas com as cepas BCG Moreau e Russia.....	84
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXO A – PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR ANÁLISE <i>IN SILICA</i>	115

APÊNDICE A – CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DOS ALVOS APOPTÓTICOS	119
APÊNDICE B – CORRELAÇÃO ENTRE OS ALVOS APOPTÓTICOS E O PERFIL DE MORTE CELULAR	122
APÊNDICE C – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DOS PRIMERS.....	125
APÊNDICE D – PROTOCOLO DE PADRONIZAÇÃO DE RT-PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE CMSP.....	134

1. INTRODUÇÃO

1.1 A biologia do *Mycobacterium tuberculosis*

Descrito primeiramente em 1822 pelo médico microbiologista alemão Heinrich Hermann Robert Koch, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Este grupo abriga diversas espécies de bacilos, como *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, dentre outros, capazes de causar infecções em humanos e outros mamíferos, incluindo animais domésticos e selvagens (GUPTA; LO; SON, 2018; SINHA et al., 2016; WIRTH et al., 2008).

O *Mtb* pertence à família *Mycobacteriaceae* e se caracteriza por ser um bacilo reto ou ligeiramente curvo, cuja dimensão varia de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento, imóvel, inerte, não esporulado, não encapsulado, não apresenta produção de toxinas e apresentando capacidade de sobrevivência no interior de células fagocitárias, sendo classificado como um patógeno intracelular facultativo aeróbio estrito de crescimento lento (SEBASTIAN KAMPS; BOURCILLIER, 2007).

As micobactérias representantes do MTBC são caracterizadas por sua resistência álcool-ácida (BAAR) e por possuírem paredes celulares hidrofóbicas muito espessas, cerosas e ricas em lipídios, dando a esses microrganismos um aspecto de crescimento em películas semelhantes a fungos em cultura líquida – por isso o nome Mico- ('fungo') - bactéria (COLLINS; GRANGE, 2003; PERCIVAL; WILLIAMS, 2013).

O genoma micobacteriano é constituído por uma molécula de DNA circular com alto teor de G e C, com tamanho de 4,4 Mbp, contendo cerca de 0,01-0,3% de polimorfismos e com presença variável de plasmídeos entre diferentes espécies, mas ausência em *Mtb* (COLE et al., 1998; VAN INGEN, 2017). Investigações voltadas à análise genômica revelam que as cepas de *Mtb* abrigam diferentes inserções e deleções em regiões específicas, conhecidas como RDs (Regiões de Diferença), sendo elas, principalmente, a RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13 e RD14 (BROSCH et al., 2002; FAKSRI et al., 2016).

Esses *loci* gênicos carregam, dentre outros, elementos chave no estabelecimento da patogênese de *Mtb*, com destaque ao sistema de secreção ESX-1 codificado pelo *locus* RD1 (WONG, 2017). Além disso, análises gênicas demonstram a presença de mutações em sequências como *katG*, *inhA*, *rpoB*, *pncA*, *embB*, *rrs*, *gyrA* e *gyrB* associadas à

resistência a diversos fármacos antibióticos (BROSCH et al., 2002; VAN INGEN, 2017; VOLOKHOV et al., 2008).

Estudos já demonstraram que essas regiões podem ser representativas em análises que busquem diferenciar filogeneticamente cepas de *Mtb* independente de sua origem geográfica (BROSCH et al., 2002; ORGEUR; BROSCH, 2018). De forma geral, as micobactérias pertencentes ao MTBC compartilham mais de 99% de identidade nucleotídica, mas diferem quanto a sua patogenicidade e o tropismo pelo hospedeiro (DESIKAN; NARAYANAN, 2015).

1.2 Patogênese da tuberculose

Um dos processos-chave associados ao estabelecimento do *Mtb* em um hospedeiro está na capacidade do bacilo de infectar macrófagos alveolares (CARDONA, 2018). No entanto, para atingir esses sítios de infecção com sucesso, o *Mtb* precisa ser capaz de ultrapassar a primeira barreira física do hospedeiro, composta de células ciliadas da mucosa da via aérea superior, o que está diretamente relacionada a quantidade de bacilos presentes nos aerossóis contaminados (ESCOMBE et al., 2007). Além disso, a qualidade do surfactante produzido pelos pneumócitos pode influenciar diretamente no estabelecimento da infecção, pela capacidade dessas moléculas em destruir a parede lipofílica micobacteriana (ARCOS et al., 2011; ESCOMBE et al., 2007).

Por estes motivos, o desenvolvimento de infecção por *Mtb* requer intensos períodos de exposição contínua a indivíduos contaminados com os bacilos (STORLA; YIMER; BJUNE, 2008). Cenários de reinfecção por *Mtb*, mas sem o desenvolvimento de manifestações clínicas da TB ativa, têm sido relatados como potencializadores na indução da doença a médio prazo, com chances aumentadas a cada nova exposição adicional (ACKLEY et al., 2019; ACUÑA-VILLAORDUÑA et al., 2018).

Uma vez dentro dos alvéolos pulmonares, o *Mtb* se liga à superfície de macrófagos, através de receptores de manose (MR), do complemento (CR), de lectina dependente de Ca^{2+} (MINCLE) em macrófagos, os semelhantes ao NOD/NOD2 em monócitos, CD18, CD32 e CD16 em neutrófilos e DC-SIGN/CD209, CD11c e CD205 em células dendríticas (DCs), induzindo a fagocitose (NATARAJAN et al., 2020). No interior dos macrófagos, as micobactérias residem inicialmente nos vacúolos fagossômicos que, em seu ciclo normal, geram um ambiente hostil a partir da acidificação via redução do pH,

geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e presença de enzimas lisossômicas e outros peptídeos tóxicos (SMITH, 2003). No entanto, através da secreção de fatores como EsxH e Ptpa associados ao ESAT-6, as micobactérias reduzem a acidez no fagossomo, e inibem a sua maturação e fusão com o lisossomo, estabelecendo um nicho propício à reprodução bacteriana (CARDONA, 2018; MITCHELL; CHEN; PORTNOY, 2016).

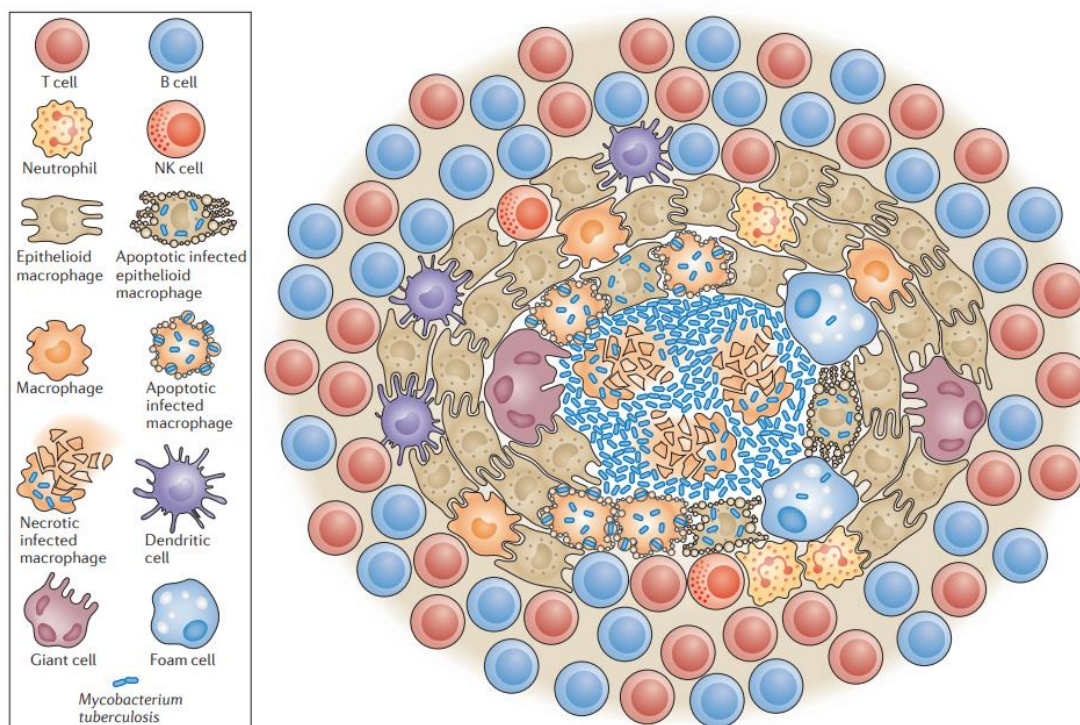
Estudos já evidenciaram que a presença do sistema de secreção ESX-1 em *Mtb* está relacionada à ruptura do fagossomo, o que representa uma etapa determinante para o estabelecimento da infecção (SIMEONE et al., 2012). Com a entrada do *Mtb* no citosol da célula hospedeira, o bacilo amplia a sua capacidade de multiplicação, acentuando o surto de crescimento da população micobacteriana intracelular, o que leva o macrófago infectado à morte por necrose (SIMEONE et al., 2012). Expostos ao tecido, os bacilos extracelulares facilitam um novo processo de fagocitose e repetem o mesmo ciclo de multiplicação, até o estabelecimento de uma resposta inflamatória no local da infecção (CARDONA, 2018).

Macrófagos infectados com os bacilos passam a expressar MMP-9 por uma via dependente de ESX-1 do patógeno (SALGAME, 2011). Estudos exploratórios em infecções por TB pulmonar, indicam que a expressão positiva de MMP-9 está associada ao recrutamento de macrófagos e monócitos (SALGAME, 2011; TAYLOR et al., 2006). Além disso, essas células infectadas passam a liberar quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), IL-1 β e IFN- γ , que atraem outros conjuntos celulares, tais como neutrófilos, células *natural killers* (NK) e células T $\gamma\delta$, que promovem inflamação e remodelação ou fibrose tecidual (EHLERS; SCHAIBLE, 2013; VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; VON STEBUT, 2017). Esse recrutamento contínuo de células inflamatórias para os sítios de infecção, potencializa ainda mais a inflamação local, com consequente lesão do tecido, formando uma estrutura conhecida como granuloma tuberculoso (VON STEBUT, 2017).

Em conjunto a esses eventos locais, DCs e macrófagos infectados por *Mtb* migram para os linfonodos, apresentando peptídeos processados do *Mtb* aos linfócitos T que, por sua vez, são ativados e se acumulam gradativamente no sítio de infecção (BATISTA et al., 2020). A presença de células T ativadas atua ampliando a capacidade de macrófagos em destruir as micobactérias intracelulares, e modulam a organização estrutural do granuloma a partir da liberação de mais fatores inflamatórios (EHLERS; SCHAIBLE, 2013). A partir daí, o arcabouço do granuloma passa a ser organizado com macrófagos

infectados no centro, circundados por linfócitos T e B (BATISTA et al., 2020). Além disso, outros conjuntos celulares povoam a estrutura dinâmica do granuloma, como células NK, fibroblastos e outras células que secretam componentes da matriz extracelular (Figura 1) (RAMAKRISHNAN, 2012).

Figura 1 – Estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso



Fonte: Ramakrishnan, 2012.

Os macrófagos presentes neste ciclo de resposta imune podem sofrer mudanças, como fusão em células gigantes multinucleadas/Langhans ou células espumosas ricas em lipídeos, mas funções associadas a essas mudanças ainda são pouco compreendidas (HELMING; GORDON, 2008). Dentro de semanas, com o recrutamento contínuo de células inflamatórias, o tubérculo tende a expandir-se. A partir daí, os bacilos diminuem sua taxa de crescimento e se restringem ao centro da estrutura do granuloma. Após este processo infeccioso, o paciente entra na LTBI (*latent TB infection*) com ausência de manifestações clínicas (BATISTA et al., 2020; ESTERHUYSE; LINHART; KAUFMANN, 2012).

A presença de mecanismos imunes inatos, como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de enzimas lisossômicas que danificam o tecido local, além

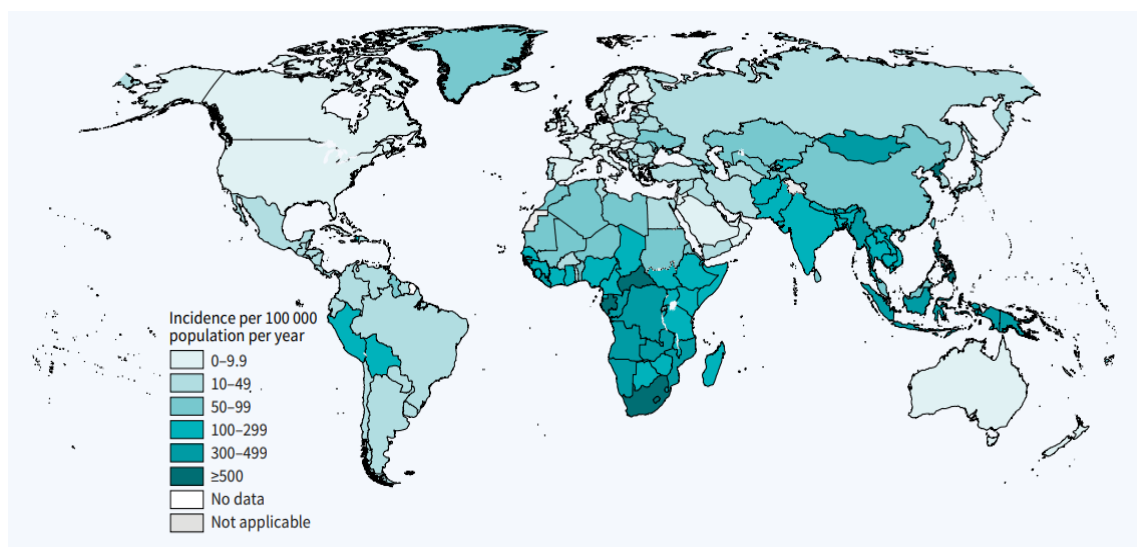
da necrose de macrófagos infectados, inicia a formação de um centro caseoso (BATISTA et al., 2020). De 5 a 10% dos casos de infecção por *Mtb*, em condições de fraca contenção dos bacilos em detrimento a uma baixa na resposta imune, essa manifestação pode progredir gerando liquefação e ruptura da estrutura do tubérculo pelo processo mecânico da respiração, o que libera os bacilos aprisionados no centro caseoso do granuloma para ocupar outros sítios dentro dos pulmões (ESTERHUYSE; LINHART; KAUFMANN, 2012; SUÁREZ et al., 2019). Além disso, DCs infectadas por *Mtb* podem desempenhar um importante papel no estabelecimento da TB por sua capacidade migratória especializada, contribuindo para a disseminação do *Mtb* para diferentes sítios no organismo (LIPSCOMB; MASTEN, 2002). No entanto, essa discussão sobre a interação *Mtb*-DC permanece pouco explorada.

Após anos de latência ou dormência, os bacilos podem ser reativados e os indivíduos bacilíferos passam a desenvolver a TB ativa com potencial disseminação pelas vias aéreas (DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2016; YOSHIMURA et al., 2021).

1.3 Epidemiologia da tuberculose

A partir de 2015, a TB passou a ser considerada a principal causa de morte por um único agente infeccioso, ano em que ultrapassou a infecção pelo HIV (WHO, 2015a). A OMS estima que um quarto da população mundial está infectada com o *Mtb*, o que equivale a aproximadamente dois bilhões de pessoas, com a maior parte dos casos concentrados em países da Ásia, África e América do Sul (Figura 2) (WHO, 2021a, 2022). As principais determinantes para a elevada incidência nestas regiões, são as condições sanitárias, ambientais, políticas e socioeconômicas, com influência direta em todos os estágios da patogênese da doença, risco de exposição, progressão, diagnóstico e tratamento da TB (HARGREAVES et al., 2011).

Figura 2 – Taxas estimadas de incidência de tuberculose, 2021



Fonte: WHO (2022).

Em 2020, com o início da pandemia de COVID-19, 1,3 milhão de mortes por TB foram relatadas frente a mais de 3,8 milhões de mortes associadas a infecções pelo SARS-COV-2 (FORCHETTE; SEBASTIAN; LIU, 2021; WHO, 2021b). No entanto, segundo a OMS, esses valores não representam a realidade de mortes pela TB, visto que a pandemia da COVID-19 impactou negativamente o número global de diagnósticos de pessoas recém-infectadas pelo *Mtb* e dificultou o acesso ao tratamento da TB, resultando em um aumento de casos e mortes subnotificadas (WHO, 2021a).

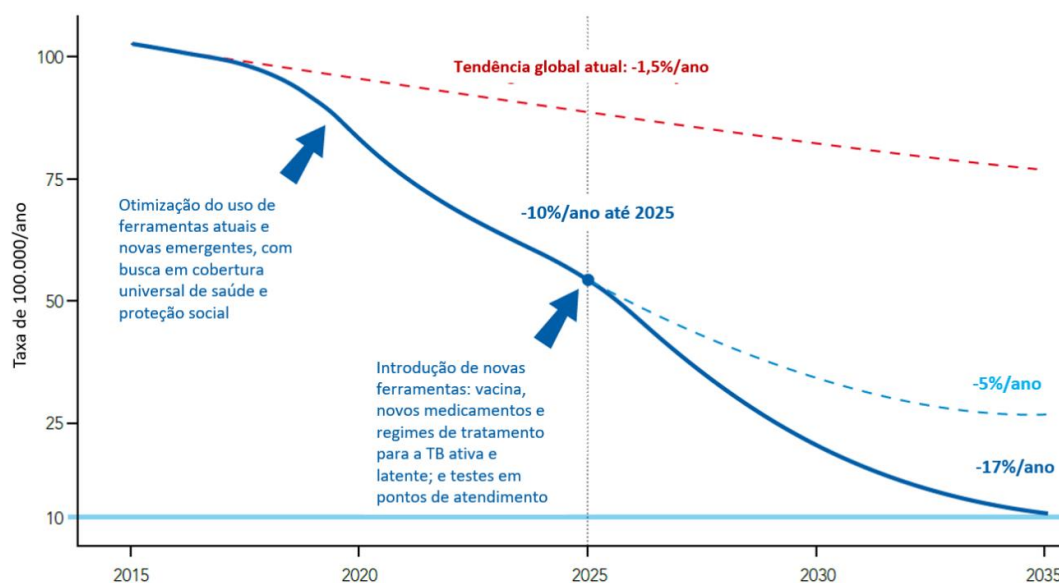
Apesar dos inúmeros investimentos em pesquisa de candidatos vacinais e a instalação de medidas preventivas para TB, os resultados não chegam a ser tão expressivos quando o assunto é reduzir a transmissão mundial da tuberculose (AAGAARD et al., 2011; SUBBARAO, 2021; ZHU et al., 2018).

Com o avanço da pandemia de COVID-19, novas preocupações com o número de infectados e mortos por TB aumentaram, já que pacientes com doenças pulmonares podem evoluir para quadros mais críticos, caso contraíam outra doença respiratória aguda (WHO, 2021b). Embora ainda limitados, estudos já evidenciaram uma maior probabilidade de morte em indivíduos coinfectados com SARS-COV-2 e *Mtb* (DAVIES, 2020).

Em 1994, com o desenvolvimento das estratégias DOTS (“*Directly Observed Treatment, Short-course*”) e *Stop TB* (2006 – 2015), a OMS estabeleceu os parâmetros

básicos para fornecer diagnóstico e tratamento da TB com melhor qualidade, principalmente em países pobres (MAHER; MIKULENCAK, 1999; WHO, 2006). Entre 2000 e 2014, a OMS estimou que mais de 43 milhões de vidas foram salvas em todo o mundo, como resultado de esforços combinados de promoção à saúde e intervenções sociais, atingindo a meta dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio para reverter a epidemia de TB (WHO, 2015b). Em 2015, a OMS publicou o documento “*The End TB Strategy*” sobre a estratégia de implementação de medidas para o fim da TB no mundo, incluindo metas e indicadores de alto nível. Dentre eles, destacam-se a redução de TB para menos de 10 casos por 100.000 habitantes ao ano, o que representa uma redução de 90%; e a diminuição absoluta de mortes por TB em 95% em comparação com 2015, visando o fim da epidemia até 2035 (Figura 3) (WHO, 2015b).

Figura 3 – Declínio desejado nas taxas globais de incidência de tuberculose até 2035



Fonte: adaptada de WHO, 2015b.

A estratégia fornecida pela OMS baseia-se em três pilares que abrangem as funções essenciais de cuidado e prevenção à saúde – sendo eles o setor social, a sociedade civil e as comunidades – bem como planos estratégicos governamentais e a intensificação da pesquisa e inovação (WHO, 2015b, 2015c). Em conjunto, regimes mais curtos e melhores para tratar doenças infecciosas e alto investimento no desenvolvimento e aplicação de uma vacina pré e pós-exposição (WHO, 2015c).

A transmissão de TB ocorre quando pessoas infectadas expõem o *Mtb* pelo ar (por tosse, fala, canto e espirro), tornando possível o contato desses bacilos com indivíduos saudáveis (WHO, 2021b). A doença pode afetar diversos sítios, com predominância de manifestações pulmonares em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (LYON; ROSSMAN, 2017; WHO, 2021b). Além dos pulmões, a TB pode afetar os linfonodos, peritônio, sistemas genitourinário e nervoso, regiões musculoesqueléticas, dentre outros, principalmente nos imunocomprometidos (GAMBHIR et al., 2017).

As manifestações clínicas mais comuns observadas em indivíduos com TB pulmonar incluem tosse persistente (> 3 semanas), febre intermitente, sudorese noturna, dores articulares, fraqueza e, em casos mais graves, hemoptise, emagrecimento, hemorragias e morte (DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2016; YOSHIMURA et al., 2021). No entanto, os sintomas variam com a progressão da doença e podem estar relacionados a outras causas, como tabagismo, alcoolismo, estresse e outras condições (LANGE et al., 2019; LYON; ROSSMAN, 2017).

A TB também pode se apresentar de forma latente, caracterizada pela presença de resposta imune aos antígenos das micobactérias, mas sem qualquer evidência clínica associada à doença (WHO, 2015c). Acreditava-se que a maioria dos indivíduos com LTBI não transmitia a doença, no entanto, estudos recentes têm demonstrado o potencial contaminante de indivíduos com TB latente, além destes mesmos indivíduos poderem desenvolver TB ativa e se tornarem novamente infecciosos (DINKELE et al., 2021; WHO, 2015a).

A TB é uma doença tratável com cerca de 85% de sucesso frente à correta execução da terapia medicamentosa (WHO, 2015a). Políticas de ações voltadas às abordagens multissetoriais a fim de diminuir a pobreza, desnutrição, infecções por HIV, tabagismo e diabetes, podem influenciar diretamente o número de pessoas que adquirem a infecção pelo *Mtb*, desenvolvem a doença e, eventualmente, morrem (WHO, 2021a).

No entanto, um dos grandes desafios em relação ao controle da epidemia de TB, está associado à presença das formas resistentes de *Mtb* (NATARAJAN et al., 2020; WHO, 2021a). Neste contexto, destacam-se a TB multidroga-resistente (MDR-TB), a extensivamente resistente a medicamentos (XDR-TB) e a totalmente resistente a medicamentos (TDR-TB), com a presença de cepas insensíveis a uma grande variedade de antibióticos, principalmente isoniazida e rifampicina (NATARAJAN et al., 2020; WHO, 2021a). Desde 2018, segundo a OMS, os números de MDR-TB confirmados se

mantém acima de 150.000 casos novos entre pacientes com TB ativa (WHO 2021a). No entanto, estima-se que apenas 50%, 61% e 71% dos pacientes infectados por *Mtb* foram devidamente testados para as formas resistentes nos anos de 2018, 2019 e 2020, respectivamente. Destes, menos de 20% têm algum acesso ao tratamento correto (CDC, 2015). Outras estratégias a fim de conscientizar e estimular a adesão ao tratamento da TB, incluem (i) descentralização da assistência em locais de grande população rural e alta taxa de co-infecção pelo HIV, (ii) especialização de médicos/clínicos para o melhor direcionamento do diagnóstico e contínuo tratamento de MDR-TB em áreas de conflito social, (iii) assistência direcionada a indivíduos privados de liberdade em constante exposição à TB e suas formas resistentes, (iv) uso de *softwares* para comunicação entre os profissionais de saúde, especialistas em TB e a população desassistida e (v) proteção financeira aos doentes e grupo de apoio psicossocial (BRUST et al., 2012; D'AMBROSIO et al., 2015; KESHAVJEE et al., 2008; QUELAPIO et al., 2010; SRIPAD et al., 2014).

1.4 Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

1.4.1 Histórico da BCG

As pesquisas em busca de candidatos vacinais antituberculose que culminaram no desenvolvimento da BCG são datadas de meados de 1900, na França, com os trabalhos pioneiros de Leon Charles Albert Calmette e Jean-Marie Camille Guérin, a partir de cultivos de uma cepa virulenta e selvagem de *Mycobacterium bovis* (CALMETTE; GUÉRIN, 1908; LUCA; MIHAESCU, 2013). Por ser filogeneticamente próximo ao *Mtb* (> 90% de homologia), foi possível observar que, progressivamente, o BCG foi capaz de induzir resposta imune protetiva contra a TB, mas ainda é desconhecida a real influência das diferenças entre essas duas espécies na derivação de uma vacina atenuada para a TB (BEHR, 2002b).

Entre 1908 e 1921, esta cepa de *M. bovis* foi cultivada em meio contendo fatias de batata embebidas em bile de carne bovina glicerinado, um composto que conduzia a uma atenuação ou diminuição na virulência do bacilo, ao longo de um período de 13 anos (LUCA; MIHAESCU, 2013). Cerca de 231 passagens foram necessárias para obtenção de uma cepa que não induzia a TB progressiva quando injetada em cobaias (LUCA;

MIHAESCU, 2013; YAMAZAKI-NAKASHIMADA et al., 2020). Em 1921, os ensaios de imunização com a vacina BCG começaram na Europa, apoiados por estudos clínicos na Noruega, Bélgica e França (FATIMA et al., 2020). Já em meados de 1924, pela sua eficácia, melhor custo de produção e termoestabilidade, a cepa Pasteur original foi propagada, sendo aceita na sociedade e distribuída pelo mundo em mais de 180 países (SINGH; NETEA; BISHAI, 2021). Sob diferentes regimes de cultivo, houve uma diversificação desta cepa de BCG em sub-cepas geneticamente distintas, com efetividade imunogênica altamente variável (ABDALLAH; BEHR, 2017; SINGH; NETEA; BISHAI, 2021). Com o crescente aumento das taxas de TB durante a Segunda Guerra Mundial, vários órgãos internacionais de saúde passaram a recomendar a vacinação da população com BCG (FATIMA et al., 2020) (Figura 5).

A BCG é a única vacina licenciada contra a TB até o momento, com proteção relatada principalmente contra TB disseminada grave/miliar e meningite tuberculosa em crianças (ABEBE, 2012). No Brasil, a cepa Moreau da vacina BCG chegou pelas mãos do médico uruguaio Julio Elvio Moreau (WHO, 2012). Em 2012, a vacina BCG Moreau foi aprovada pela OMS como uma das cepas de referência mundial, junto a Dinamarquesa, a Japão e a Rússia (WHO, 2012, 2013). A sua eficácia contra a TB pulmonar em adolescentes e adultos varia de 0 a 80%, especialmente quando comparada em diferentes populações e grupos de indivíduos (ABEBE, 2012). Estudos clínicos já relataram uma diminuição da mortalidade frente a outras patologias, como sepse neonatal, infecções do trato respiratório por outros agentes etiológicos, meningite meningocócica, gripe, pneumonia, leishmaniose e malária, além de doenças autoimunes, leucemia, alergias e diabetes infantil, o que sugere, para a vacina BCG, um mecanismo protetor heterólogo ou agnóstico (YAMAZAKI-NAKASHIMADA et al., 2020). No entanto, os mecanismos de proteção imunológica ainda não são completamente elucidados.

Em 1948, a OMS e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a partir de resultados favoráveis em testes com a vacina BCG, orientaram a realização de campanhas de vacinação em todo o mundo, promovendo a imunização de 1,5 bilhão de pessoas até 1974 (WHO, 2007). Em 1975, a vacina BCG foi incorporada ao Programa Ampliado de Vacinação da OMS (WHO, 2007).

1.4.2 Genealogia das cepas de BCG

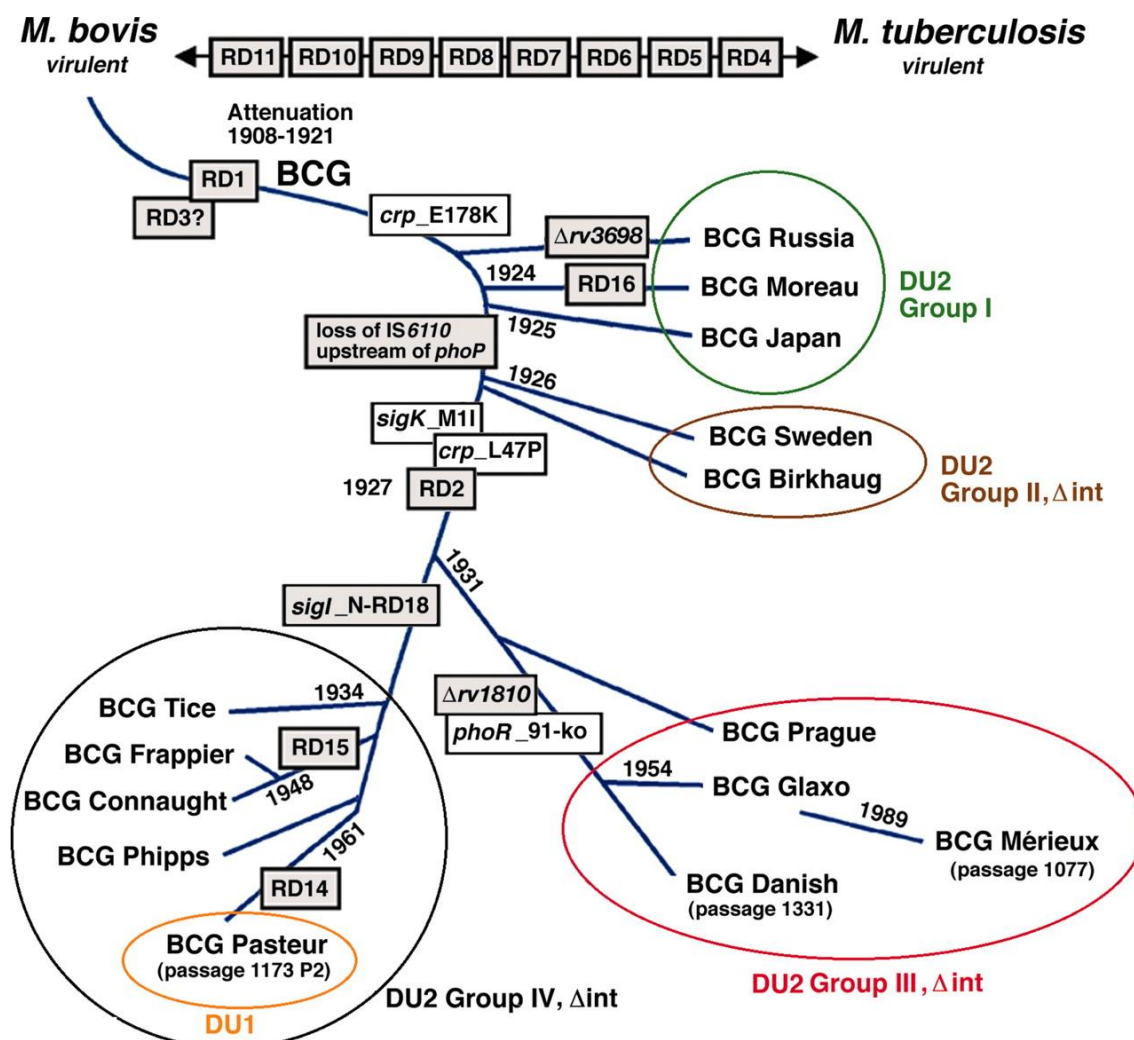
A reprodução fiel dos caminhos que levaram à atenuação da cepa de *M. bovis* parental e a geração das cepas de BCG atuais tornou-se impossível, pela perda da cepa Pasteur original durante a Primeira Guerra Mundial (KRYSZTOPA-GRZYBOWSKA; LUTYŃSKA, 2016). No entanto, a partir da utilização das técnicas de genômica comparativa, incluindo hibridização subtrativa, cromossomos artificiais bacterianos e microarranjo de DNA, além das análises de transcriptoma, algumas relações filogenéticas entre as cepas de BCG e as cepas virulentas de *M. bovis* e *Mtb* foram possíveis de se estabelecer (Figura 5) (BEHR, 2002c; BEHR et al., 1999; BROSCHE et al., 2007a; GORDON et al., 1999; KELLER; BÖTTGER; SANDER, 2008; MAHAIRAS et al., 1996).

Cerca de 50 representantes do BCG são reconhecidos atualmente, sendo divididos em “estirpes precoces”, obtidas até 1927, e “estirpes tardias”, obtidas entre 1927 e 1961 (KRYSZTOPA-GRZYBOWSKA; LUTYŃSKA, 2016). Diversos desses estudos genômicos têm demonstrado deleções, inserções, duplicações e polimorfismos de nucleotídeo único, que diferenciam as cepas quanto ao seu potencial de imunogenicidade (BROSCHE et al., 2007a; CHARLET et al., 2005). Um total de 129 genes encontram-se ausentes nas cepas do BCG, em comparação ao genoma de *Mtb* (BENÉVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005). Dentre os principais fatores de atenuação da virulência, está a perda do *locus* RD1 composto por nove genes, sendo eles codificantes das proteínas Rv3871, PE35, PPE68, ESAT-6, CFP-10, Rv3876, Rv3877, Rv3878 e Rv3879c presentes em *M. bovis* virulento, mas ausentes em todas as cepas do BCG (LANGE et al., 2022; MAHAIRAS et al., 1996). Embora a deleção de RD1 seja o principal fator que levou à perda de virulência da vacina BCG, estudos sugerem que outras modificações possam ter ocorrido para a completa atenuação da cepa de *M. bovis* que originou esta vacina, visto que a complementação do BCG com RD1, não restaura totalmente a virulência para o tipo selvagem (ABDALLAH et al., 2015; KOZAK et al., 2011; PYM et al., 2002). Outro exemplo na atenuação pode referir-se à ausência de RD3 em todas as cepas do BCG (MAHAIRAS et al., 1996). No entanto, por não ser encontrada em vários isolados de *M. bovis* e *Mtb*, o papel real da perda de RD3 na atenuação e geração da vacina BCG ainda permanece uma incógnita (MAHAIRAS et al., 1996).

Embora tenha sofrido várias deleções em relação à cepa parental, o genoma de algumas cepas do BCG pode apresentar tamanhos maiores do que de *M. bovis* selvagem,

como resultado dos polimorfismos apresentados, como as duplicações DU1 e DU2 em tandem independentes (BROSCH et al., 2007). Ainda segundo Brosch e colaboradores (2007), as cópias de DU1 são idênticas, e encontram-se apenas em BCG Pasteur, incluindo a origem de replicação *oriC*. Diferentemente, DU2 ocorre em quatro formas distintas (grupos I, II, III e IV), e está presente em todas as cepas do BCG (Figura 5). Neste tipo de duplicação DU2, os genes *Rv3300c*, codificante da pseudouridina-sintetase *phoY1*, associada ao sistema de transporte de fosfato, e *glpD2*, que codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, são compartilhados (BROSCH et al., 2007).

Figura 4 – Genealogia refinada das vacinas BCG



Fonte: Brosch et al. (2007).

Algumas deleções em outras regiões do genoma ocorrem em determinados grupos, como é o caso da ausência de RD2 em estirpes tardias, N-RD18 em estirpes do grupo IV, RD14 à BCG Pasteur, RD15 à BCG Frappier, e RD16 à BCG Moreau (KRYSZTOPA-GRZYBOWSKA; LUTYŃSKA, 2016).

O grupo das estirpes precoces, constituído pelos BCGs Rússia, Moreau, Japão, Suécia e Birkhaug, apresentam em comum a região RD2 intacta, com diferenças quanto à deleção de genes, como *Rv3698*, na BCG Rússia, e *Rv3405c*, na BCG Japão (ABDALLAH et al., 2015). A presença de RD2 no BCG indica que essas cepas estão mais intimamente relacionadas à cepa BCG Pasteur original, visto que a presença de fatores associados à RD2, como Mpt-64, encontram-se conservadas nas cepas virulentas de *M. bovis* e *Mtb*, e encontram-se ausentes nas cepas tardias (MAHAIRAS et al., 1996). Além disso, estudos utilizando técnicas de RFLP, demonstraram que o IS6110, um elemento transponível altamente conservado dentro do MTBC, apresenta-se em duas cópias nas cepas precoces, e apenas uma cópia nas demais cepas do BCG, reforçando a maior proximidade filogenética daquelas cepas ao *M. bovis* selvagem (BEHR, 2002c; MCEVOY et al., 2007).

Análises *in silico* utilizando banco de dados genéticos, demonstraram a exclusão de diversos epítomos direcionados às células T e B, como resultado da deleção de regiões gênicas associadas à virulência, como a RD1 (RITZ et al., 2012). Alguns epítomos associados à RD2 foram mantidos nas cepas Moreau, Rússia, Japão e Suécia, o que sugere que essas cepas do BCG contêm um maior número de antígenos reconhecidos pelo sistema imunológico (ZHANG et al., 2013). Mesmo com essas perdas importantes, uma imunização associada a indução de células T CD4⁺ polifuncionais, e uma maior secreção de citocinas do tipo Th1 em recém-nascidos vacinados com diferentes cepas de BCG foi relatada (RITZ et al., 2012).

1.5 Resposta imune frente à vacina BCG

A infecção por *Mtb* ocorre principalmente por meio das vias respiratórias, permitindo que células mieloides residentes na mucosa do pulmão, como macrófagos alveolares, DCs e monócitos, desencadeiem as primeiras respostas imunes inatas em contato com o bacilo (BARBER-MAYER; BARBER, 2015). Diferente disso, a vacina BCG, comumente administrada por via intradérmica, expõe os bacilos a neutrófilos,

macrófagos, células de Langerhans e DCs residentes na pele (COVIÁN et al., 2019). Essa diferença entre os sítios de infecção natural e de administração da vacina tem sido alvo de diversas discussões no meio científico. Segundo alguns estudos, o uso majoritário de vias parenterais para aplicação da vacina BCG é justificado pela rápida apresentação do teste cutâneo tuberculínico (TST – *tuberculin skin test*) positivo para o PPD (ARTENSTEIN, 2010). No entanto, pesquisas já demonstraram que a conversão ao TST positivo não demonstra necessariamente relevância protetiva direta, e não deve ser considerado como um parâmetro na potência da vacina BCG (HO et al., 2010).

A discussão do papel da vacina BCG frente a infecções por *Mtb* vai muito além da compreensão das diferenças existentes entre as vias de administração da vacina, visto que os mecanismos imunes induzidos atuam modulando a interação do bacilo com o organismo, e o próprio desenvolvimento da doença (COVIÁN et al., 2019).

Um cenário de exposição ao *Mtb* pode resultar em três desfechos: (i) a grande maioria (> 90% dos infectados) progride para LTBI em razão da resposta imune adaptativa que, embora seja protetora, restringe a infecção a sítios contidos no granuloma, sem eliminá-la (BHATT; SALGAME, 2007). Nestes casos, indivíduos com LTBI podem, eventualmente, desenvolver TB ativa sob condições de imunossupressão; (ii) uma minoria (5 a 10% dos infectados) desenvolvem diretamente a TB primária, condição ocasionada principalmente por falhas na resposta de controle da reprodução micobacteriana (BHATT; SALGAME, 2007). Estes indivíduos possuem alto potencial de contaminação, pela ausência ou enfraquecimento de mecanismos imunes de contenção; (iii) em casos mais raros, indivíduos que, independentemente da resposta imune adaptativa, permanecem não infectados, provavelmente pela rápida contenção do *Mtb* induzida por uma resposta imune inata efetiva (BHATT; SALGAME, 2007; MOLIVA; TURNER; TORRELLES, 2017). Em todos os casos, os desfechos associam-se às vias de modulação da resposta imunológica frente ao *Mtb*, o que torna o estudo dessas vias essencial para o combate à TB. No entanto, os correlatos de proteção relacionados a resposta imune protetiva frente as infecções pelo *Mtb*, e à própria vacina BCG, ainda não são completamente compreendidos (MOLIVA; TURNER; TORRELLES, 2017). Isso se deve, principalmente, pela dificuldade de condução de experimentos em seres humanos, devido a elevada influência dos próprios fatores microbiológicos, sociais e geográficos na eficácia da vacina BCG (AHMED et al., 2021). Contudo, diversos estudos realizados em animais e humanos sugerem que a vacinação com BCG induz a ativação heteróloga

de respostas imunes de linfócitos próximos, ou *bystander*, com descrição de proteção cruzada entre patógenos bacterianos, e de outras classes de microrganismos não relacionados (KAUFMANN et al., 2018; MOORLAG et al., 2020). Além disso, evidências demonstraram que a vacina BCG foi capaz de sensibilizar células imunes inatas, induzindo uma imunidade treinada, provavelmente mediada através de reprogramação epigenética (KAUFMANN et al., 2018; MOORLAG et al., 2020).

1.5.1 Imunidade Inata

Após ser inoculado na pele, o BCG é reconhecido pelas células imunes teciduais, uma vez já chamadas de histiócitos, por intermédio de diferentes Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs), que interagem com os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) dos bacilos, que são estruturas altamente conservadas em microrganismos, tais como fosfatidilinositol manose, lipoarabinomannana, fitocérol dimicocerosado, dimicolato de trealose, peptidoglicano, arabinogalactana e ácidos micólicos (DOCKRELL; SMITH, 2017). Isto pode se dar de forma direta pela célula, por PRRs acoplados a membrana ou presentes no citoplasma, ou indireta, por PRRs extracelulares solúveis, permitindo seu reconhecimento por outros receptores inatos (MOLIVA; TURNER; TORRELLES, 2017; SENDIDE et al., 2005). Os principais PRRs expressos pelas células imunes que reconhecem e se ligam aos PAMPs micobacterianos são MINCLE, MR, FcγRII/CD32, FcγRI/CD16, DC-SIGN/CD209, CD11b, CD11c, CD205, CD18, CR3, CR4; receptores semelhantes ao NOD/NOD2 (NLR), e receptores semelhantes a *Toll* (*Toll-like*/TLRs), tais como TLR2, TLR4 e TLR9 (MOLIVA; TURNER; TORRELLES, 2017; SENDIDE et al., 2005).

A ligação aos TLRs inicia um padrão de sinalização intracelular que culmina na ativação de NF-κB, e na indução de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (ADEREM; ULEVITCH, 2000). Estudos já relataram forte correlação entre células infectadas com o BCG e a alta expressão de CXCL8/10, induzidas por NF-κB (MÉNDEZ-SAMPERIO; PÉREZ; RIVERA, 2009; SAMPERIO; TREJO; MIRANDA, 2004). O CXCL10, e outras quimiocinas da família CXC, atuam principalmente no recrutamento de células imunes, tais como células T ativadas, monócitos e células NK, frente a processos infecciosos e inflamatórios, possibilitando uma intensa resposta local na presença da vacina BCG (SUSEK et al., 2018). Além disso, os TLRs são conhecidos como componentes-chave na ativação da imunidade adaptativa frente a patógenos

bacterianos, possuindo, inclusive, implicação direta na eficácia de vacinas BCG recombinantes (HELDWEIN et al., 2003; SAMEER; NISSAR, 2021). Além disso, NLRs (*neutrophil-lymphocyte count ration*), como o NOD2 em monócitos, e receptores da família das lectinas, como DC-SIGN/CD209 e Dectina-1 em DCs e macrófagos, atuam como peças fundamentais na ativação de uma resposta imune inata robusta frente a antígenos micobacterianos (AHMED et al., 2021; COVIÁN et al., 2019; KLEINNIJENHUIS et al., 2012).

1.5.2 *Imunidade Adaptativa*

A resposta imune adaptativa é uma parte crucial do sistema imune que fornece proteção específica contra patógenos (KAUFMANN, 2013). O desenvolvimento desta resposta inicia-se durante a apresentação dos peptídeos micobacterianos via APCs, para as células T imaturas, localizadas nos tecidos linfóides secundários ou no baço (KAUFMANN, 2013). Esse processo de apresentação antigênica é a chave para a ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, com subsequente produção de IFN- γ (COVIÁN et al., 2019; KAUFMANN, 2013). Essa citocina atua potencializando a resposta antimicobacteriana de macrófagos, além de contribuir com a produção de anticorpos pela ativação de células B (COVIÁN et al., 2019).

1.5.2.1 Imunidade Celular

A resposta imune celular induzida pela vacina BCG desempenha um papel fundamental na proteção contra a TB, visto que esta vacina é conhecida por sua capacidade de estimular uma resposta imune celular robusta (ANDERSEN; KAUFMANN, 2014; MOREL et al., 2008).

Um dos principais alvos de ativação da vacina BCG são os linfócitos T CD4⁺ que, ao serem estimulados com os peptídeos micobacterianos, se diferenciam em classes distintas de células auxiliares (linfócitos T *helper*), sendo elas a Th1, associadas principalmente à produção de IFN- γ , e a Th17, voltadas à produção de IL-17 (MOLIVA; TURNER; TORRELLES, 2017). Por outro lado, IL-4 já foi identificada a partir da produção de células Th2, mas em menor grau (PREZZEMOLO et al., 2014).

Até a 10^a semana após a administração do BCG, um efetivo de células T CD4⁺ e

T CD8⁺ específicas para micobactérias, proliferam e encontram-se localizadas no sangue periférico (HANEKOM, 2005). O mecanismo de resposta imune das células T CD8⁺ inclui citotoxicidade induzida pela liberação de perforinas, granzimas, e granzimas, além de secretar citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ (HANEKOM, 2005; MURPHY; REINER, 2002). No entanto, a relação da resposta celular de linfócitos T citotóxicos (CTLs) parece não ser o principal mecanismo de resposta à vacina BCG (HANEKOM, 2005; MURPHY; REINER, 2002).

Após os estágios de infecção ativa, as células T CD4⁺ e CD8⁺ mudam de fenótipo, estabelecendo uma memória imunológica associada a uma resposta imune mais forte, robusta e rápida frente a presença de antígenos bacterianos em uma seguinte infecção (SILVA et al., 1999). É importante ressaltar que a resposta imune celular frente à vacina BCG pode variar em termos de magnitude e duração entre indivíduos, pois é influenciada por fatores como idade, estado imunológico, histórico de exposição ao *Mtb*, dentre outros (KUMARI; MEENA, 2014).

1.5.2.2 Imunidade Humoral

Embora a resposta imune celular seja considerada a principal forma de proteção conferida pela vacina BCG, a resposta imune humoral também pode desempenhar um papel complementar (COVIÁN et al., 2019). Após a diferenciação das células T CD4⁺, ocorre uma secreção aumentada de citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação de células B que, dentro de 4 a 8 semanas após a vacinação com BCG, aumentam a produção de anticorpos da classe IgG, e induzem o estabelecimento de uma resposta de memória de longa duração (KUMARI; MEENA, 2014; MITCHELL; CHEN; PORTNOY, 2016; SEBINA et al., 2012). Os anticorpos IgG podem atuar diretamente na opsonização dos antígenos micobacterianos, facilitando o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, a fagocitose e a ativação do sistema complemento (URANGA et al., 2016). Além disso, linfócitos B podem secretar outras classes de anticorpos, como IgA, um importante anticorpo de mucosas com resposta direta a patógenos de vias aéreas, como o *Mtb* (HANSEN; BAETEN; DEN DUNNEN, 2019; URANGA et al., 2016).

1.6 Papel dos monócitos na resposta imune do hospedeiro

Os monócitos são componentes críticos de defesa, e desempenham um papel importante na resposta imune inata (SAMPATH et al., 2018). Devido a sua natureza heterogênea, a plasticidade e a capacidade de se diferenciarem em macrófagos ou DCs, os monócitos permitem o estabelecimento de uma ligação entre as respostas imunes inata e adaptativa (GUILLIAMS et al., 2014). Estudos relacionados a imunologia da vacina BCG são infrequentes, pois pouco se sabe sobre a interação do BCG com monócitos humanos (BUFFEN et al., 2014; KLEINNIJENHUIS et al., 2012). Os poucos estudos realizados em humanos vacinados com BCG, demonstraram um aumento na expressão de marcadores de ativação na superfície de monócitos, com sucessiva produção de IL-1 β (BUFFEN et al., 2014; KLEINNIJENHUIS et al., 2012). Além disso, foi verificado um impacto da vacinação com BCG na indução de modificações de histonas em todo o genoma de monócitos treinados, com redução da carga do vírus da febre amarela (BALBOA et al., 2013).

Os monócitos já foram descritos como componentes essenciais para a resposta imune precoce ao *Mtb*, e contribuem para o arcabouço do granuloma recém-formado (SIMAS et al., 2011a). Portanto, a definição de qual população de monócitos é alvo da infecção micobacteriana é crítica (BALBOA et al., 2013). Entretanto, apesar dos progressos na compreensão das respostas transcricionais e mecanismos de sinalização relacionados à resposta imunológica em infecção por *Mtb*, as interações célula-célula após infecções por micobactérias, principalmente entre as células da linhagem de monócitos, permanecem obscuras (SIMAS et al., 2011).

1.7 Apoptose

A apoptose é um mecanismo altamente conservado em muitos organismos, sendo descrita como um padrão de morte celular programada com importância direta na homeostase fisiológica, tendo em vista a sua contribuição na renovação celular e no desenvolvimento embrionário (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021; KIST; VUCIC, 2021). A apoptose também é essencial para o bom funcionamento do sistema imunológico, combatendo infecções de patógenos intracelulares que, eventualmente, possam “esconder-se” das células fagocitárias teciduais, além de remover células com danos irreparáveis ao DNA (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021).

Eventos bioquímicos em série levando a alterações de tamanho e forma celular, condensação da cromatina e outras modificações nucleares, acompanham a cascata de eventos metabólicos e morfológicos que marcam o processo apoptótico (ELMORE, 2007). O resultado final é a geração de fragmentos citoplasmáticos, conhecidos como corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por células imunes sem qualquer sinal de inflamação tecidual (GRIMSLEY; RAVICHANDRAN, 2003). Esses corpos apoptóticos são reconhecidos pelos fagócitos por causa da exposição da fosfatidilserina, um componente membranar encontrado normalmente no espaço citosólico, mas que, durante a apoptose, é exposto ao espaço externo da membrana plasmática (GRIMSLEY; RAVICHANDRAN, 2003). Assim, os corpos apoptóticos contendo componentes imunogênicos do bacilo processado pela fagocitose sofrerão eferocitose pelas DCs, garantindo a resposta imunológica eficaz a longo prazo via “*cross-priming*” e apresentação cruzada (GRIMSLEY; RAVICHANDRAN, 2003). Este mecanismo eficaz pode ser induzido pela vacina BCG, proporcionando a ativação de células T responsáveis pela memória imunológica (GRIMSLEY; RAVICHANDRAN, 2003).

O processo apoptótico é executado por meio de uma cadeia de sinalização altamente regulada, através da cooperação de moléculas de uma família de proteases baseadas em cisteína, conhecidas como caspases (FAN et al., 2005). As caspases são divididas em iniciadoras (caspases-8, -2, -9 e -10), as quais estão associadas à iniciação do processo de apoptose, e em efetoras (caspases-3, -6 e -7), envolvidas na execução da morte celular (FAN et al., 2005; POETA et al., 2008; TESTA; RICCIONI, 2007).

Duas vias principais responsáveis pela ativação das caspases são descritas, sendo elas a extrínseca e a intrínseca. Essas vias convergem quando se trata de seu resultado final: a ativação das caspases efetoras e a indução da apoptose, mas que, individualmente, divergem quando aos mecanismos indutores, baseados em diferentes moléculas iniciadoras (POETA et al., 2008). Existe ainda uma via adicional, atribuída ao processo apoptótico que é dependente de CTLs, e envolve as moléculas perforina e granzima (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003).

1.7.1 Via extrínseca

A via extrínseca é desencadeada a partir da interação de ligantes de morte aos receptores membranares Fas (CD95), TNFR1 (CD120a) e TRAILR

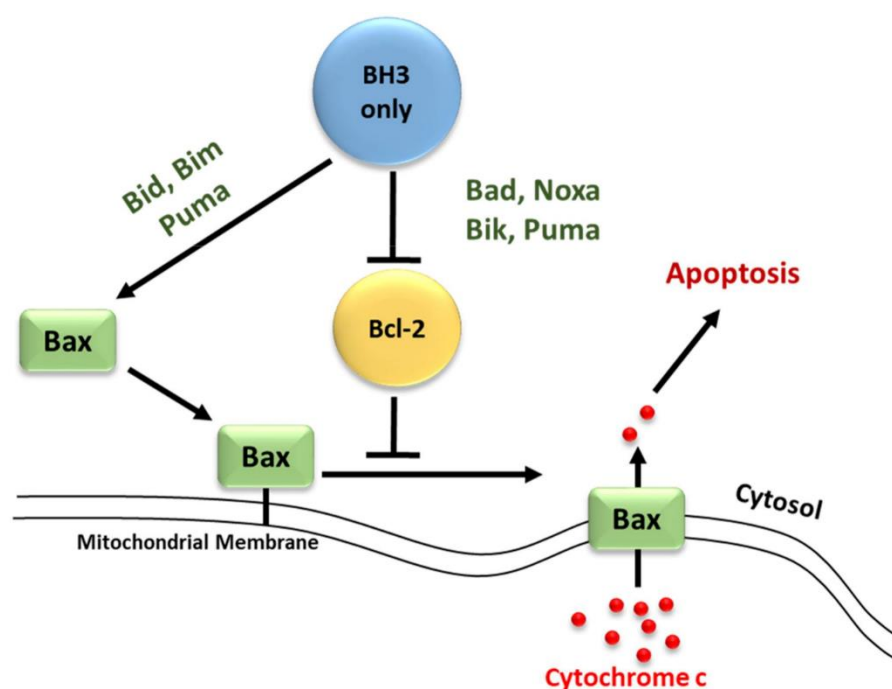
(TRAILR1/DR4/CD261 e TRAILR2/DR5/CD262), todos membros da família do TNF (CABRINI; NAHMOD; GEFFNER, 2010; LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). A ativação se dá pela expressão de ligantes pró-apoptóticos, produzidos principalmente por CTLs e NK, como o FasL (CD95L), TNF e TRAIL (CD253) (WILSON; DIXIT; ASHKENAZI, 2009). Essa interação ligante-receptor recruta proteínas citoplasmáticas associadas ao Fas contendo o Domínio de Morte (*Death Domain* – DD), como FADD e TRADD, que iniciam o recrutamento das caspases, através da formação de um complexo indutor de morte celular, conhecido como DISC (*Death-inducing signaling complex*) (PETER; KRAMMER, 2003). O DISC consiste em filamentos de receptores com domínios FADD e o Domínio Efetor de Morte (DED), associados as pró-caspases-8 e -10, e proteínas celulares inibitórias semelhantes a FLICE (c-FLIP) (SEYREK et al., 2020). O DD do receptor membranar, interage com o FADD que, por sua vez, interage com os DEDs das pró-caspases-8/10 e de c-FLIP (BEDOUI; HEROLD; STRASSER, 2020). Essas interações levam à dimerização do filamento DED, que ativa as pró-caspases-8/10, induzindo a cascata das caspases de duas formas: diretamente, pela clivagem da pró-caspase-3; ou indiretamente, induzindo a via intrínseca pela clivagem de BID, resultando em morte celular por apoptose (DICKENS et al., 2012; FU et al., 2016).

1.7.2 Via intrínseca

A via intrínseca da apoptose, também conhecida como via mitocondrial, não é dependente de ligantes extracelulares e receptores de morte, e normalmente é induzida em decorrência de lesões intracelulares, como danos no DNA, hipóxia, privação de fatores de sobrevivência, radiações, radicais livres, dentre outros (ELMORE, 2007; YOULE; STRASSER, 2008). Os mecanismos associados à morte ou sobrevivência da célula são regulados por proteínas da família Bcl-2, que compreende mais de uma dúzia de membros relacionados entre si pela presença dos domínios BH (BH1-4), incluindo os representantes anti-apoptóticos, como BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 E A1A; membros pró-apoptóticos das famílias BAX/BAK1, tratados como efetores de morte, e BH3 (*BH3-only*), tais como BIM, BID, PUMA, BAD, BIK, NOXA e HRK (CZABOTAR et al., 2014; FAIRLIE; TRAN; LEE, 2020; YOULE; STRASSER, 2008).

BAK1, formando poros na membrana externa da mitocôndria, o que resulta na perda do potencial transmembranar mitocondrial e na liberação de citocromo c, um elemento essencial à cadeia respiratória (FAIRLIE; TRAN; LEE, 2020; MIKHAILOV et al., 2003; YOULE; STRASSER, 2008). Uma vez no citoplasma, o citocromo c ativa o fator APAF-1 e a pró-caspase-9, formando o apoptossoma, um complexo multiproteico que inicia a cascata das caspases por uma via dependente das caspases-9 e -3 (GALLUZZI et al., 2012; HILL et al., 2004; SHAKERI; KHEIROLLAHI; DAVOODI, 2017). Os fatores SMAC e OMI/HTRA2, liberados com o citocromo c, bloqueiam a atividade de proteínas inibitórias das caspases, como IAP, facilitando a ativação da caspase-9 (VAN LOO et al., 2002; VERHAGEN et al., 2000). Em conjunto, AIF e a endonuclease G se direcionam ao núcleo, onde iniciam um processo de fragmentação do DNA por uma via independente da ativação das caspases (ELMORE, 2007; JOZA et al., 2001).

Figura 6 – Ativação direta e indireta da via apoptótica intrínseca.



Fonte: Roufayel et al. (2022).

Outras proteínas da família BCL-2 possuem papel crucial no controle da apoptose. Recentemente, Roufayel e colaboradores (2022) descrevem dois modelos de ativação de BAX/BAK1, sendo a via direta atuando de forma direcionada na ativação e oligomerização de BAX/BAK1, tendo como principais ativadores os membros de BH3

(BID, BIM E PUMA). A via indireta é direcionada à inibição das proteínas anti-apoptóticas, através de interações entre os membros pró-apoptóticos BAD, NOXA, BIK e PUMA, classificados como sensibilizadores, que sequestram os alvos anti-apoptóticos, com subsequente neutralização de sinalização de sobrevivência, e consequente ativação de BAX/BAK1 (Figura 7) (ROUFAYEL et al., 2022). O balanço entre as proteínas pró- e anti-apoptóticas, e a interação entre elas, é o mecanismo-chave associado à indução do processo apoptótico propriamente dito (KIM et al., 2009a).

1.7.3 A apoptose e a resposta imune

O papel da apoptose na TB tem sido amplamente debatido. Para manter a homeostase, as células mortas são frequentemente limpas dos tecidos pelos fagócitos do hospedeiro, no qual monócitos e macrófagos são responsáveis pela neutralização de ameaças potenciais causadas por detritos já internalizados (DELOGU et al., 2015; DIVANGAHI; BEHAR; REMOLD, 2013; FRATAZZI et al., 1999). A apoptose induz a liberação de sinais que recrutam células fagocíticas com subsequente promoção de depuração celular, processo este induzido pela externalização da Fosfatidilserina, a partir de um mecanismo dependente de caspase-3/7 (RAVICHANDRAN, 2010). Além disso, a partir da liberação dos corpos apoptóticos, pelo “*cross-priming*” e pela apresentação cruzada, existe o reconhecimento e a apresentação antigênica específica, principalmente pelas APCs (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021). Dependendo do tipo e *status* da APC, os antígenos presentes nos corpos apoptóticos podem representar um potente imunógeno ou estímulo tolerogênico para linfócitos T (BEHAR et al., 2011; BELLONE, 2000).

Por um lado, estudos sustentam que a apoptose é um mecanismo eficaz de defesa da imunidade inata que o *Mtb* é capaz de inibir parcialmente (BAR-OZ; MEIR; BARKAN, 2022). Por outro lado, a apoptose também pode aumentar a indução da resposta imune específica ao *Mtb*, de modo que a apoptose excessiva seria prejudicial para a bactéria (COVIÁN et al., 2019). De fato, o padrão apropriado de morte celular é importante para uma resposta imune inata protetora: a apoptose de monócitos/macrófagos representa uma estratégia crítica do hospedeiro para controlar a infecção por *Mtb* e limitar a doença (DELOGU et al., 2015; DIVANGAHI; BEHAR; REMOLD, 2013; FRATAZZI et al., 1999).

Atualmente, diversos estudos focalizam na identificação e na quantificação dos diferentes marcadores de apoptose na célula infectada com a vacina BCG, e desta forma, buscam inferir a possível via de morte celular (LAI et al., 2007; SIMAS et al., 2011a). Para este fim, utilizam-se de técnicas de citometria de fluxo e de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*polymerase chain reation*, qRT-PCR) (LAI et al., 2007; SIMAS et al., 2011a).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de seu baixo custo e capacidade de indução de respostas imunológicas mais robustas, a vacina BCG tem sido motivo de controvérsia pela elevada variação dos efeitos, e a baixa eficácia contra as formas pulmonares da TB, principalmente em adultos (FAVOROV et al., 2012; KLEYDSON BONFIM ANDRADE, 2015). Desta maneira, a necessidade de investigar como a vacina BCG é capaz de induzir proteção, mesmo que parcial, em prol da redução da incidência de TB no mundo é inquestionável.

A indução de apoptose de células do hospedeiro aumenta a efetividade vacinal, pois quanto maior o grau de apoptose, maior o potencial imunogênico e protetor através dos mecanismos de apresentação, estimulação e memória de células T (COSTA, 2016). Estudos já demonstraram diferenças quantitativas quanto ao padrão de morte celular em monócitos infectados com a vacina BCG Moreau (SIMAS et al., 2011a), bem como diferenças qualitativas quanto ao nível de apoptose induzida por diferentes cepas desta vacina (PONTE et al., 2018a). No entanto, muitos questionamentos referentes à interação da vacina BCG com o sistema imune, e a relação da apoptose nesse processo, permanecem ainda sem respostas. Portanto, a implementação de estudos pré-clínicos e clínicos que tenham como premissa conhecer os caminhos bioquímicos e moleculares é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos de resposta imunológica induzidos pela vacina BCG, a fim de direcionar as pesquisas em busca de metodologias vacinais mais eficazes.

Além disso, desvendar o mecanismo de proteção da vacina BCG e onde ocorrem divergências entre as cepas, é um importante passo para uma possível melhoria dessa vacina, garantindo uma nova perspectiva nas estratégias de combate e proteção contra a TB. Portanto, estudos em coortes brasileiras que determinem e comparem a via de morte celular entre as cepas Pasteur, Dinamarquesa, Russia e Moreau da vacina BCG em um modelo *in vitro* com células mononucleares humanas, se justificam como premissa de entendimento dessa vacina secular.

Baseado nisso, o presente estudo foi concebido para tentar compreender o perfil de marcadores apoptóticos a nível molecular, bem como os perfis de morte por apoptose e necrose, além de citocinas pró e anti-inflamatórias induzidas por distintas cepas da vacina BCG, sendo estas relacionadas às respostas imunes celulares *in vitro* em humanos, no intuito de identificar os mecanismos específicos que podem conferir proteção e influenciar no desenvolvimento de futuras vacinas modificadas. Atualmente, se faz

necessária a detecção de mais alvos regulatórios da via intrínseca da apoptose, tanto pró-quanto anti-apoptótica, uma vez que estudos baseados em análises moleculares de marcadores apoptóticos ainda não são totalmente esclarecedores (ANTAS et al., 2019). Um melhor entendimento dos fatores que atuam na resposta imune contra a TB ajudaria a identificar os processos pelos quais tal proteção é alcançada. Além disso, estas análises podem trazer esclarecimentos e aplicações em investimentos no ramo da vacinologia, além de contribuir em novas abordagens terapêuticas.

A partir disto, a hipótese deste trabalho é que as distintas cepas de BCG induzem de forma diferencial a apoptose, a partir da modulação positiva na expressão de marcadores moleculares indutores da via intrínseca, limitação de marcadores inibidores desta via e aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

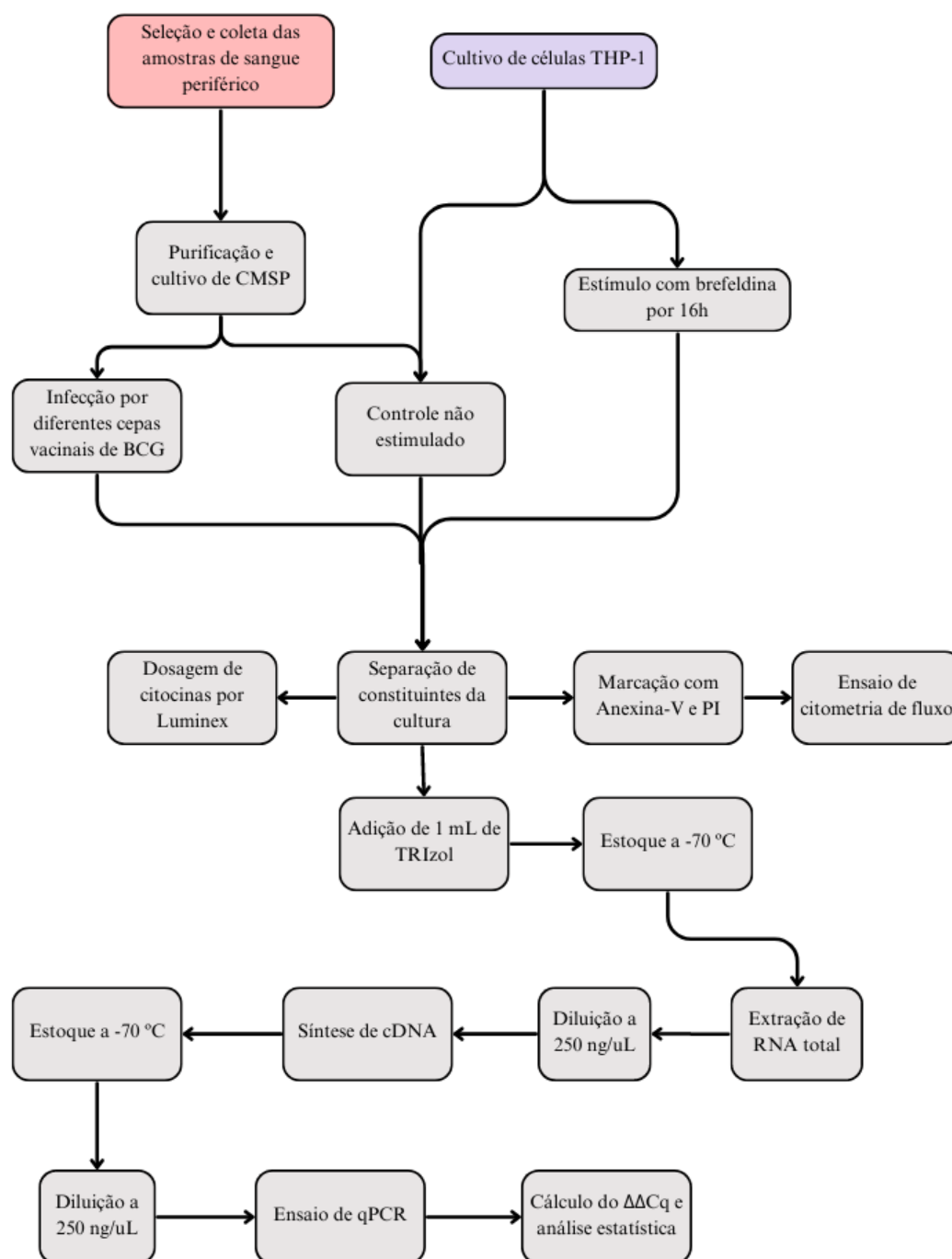
Comparar *in vitro* as cepas Pasteur, Dinamarquesa, Russia e Moreau da vacina BCG quanto à indução de marcadores apoptóticos em adultos saudáveis.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) em tempo real para detectar os alvos BAD, BAX, BAK1, NOXA, PUMA, BCL-XL, MCL-1, GAPDH, 18S, β -actina e β -2-microglobulina em células mononucleares humanas estimuladas com as cepas de BCG Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia.
- Quantificar *in vitro* os mRNA dos componentes BAD, BAX, BAK1, NOXA, PUMA, BCL-XL e MCL-1 da via intrínseca de apoptose em mononucleares humanos, frente a ensaios de infecção com as cepas BCG Pasteur, Dinamarquesa, Russia e Moreau.
- Investigar *in vitro* os níveis de apoptose e necrose em mononucleares humanos, frente a ensaios de infecção com as cepas BCG Moreau e Russia.
- Determinar *in vitro* os níveis de IFN- γ , IL-1 β , TNF e IL-10 em mononucleares humanos, frente a ensaios de infecção com as cepas BCG Moreau e Russia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo



Legenda: CMSP (Célula Mononucleares de Sangue Periférico), Anexina-V (marcador com alta afinidade pela fosfatidilserina), PI (marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio).

Fonte: próprio autor (2023).

4.2 População de estudo e considerações éticas

Trata-se de um estudo descritivo, exploratório e seccional, de um corte transversal com uma amostragem de conveniência, a partir de ensaios conduzidos com 42 amostras clínicas de sangue venoso de indivíduos saudáveis, maiores de 18 anos, a partir de doações voluntárias e anônimas. Como critérios de inclusão, os indivíduos não possuíam qualquer evidência de TB ativa e nenhum histórico de TB no passado, ausência de qualquer imunodeficiência conhecida (como diabetes *mellitus*, câncer e outras malignidades), além de não serem usuários de agentes imunossupressores.

As amostras foram obtidas por venopunção, respeitando as normas de precauções na manipulação e descarte de material biológico. Essas amostras foram processadas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (SH-HUCFF). Todas as amostras foram testadas para patologias no referido centro de processamento, de acordo com recomendações do MS. Todos os indivíduos foram devidamente instruídos quanto ao objetivo da pesquisa, sigilo de dados pessoais, mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, no ato da coleta. Qualquer publicação realizada ou futura não apresentará a identificação dos indivíduos envolvidos no estudo. O presente estudo foi aprovado pelos respectivos comitês de ética em pesquisa do HUCFF (UFRJ; protocolo # 357750145.0.0000.5258), e do IOC (FIOCRUZ; protocolo # 357755014.0.00005248). Todas as etapas de coleta, processamento, transporte, manuseio e divulgação dos resultados seguiram os aspectos éticos em pesquisa envolvendo seres humanos descritos na Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012.

Os ensaios de expressão gênica foram realizados no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará e os ensaios de citometria de fluxo e dosagem de citocinas foram realizados na Plataforma Multiusuários Institucional do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ.

4.3 Purificação das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) humanas

Em câmaras de fluxo laminar e ambiente estéril, as amostras clínicas foram processadas para a separação do anel leucocitário (contendo leucócitos e plaquetas) do restante dos constituintes sanguíneos, realizadas em cabine de segurança biológica do tipo NB-2. Para este procedimento, cerca de 20 mL da amostra foi transferida para um tubo

de 50 mL (Falcon, USA) contendo 20 mL de PBS estéril (LGC-Biotecnologia). Em um outro tubo vazio, 10 mL de Ficoll-Histopaque (Sigma Immunochemicals, USA) foi adicionado e, posteriormente, a amostra 1:1 acima foi sobreposta, a fim de não gerar mistura de substâncias, gerando uma solução de 40 mL de amostra + PBS. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 400 ×g, por 25 minutos a uma temperatura de 25 °C. O anel leucocitário foi então separado do restante da solução, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Por fim, o anel leucocitário foi lavado com PBS a 4 °C, a 350 ×g por 10 minutos.

4.4 Cultivo celular das amostras de linhagem celular THP-1

No presente estudo, amostras de linhagem celular da leucemia monocítica aguda humana (THP-1) adquiridas pelo *American Type Culture Collection* (ATCC, USA), foram utilizadas como controles para a padronização dos experimentos de qRT-PCR. Para manutenção da integridade celular, as amostras de THP-1 foram armazenadas em soro fetal bovino a 10% (SFB - Sigma Immunochemicals, USA) e 10% de Dimetilsufóxido (DMSO – Thermofisher, USA). Esse tratamento permitiu o posterior congelamento e armazenamento dessas amostras em nitrogênio líquido.

Para o cultivo celular, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente até atingir cerca de 70% de sua composição em estado líquido. Posteriormente, em cabine de segurança biológica do tipo NB-2, as células de linhagem THP-1 foram transferidas para um tubo de 15 mL (Falcon, USA) contendo SFB a 10% em uma proporção de 2:1. Em seguida, o material foi centrifugado a 350 ×g por 10 minutos a 25 °C. Após a centrifugação, as células foram lavadas com meio RPMI-1640 (Sigma Immunochemicals, USA), até a formação de um *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de SFB 10%. As células THP-1 foram então transferidas para uma garrafa de cultura de 50 mL (Corning, USA), e deixadas em estufa de ambiente úmido a 37 °C, em 5% de CO₂, até o momento do ensaio de infecção.

Para posterior determinação da concentração e viabilidade das culturas, as células foram adicionadas em microtubos na mesma proporção de 20 µL de Azul de Tripan (Sigma Immunochemicals, USA), e transferidas para uma câmara de Neubauer. As células viáveis foram determinadas a partir da ausência de coloração na observação em microscopia óptica. Os quatro campos laterais foram contados, o valor resultante foi dividido por quatro para a determinação de média, e o valor final multiplicado por dois

(fator de diluição). Por fim, foi incluído o fator de correção da câmara de Neubauer a $10^4/\text{mL}$.

4.5 Ensaio de infecção de CMSP com as cepas de BCG, e estimulação da linhagem celular THP-1 com brefeldina-A

As cepas da vacina BCG foram adquiridas de fontes não comerciais e sem fins lucrativos tais como cepa Russia (Ambulatório Souza Araujo – ASA, Brasil), Moreau RDJ (FAP, Brasil), Pasteur e Dinamarquesa (Fiocruz, Brasil). Cada cepa foi descongelada e estocada em glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou reconstituídas em PBS para os ensaios de infecção.

As CMSPs foram semeadas em tubos de polipropileno (Corning, USA) na concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. As infecções prosseguiram com MOI (*multiplicity of infection*) 2:1 para cada cepa de BCG em diferentes tubos para cada amostra. O tempo de infecção em estufa úmida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e CO_2 a 5% foi estabelecido em 16 horas para os testes de qRT-PCR, e 48 horas para a detecção de morte celular e a dosagem de citocinas.

As células da linhagem THP-1, devido a sua alta capacidade proliferativa, foram separadas em tubos de polipropileno na concentração de $4 \times 10^5/\text{mL}$ de meio RPMI-1640 com SFB a 10%. O MOI permaneceu em 2:1 no tempo de 16 horas, em estufa úmida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com CO_2 a 5%. O MOI ideal e tempo de infecção foram estabelecidos a partir dos estudos de Ponte e colaboradores (2018).

Para o controle positivo, amostras de linhagem THP-1 foram estimuladas com a brefeldina-A (Hypofarma, Brasil) na concentração de $100\text{ }\mu\text{M}$ com o mesmo tempo de estímulo pré-estabelecido de 16 horas.

Após as infecções e estimulações apenas no tempo de 16 horas, as culturas foram centrifugadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $350 \times g$ por 10 minutos. O *pellet* foi recuperado e ressuspensionado com 1 mL de Trizol™. As amostras seguiram para o congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios de extração de RNA.

4.6 Extração e quantificação de RNA das amostras

O RNA foi extraído utilizando a técnica combinada de fenol-clorofórmio, baseada no método de Chomczynski e Sacchi (1987), a partir do uso do reagente TRIzol™. O

reagente TRIzol™ é uma solução monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina e outros componentes patenteados, que mantém a integridade do RNA ao passo que rompe a célula e dissolve os componentes celulares (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987; INVITROGEN, 2020). Seguindo as recomendações do fabricante, as amostras de cultura foram lentamente descongeladas minutos antes do início das etapas de extração de RNA. Após o descongelamento, 200 µL de clorofórmio foi adicionado para cada 750 µL de reagente TRIzol™ usado para a lise celular, com proporção TRIzol-amostra estabelecida em 3:1. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada por 3 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 15 minutos a 12.000 ×g. Somente a fase aquosa contendo o *pool* de RNA celular foi recuperado para um novo tubo. Posteriormente, 500 µL de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante aquoso contendo RNA, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Ao término da incubação, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 12.000 ×g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o RNA formado foi ressuscitado em 1 mL de etanol 75%. O material ressuscitado foi então agitado suavemente, e centrifugado a 7.500 ×g por 5 minutos a 4 °C. A extração seguiu com o descarte do sobrenadante e exposição do precipitado ao ar livre por 10 minutos para secar. Por fim, o precipitado foi solubilizado em 30 µL de água livre de RNase, e incubado a 55 °C por 10 minutos.

Após a extração, o RNA foi quantificado em Nanodrop®. O RNA então seguiu diretamente para síntese de cDNA, através da reação de transcrição reversa, ou foi congelado em ultrafreezer a -70 °C para análises posteriores.

4.7 Ensaios de Transcrição Reversa

Após a extração e quantificação, as amostras de RNA seguiram para a síntese de DNA complementar (cDNA) pela reação da transcriptase reversa por meio do kit SuperScript™ IV VILO Master Mix (Invitrogen, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (INVITROGEN, 2016). A concentração de RNA utilizada para a síntese de cDNA foi estabelecida em 1,0 µg, a partir da leitura em Nanodrop®. O volume de SuperScript™ IV VILO Master Mix foi fixado em 4 µL e o volume de água foi variável, dependendo da concentração de cada amostra de RNA usado como *template*. As condições de ciclagem para a reação iniciaram-se com 25 °C por 10 minutos para a

etapa de anelamento dos iniciadores, seguido de 50 °C por 10 minutos para a transcrição reversa do RNA e finalizada com a etapa de inativação enzimática a 85 °C por 5 minutos. O cDNA recém sintetizado foi quantificado e diluído a 250 ng. Em seguida, a amostra foi congelada a -20 °C até a sua utilização nas reações de qRT-PCR em tempo real.

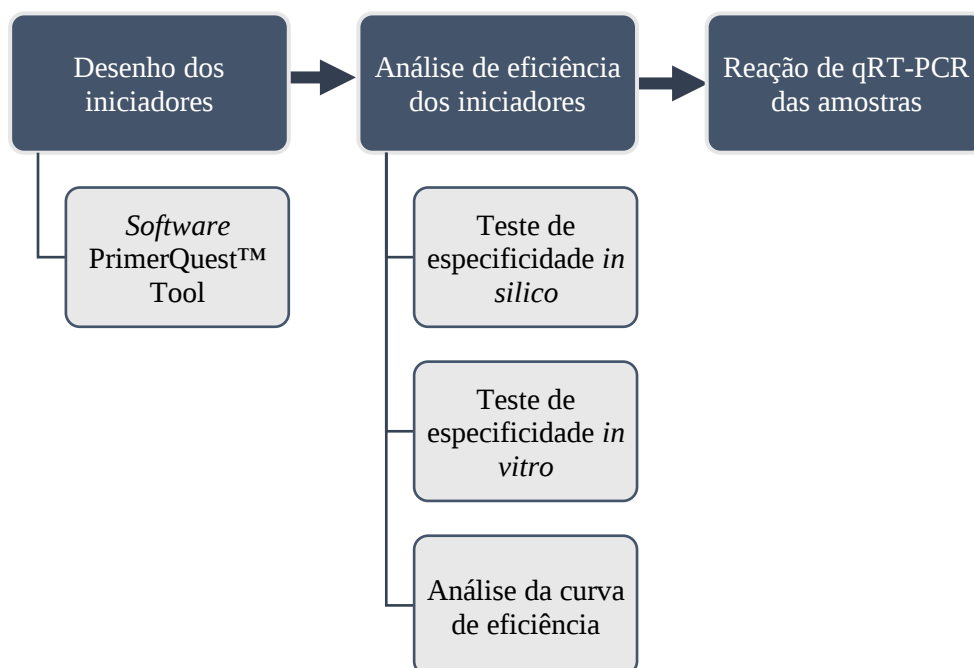
4.8 Preparo dos iniciadores para as reações de qRT-PCR em tempo real

4.8.1 Desenho e padronização dos iniciadores

Os iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR em tempo real foram desenhados através do *software* PrimerQuest™ Tool (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). As sequências de cada iniciador desenhado para os alvos, bem como as características dos produtos de amplificação (*amplicons*), estão descritas na tabela 1.

Cada par de oligonucleotídeo foi analisado quanto a sua especificidade ao gene de interesse. Para isto, os tamanhos dos produtos de amplificação gerados a partir das análises *in silico* foram comparados, utilizando o *software* Primer-BLAST (NCBI BLAST – NIH, USA). Além disso, as concentrações de uso ideais e a eficiência de cada par de iniciadores foram determinadas.

Figura 7 – Esquema de construção dos iniciadores para os ensaios de PCR



Fonte: própria do autor (2023).

Tabela 1 – Descrição dos genes-alvo e iniciadores utilizados nos ensaios de PCR

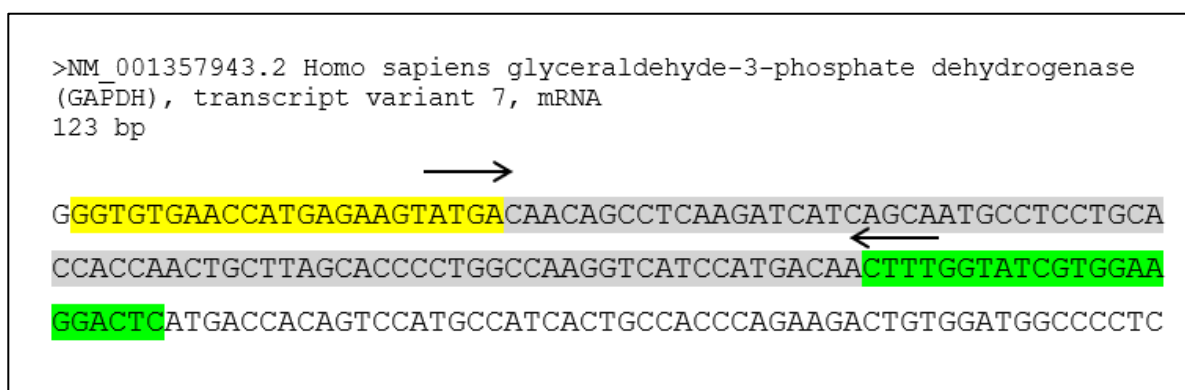
<i>Gene</i> <i>Nº do GenBank</i>	<i>Sequência 5' → 3'</i>	<i>Amplicon (pb)</i>	<i>E</i>
GAPDH* <i>NM_001357943.2</i>	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA GAGTCCTTCCACGATACCAAAG	123	1,91
18S* <i>XM_047442803.1</i>	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT TGGCAAATGCTTTCGCTTT	63	1,87
B2M* <i>NM_004048.4</i>	GCTCCGTGGCCTTAGCTGT ACGTGAGTAAACCTGAATCTTTGGA	89	1,84
ACTB* <i>NM_001101.5</i>	ATTGCCGACAGGATGCAGAA GCTGATCCACATCTGCTGGAA	150	1,84
BAD <i>NM_032989.3</i>	GACGAGTTTGTGGACTCCTTTA CAAGTTCCGATCCCACCAG	123	1,86
BAX <i>XM_047439168.1</i>	TTCTGACGGCAACTTCAACT CAGCCCATGATGGTTCTGAT	117	1,84
BAK1 <i>NM_001188.4</i>	AGGGGTGGCTGGGTGG TTAAGTCCAGGCAGGGGTCT	168	1,84
NOXA <i>NM_021127.3</i>	GTGCTACTCAACTCAGGAGATT AAACTCTTCTGCTCAGGAACC	89	1,85
PUMA <i>NM_001127240.3</i>	TGACCACTGGCATTCAATTTGG CCTCCCTCTTCCGAGATTTC	124	1,93
Bcl-xL <i>NM_138578.3</i>	GGTGGTTGACTTTCTCTCTAC TCTCCGATTCAGTCCCTTCT	110	1,83
MCL-1 <i>NM_182763.3</i>	TGGGTTTGTGGAGTTCTTCCA ACACCTGCAAAAGCCAGCA	75	1,82

Legenda: Nº do GenBank – refere-se ao número de acesso ao gene armazenado no GenBank (<https://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); Tam. do amp. (pb) – tamanho do produto de amplificação em pares de base; E – Eficiência calculada a partir das análises de regressão linear e valores de *slope* dos Ct's de cada diluição. *genes de referência (*housekeeping genes*). **Fonte:** própria do autor (2023).

4.8.2 Ensaios de especificidade dos iniciadores

Os produtos de amplificação esperados foram inicialmente analisados *in silico* com o auxílio do *software* Primer-BLAST (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI), a partir das sequências de cada iniciador desenhado. Os dados de cada par de iniciadores encontram-se disponíveis no **anexo A**.

Figura 8 – Produto de amplificação do GAPDH a partir da sequência de iniciadores selecionados



Legenda: iniciador *forward* (em amarelo); iniciador *reverse* (em verde); sequência amplificada (em cinza), compreendendo ambos os iniciadores, total de 123 pares de base.

Fonte: própria do autor (2023).

Para assegurar a especificidade dos produtos de qRT-PCR em tempo real, uma análise da temperatura de fusão através da curva de dissociação (*melting*) foi realizada, com aumento de 0,5 °C a cada 20 segundos de reação, iniciando a 60 °C, e finalizando em 95 °C. Durante cada novo ciclo de temperatura, as fluorescências emitidas foram registradas pelo aparelho *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA) de modo a observar um pico único para cada sequência analisada.

4.8.3 Análise de eficiência dos iniciadores e determinação da concentração de uso

A eficiência de cada par de iniciadores foi definida utilizando como base Pfaffl e colaboradores (2002), cuja avaliação leva em consideração a cinética, reprodutibilidade e exatidão dos iniciadores (PFAFFL, 2002). Para isto, amostras de cDNA sintetizadas a partir de um *pool* de mRNA de controle positivo THP-1 estimulado com brefeldina-A em diferentes diluições foram utilizadas: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, partindo de 1 µg/µL

da amostra. A análise foi feita em triplicata para cada diluição. Ao término das reações de qRT-PCR em tempo real, a média dos valores de Ct das replicatas de cada diluição foi calculada, e um gráfico de eficiência com base no valor logarítmico das diluições testadas em relação às médias de Cts calculadas para cada alvo foi construído. O valor da inclinação da reta foi determinado a partir do cálculo de eficiência E:

$$E = (10^{-1/slope})$$

Resultados de E entre 1,8 e 2,2 foram considerados válidos. De acordo com Pfaffl (2001), resultados dentro desse intervalo significam cinética de amplificação com reprodutibilidade e exatidão aceitáveis para a determinação de eficiência dos iniciadores. Para a determinação da concentração de uso, amostras de cDNA sintetizadas a partir das amostras de controle positivo THP-1 estimulado com brefeldina-A foram utilizadas. Para cada par de iniciadores, as concentrações de 200 nM, 400 nM e 500 nM foram testadas. Após a reação de qRT-PCR em tempo real, os valores de Ct de cada par de iniciadores nas diferentes concentrações foram comparados, sendo selecionada a concentração de 400 nM por apresentar menos variações entre as réplicas testadas.

4.9 Análise de estabilidade dos genes de referência (*housekeeping genes*)

Os genes de referência foram selecionados a partir de dados da literatura em estudos com CMSP. Os iniciadores foram sintetizados de acordo com o item 4.8.

Para a determinação da estabilidade dos genes de referência, ensaios de qRT-PCR em tempo real a partir de amostras de cDNA de células THP-1 estimuladas com brefeldina-A foram realizados, bem como CMSP infectadas com as quatro cepas de BCG do estudo. As ferramentas RefFinder e GeNorm, disponíveis *online* (<http://www.heartcure.com.au/reffinder/?type=reference#>) foram utilizadas para a análise da estabilidade de expressão dos genes endógenos selecionados. O RefFinder é uma ferramenta que integra programas computacionais (GeNorm, NormFinder, BestKeeper, entre outros) com o intuito de avaliar a estabilidade e confiabilidade de genes de referência. Esse algoritmo é responsável por atribuir pesos adequados a cada gene, a partir do cálculo de suas médias geométricas para definição de um ranqueamento por gene (XIE; WANG; ZHANG, 2023). O GeNorm calcula o valor da expressão (M) para um gene de referência, com base na média geométrica de todos os demais genes estudados a partir de uma comparação pareada. Genes de referências com valores de M menores são

considerados mais estáveis. Como critério de seleção, é sugerido pelo *software* genes de referência com valores de M inferiores a 1,5 (FREITAS et al., 2019).

4.10 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real

As reações de qRT-PCR em tempo real foram realizadas em duplicata para cada amostra analisada, utilizando o kit GoTaq™ qPCR Master Mix (Promega Biosciences, LLC., San Luis Obispo, CA, USA). As reações foram realizadas no equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA), seguindo as configurações de ciclagem em 1 ciclo de 2 minutos a 95 °C para ativação da GoTaq® Hot Start Polymerase, e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para a reação de desnaturação, e 1 minuto a 60 °C para anelamento e extensão. O ROX foi utilizado como controle interno passivo com fluorescência constante durante toda a aplicação. Na reação de qRT-PCR em tempo real, o número de ciclos em que a amostra cruzou o *threshold* (definido automaticamente pelo *software* do equipamento) foi considerado. Esse valor, definido como Ct (*Cycle Threshold*), é preditivo da quantidade de mRNA amplificado presente na amostra. Posteriormente, os valores de Ct de cada amostra foram utilizados para o cálculo da quantificação relativa a partir do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ apresentado por Schmittgen e Livak (2008), como descrito na figura 10 (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os genes de referência GAPDH (D-gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) e B2M (β -2-microglobulina) foram utilizados, definidos como mais estáveis nas condições do teste (descrito no item 4.9). O controle não estimulado foi definido a partir das amostras de CMSP que não passaram pela infecção com as diferentes cepas de BCG. As amostras de células THP-1 estimuladas por 16 horas com brefeldina-A foram utilizadas como controle positivo da reação.

Figura 9 – Fórmula para o cálculo da quantificação relativa (QR).

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{controle}$$

$$\Delta Ct = Ct_{alvo} - Ct_{referência}$$

O *fold change* foi calculado a partir dos dados de expressão relativa do alvo apoptótico em relação à expressão do controle positivo THP-1 estimulado com

brefeldina-A.

4.11 Detecção dos níveis de apoptose e necrose por citometria de fluxo

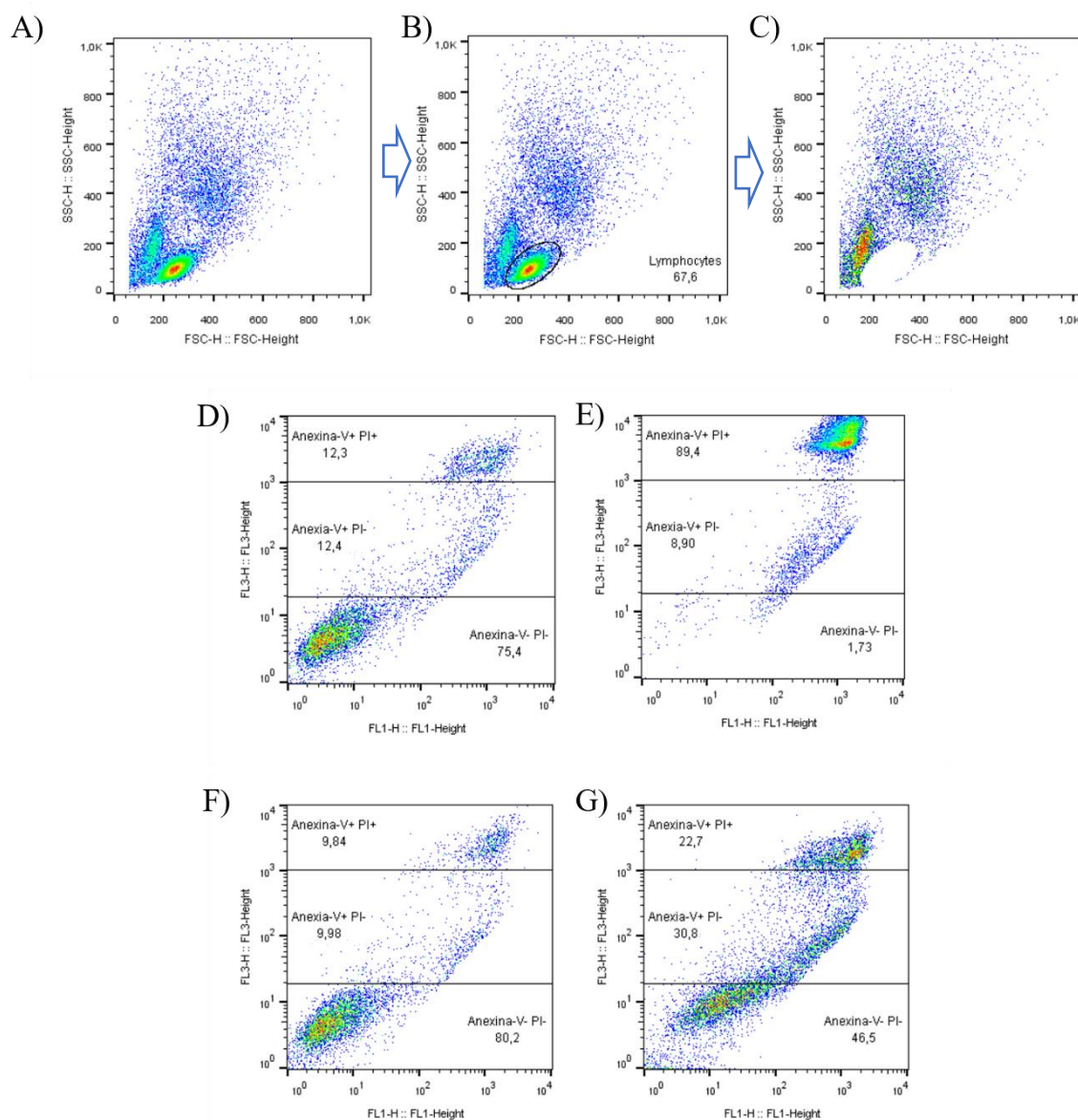
4.11.1 Marcação celular com Anexina-V e PI

As células mononucleares, após os ensaios de infecção com as cepas Moreau e Russia, e as células THP-1 após estímulo com brefeldina-A, foram lavadas em PBS e marcadas com tampão cálcio diluído 10 vezes em água destilada. Uma parte das células mononucleares das amostras utilizadas no estudo foram aquecidas a 100 °C a fim de garantir o maior nível de morte celular por necrose. Os kits comerciais de avaliação de morte celular eram compostos pelos fluorocromos Anexina V-FITC, utilizada para detecção das células apoptóticas, e PI para células necróticas, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Becton Dickinson, EUA). O tempo de marcação foi estabelecido em 15 minutos com 5 µL de Anexina-V e PI. Posteriormente, as células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo na Plataforma Multiusuários de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ.

4.11.2 Seleção da região de análise da população monocítica

As regiões para seleção da população monocítica de interesse foram desenhadas com o auxílio do *software* Flowjo, seguindo padronização estabelecida em estudos anteriores (PONTE et al., 2018a; SILVA; PONTE; ANTAS, 2019a). O agrupamento referente à população de linfócitos foi excluído dentro dos eixos *Forward Scatter* (FSC, tamanho celular) e *Side Scatter* (SSC, granulosidade e complexidade). Possíveis *doublets* ou marcações simples dos monócitos pelos marcadores fenotípicos não foram removidos pela possibilidade de perda de amostras com perfil fenotípico alterado pela morte celular ou fragmentos celulares não marcadas pelo marcador fenotípico.

Figura 10 – Gráficos *dotplot* representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo para identificar os níveis de expressão (porcentagem) das populações de células com morte celular por apoptose (Anexina-V+/PI-) e por necrose (Anexina-V+/PI+).



Legenda: População de CMSP frescas (A) Região com a população de linfócitos obtidos a partir de seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), (B) Região de exclusão da população de linfócitos de CMSP, (C) Região excluída, (D) Controle negativo, (E) Controle positivo, (F) Infecção por BCG Russia e (G) Infecção por BCG Moreau. Região devidamente estruturada a partir de estudos anteriores (PONTE et al., 2018b; SIMAS et al., 2011b). **Fonte:** Silva (2022).

4.12 Dosagem de citocinas pelo ensaio de Luminex

Após as etapas de infecção e cultivo, os sobrenadantes foram utilizados para detecção das citocinas IL-1 β , TNF, IFN- γ e IL-10, a partir de kits comerciais para amostras humanas, seguindo as instruções do fabricante (Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Panel, Bio-Rad®, EUA).

Cerca de 200 μ L de tampão de lavagem em cada poço da microplaca de 96 poços foram utilizados, e a placa foi submetida à agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o tampão foi completamente aspirado e 25 μ L de cada padrão em diluição seriada na placa foi adicionado. Conforme indicado, 25 μ L das amostras diluídas 1:4 e 25 μ L de microesferas magnéticas foram adicionadas em cada poço, seguido de incubação por 2 horas sob agitação. Em seguida, duas lavagens com 200 μ L do tampão de lavagem com total aspiração dos poços foram realizadas. Com os poços secos, 25 μ L dos anticorpos de detecção selecionados foram adicionados, seguido de incubação por 1 hora. Posteriormente, 25 μ L de Estreptavidina-PE foi adicionada. Após 30 minutos, duas lavagens foram realizadas e adicionado 150 μ L de tampão em todos os poços. As microesferas foram ressuspensas em um agitador de placas por 5 minutos. Uma quantidade mínima de 50 esferas/analito foi adquirida e o ensaio foi analisado no leitor de Luminex xPONENT (USA), disponível na Plataforma Tecnológica Multiusuários Institucional de Luminex do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ. A intensidade média de fluorescência foi observada usando uma curva logística (método *spline curve-fitting*) para calcular as concentrações das citocinas nas amostras.

4.13 Análise estatística

A partir dos testes realizados, os dados de expressão gênica foram apresentados como as medianas e intervalo interquartil da expressão relativa de cada alvo. Os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram usados para verificação da normalidade dos dados. Para as análises comparativas entre os diferentes estímulos, o teste de Friedman para dados pareados foi utilizado, seguido do teste pos-hoc Dunn-Bonferroni para as análises significativas entre os tratamentos. Os dados de dosagem de citocinas foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil. Para todos os testes, um intervalo de confiança de 95% foi levado em consideração, com nível de significância menor ou igual

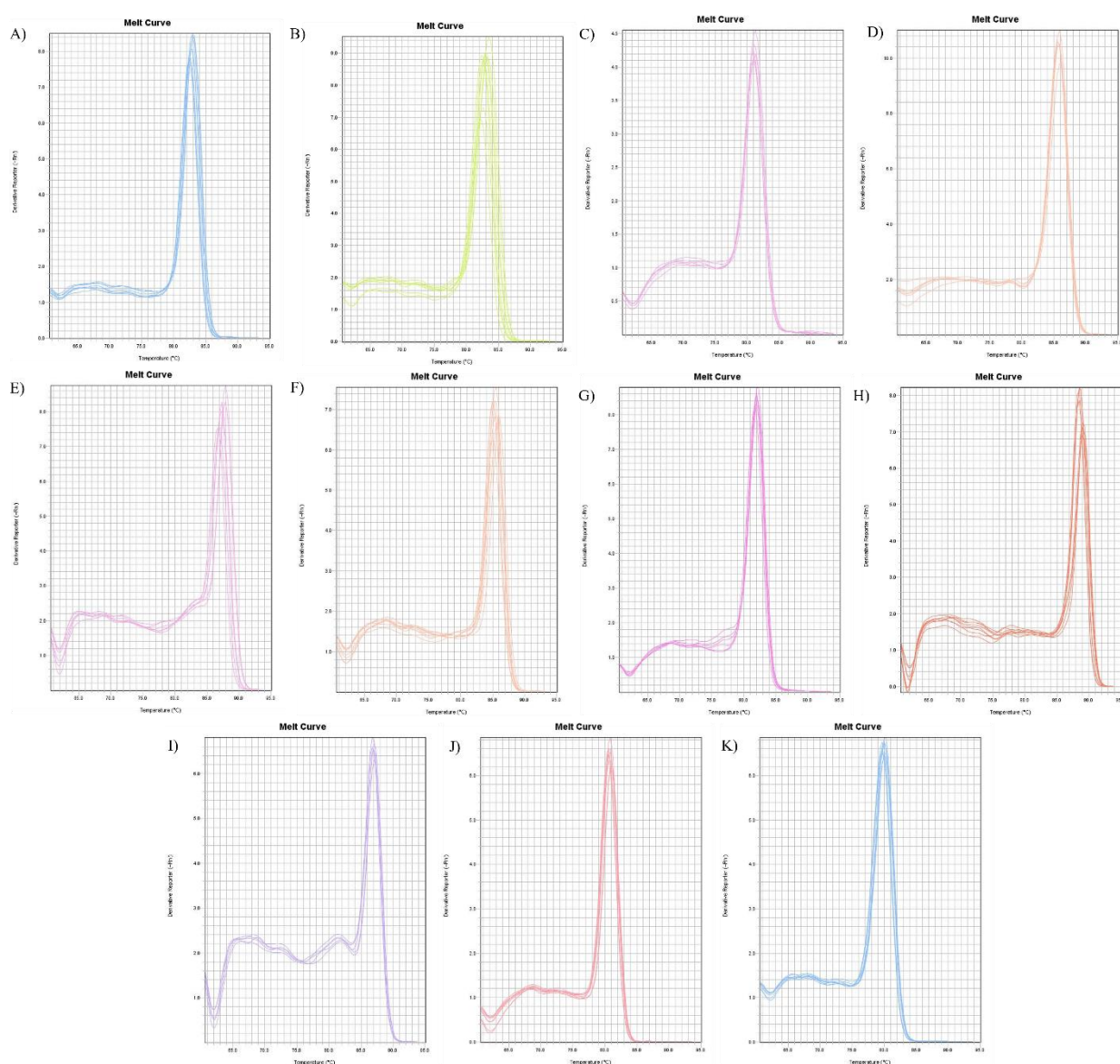
a 0,05. Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do GraphPad Prism, versão 8.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da especificidade dos iniciadores

Os sinais de fluorescência obtidos a partir de cada ciclo de amplificação para o teste de especificidade, demonstraram picos únicos e reproduzíveis nas diferentes réplicas analisadas, confirmando a ausência de sequências inespecificamente amplificadas, ou outros contaminantes do teste (figura 12).

Figura 11 – Curvas de *melting* para cada produto amplificado em amostras de CMSP.

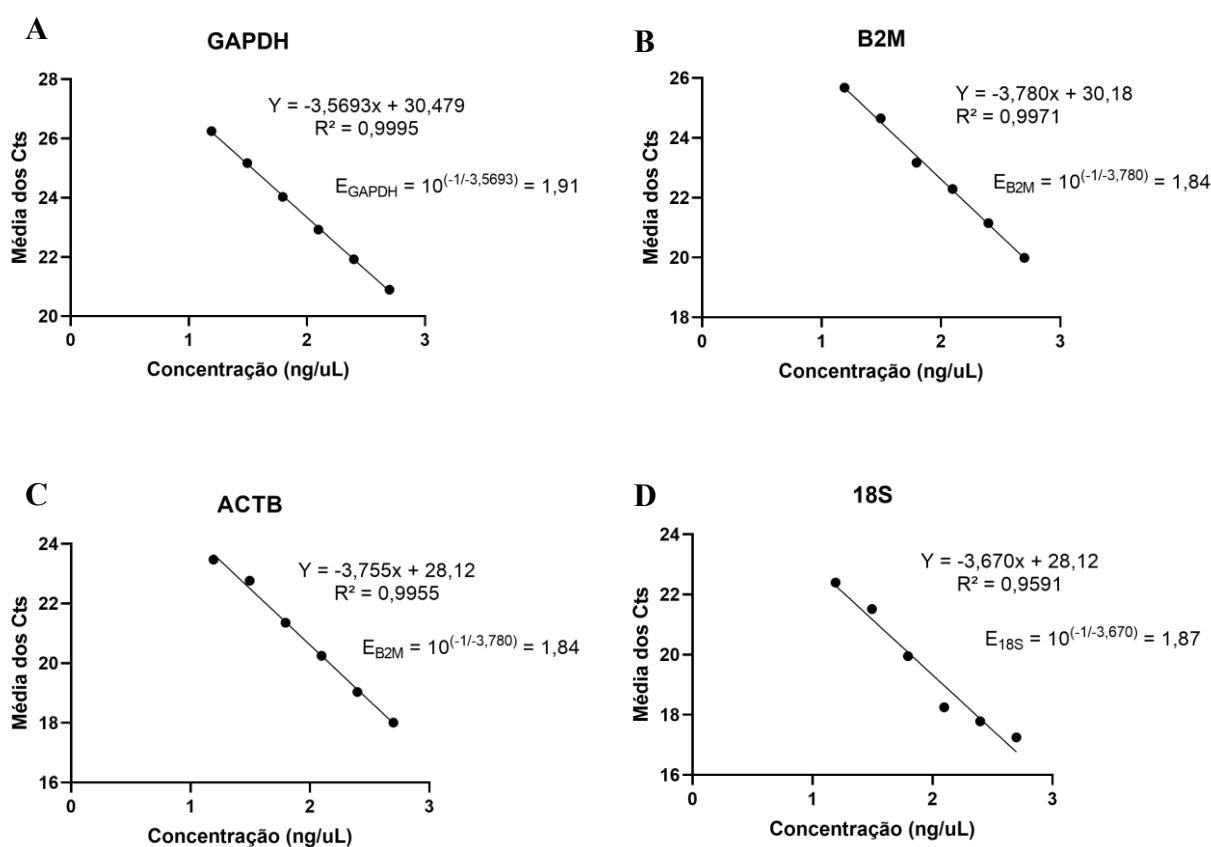


Legenda: curvas de *melting* pelo equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystem) para os alvos GAPDH (A); β -2-microglobulina (B); 18S (C); β -actina (D); BAD (E); BAX (F); BAK1 (G); NOXA (H); PUMA (I); BCL-XL (J); MCL-1 (K).

5.2 Determinação da eficiência analítica dos iniciadores

As amostras de cDNA provenientes de células THP-1 estimuladas com brefeldina por 16 horas, e amostras de CMSP infectadas com as diferentes cepas da vacina BCG testadas, apresentaram valores de eficiência dentro do intervalo de 1,8 a 2,2, o que representa valores dentro dos parâmetros considerados confiáveis para aplicação em qRT-PCR em tempo real. Os valores de eficiência para os alvos endógenos encontram-se apresentados na figura 13. Os valores de eficiência para os demais alvos estão apresentados na tabela 1, e os gráficos de eficiência encontram-se disponíveis no **apêndice A**.

Figura 12 – Cálculos de eficiência dos genes endógenos a partir de análises de qRT-PCR.



Legenda: as linhas apresentadas nos gráficos acima representam a regressão linear para cada alvo endógeno analisado. Valores de eficiência [E] para o alvo GAPDH (A); β -2-microglobulina (B); β -actina (C); e 18S (D). O eixo X refere-se ao log das concentrações do cDNA testado para cada ponto apresentado no gráfico (de baixo para cima): 500, 250, 125, 62, 31 e 15 ng/ μ L.

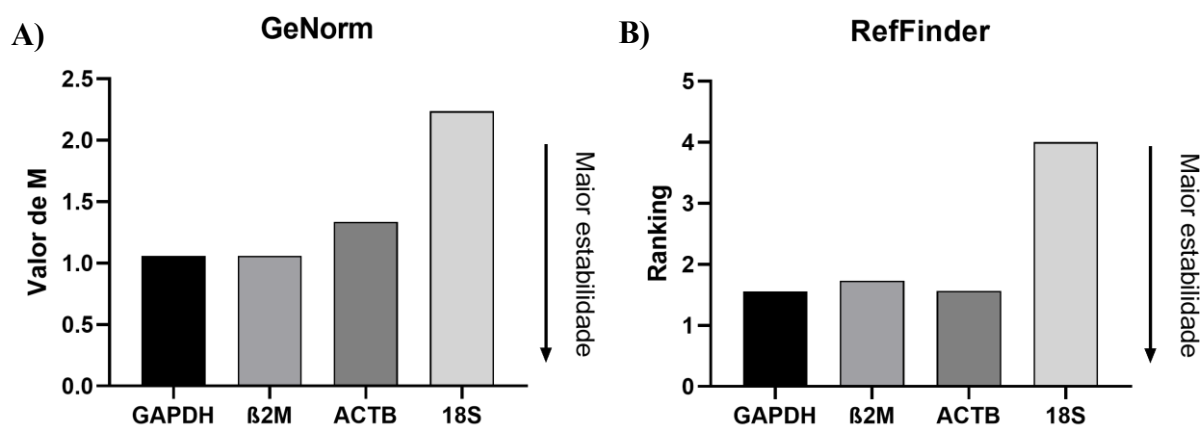
5.3 Seleção dos genes de referência para os ensaios de expressão gênica relativa

Os genes de referência foram analisados nos *softwares* RefFinder e GeNorm. Os dados de estabilidade para os genes de referência são mostrados na figura 14.

Todos os genes de referência candidatos avaliados pelo GeNorm apresentaram resultados aceitáveis para utilização nos testes, com valores de média de estabilidade de expressão (M) menores que 1,5, com exceção do 18S. O gene considerado mais estável pelo RefFinder foi o β -actina, com um *ranking* bem próximo aos genes β -2-microglobulina e GAPDH. Em contrapartida, o gene 18S foi considerado o menos estável nas condições do teste e, por este motivo, não foi indicado para a análise proposta.

A partir dos dados obtidos no GeNorm, os genes β -2-microglobulina e GAPDH apresentaram valores de estabilidade similares, sendo indicados como melhores genes a serem aplicados em conjunto para análises de qRT-PCR em tempo real para as amostras de CMSP infectadas com as diferentes cepas de BCG, e as amostras de THP-1 estimuladas com a brefeldina-A.

Figura 13 – Valores do *ranking* de estabilidade dos genes de referência testados em CMSP.



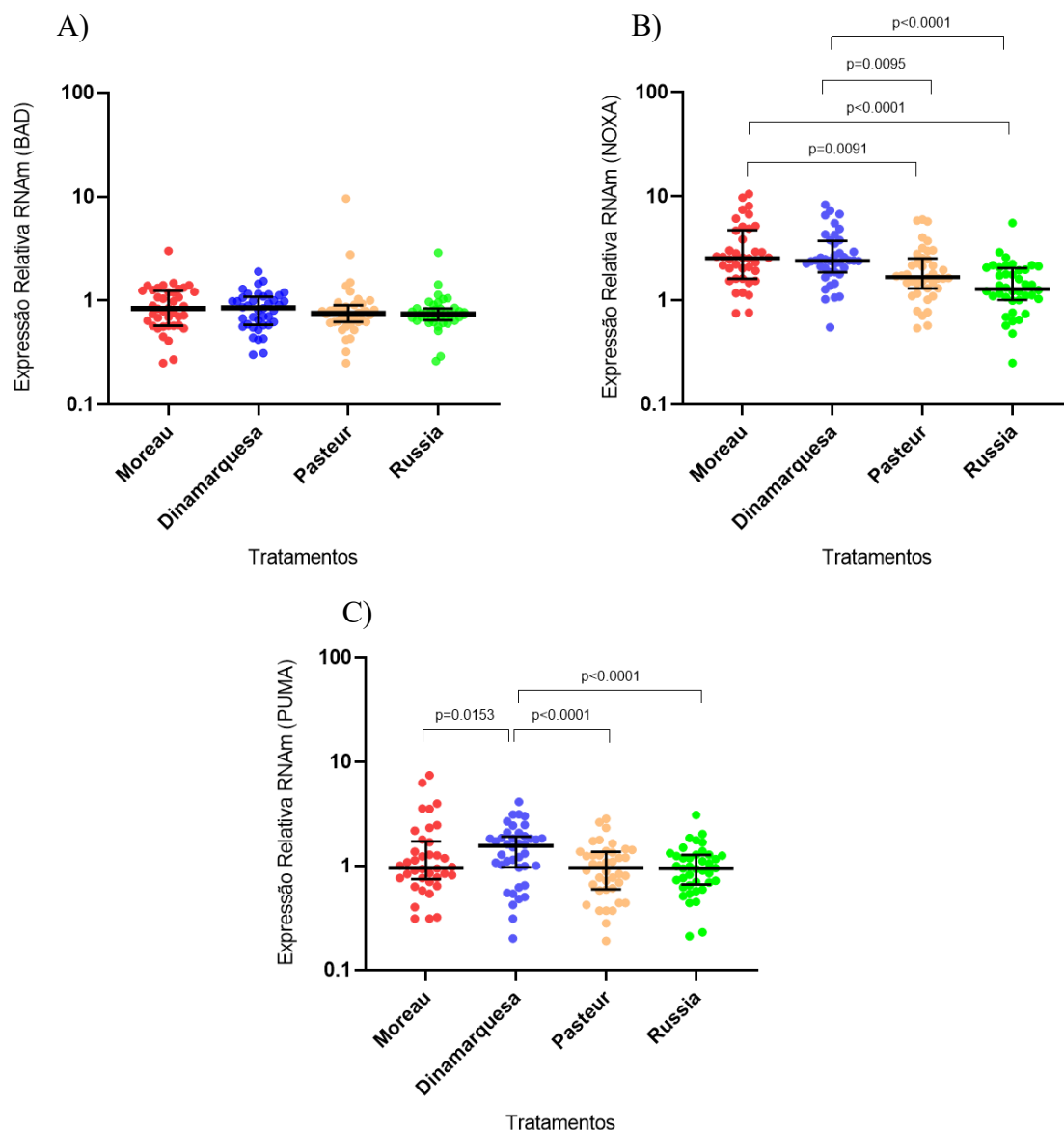
Legenda: *Ranking* comparativo GeNorm (A); comparação de estabilidade entre os diferentes endógenos pelo *software* RefFinder (B). As siglas B2M e ACTB referem-se aos alvos endógenos β -2-microglobulina e β -actina, respectivamente.

5.4 Expressão relativa dos genes apoptóticos

Os níveis de expressão gênica dos alvos anti e pró-apoptóticos em CMSP infectadas por quatro diferentes cepas vacinais de BCG foram investigados. Nos níveis de expressão gênica dos alvos sensibilizadores analisados em CMSP, pode-se observar que não há

aumento considerável da expressão de BAD entre as diferentes cepas. Tampouco, os diferentes tratamentos apresentam discrepância estatisticamente significativa entre si (figura 15A). O alvo NOXA apresentou resultados mais expressivos para as cepas Moreau (mediana = 2,505, IQR = 1,558 – 4,463) e Dinamarquesa (mediana = 2,400, IQR = 1,863 – 3,718), representando *up regulation* em comparação às amostras não estimuladas (figura 15B). A cepa Russia obteve o menor resultado de expressão relativa (mediana = 1,285, IQR = 1,008 – 2,038), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em comparação às cepas Moreau e Dinamarquesa, mas não significante quando comparada à cepa Pasteur, que apresentou mediana de 1,670 (IQR = 1,300 – 2,525). Curiosamente, o alvo PUMA não apresentou resultados tão expressivos em comparação ao NOXA, com a cepa Moreau apresentando o menor resultado (mediana = 0,9350, IQR = 0,655 – 1,610) em comparação às cepas Dinamarquesa (mediana = 1,555, IQR = 0,968 – 1,903), Pasteur (mediana = 0,955, IQR = 0,595 – 1,363) e Russia (mediana = 0,945, IQR = 0,660 – 1,273). A cepa Dinamarquesa apresentou o maior resultado de expressão relativa para PUMA, com diferença estatisticamente significativa com Moreau ($p = 0.0153$), Pasteur ($p < 0.0001$) e Russia ($p < 0.0001$). As cepas Moreau, Pasteur e Russia, quando comparadas entre si, não apresentaram relevância estatística (figura 15C). Assim, esses resultados indicam que os alvos sensibilizadores NOXA e PUMA parecem ter sido mais influenciados pelos estímulos dos tratamentos com BCG, mesmo que apenas Dinamarquesa tenha apresentado resultados expressivos para ambos os alvos simultaneamente. Já o alvo BAD não apresentou alteração relevante frente ao estímulo das cepas de BCG, porém foi observada, em todos os tratamentos, uma leve redução dos níveis de expressão relativa, principalmente nas cepas Pasteur e Russia.

Figura 14 – Expressão relativa dos alvos sensibilizadores pró-apoptóticos em amostras de CMSP infectadas com as cepas de BCG Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia.

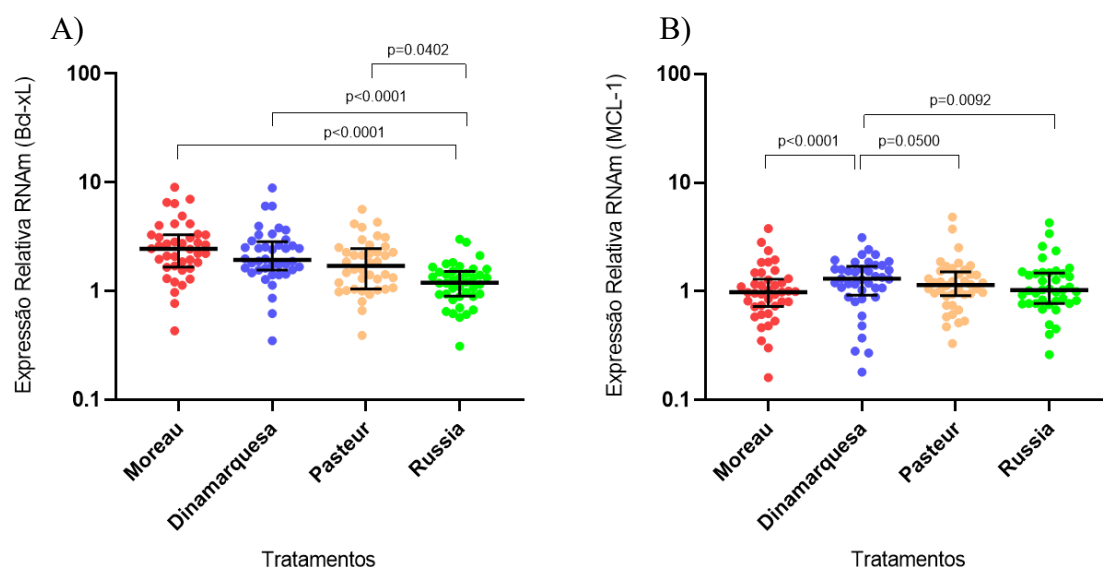


Legenda: valores da análise de quantificação relativa por qRT-PCR em amostras de CMSP (n = 42) infectadas com as cepas Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia de BCG. Os valores de expressão (QR) foram calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelos genes de referência GAPDH e β -2-microglobulina. As barras horizontais representam a mediana de cada tratamento para BAD (A); NOXA (B); PUMA (C) e as barras verticais representam o intervalo interquartil (IQR).

O alvo anti-apoptótico BCL-XL apresentou resultados de expressão positivos (*up regulation*) para Moreau (mediana = 2,445, IQR = 1,663 – 3,290), Dinamarquesa (mediana = 1,930, IQR = 1,563 – 2,835), Pasteur (mediana = 1,705, IQR = 1,048 – 2,450) e Russia (mediana = 1,195, IQR = 0,900 – 1,513). Além disso, BCG Moreau foi a única

cepa a apresentar mediana acima de 2, com diferença estatisticamente relevante ($p < 0,0001$) em relação à cepa Russia. As cepas Dinamarquesa ($p < 0,0001$) e Pasteur ($p = 0,0023$) apresentaram medianas próximas e com leve aumento em comparação ao controle não estimulado, mas estatisticamente significativos quando comparadas à cepa Russia (figura 16A). Os resultados de expressão relativa de MCL-1, outro alvo anti-apoptótico analisado, demonstrou um leve aumento das cepas Pasteur (mediana = 1,135, IQR = 0,907 – 1,505) e Russia (mediana = 1,020, IQR = 0,770 – 1,473), mas um aumento mais expressivo para a cepa Dinamarquesa (mediana = 1,300, IQR = 0,915 – 1,698), e leve decréscimo nos níveis de expressão para a cepa Moreau (mediana = 0,975, IQR = 0,723 – 1,293). Neste cenário, as cepas Moreau ($p < 0,0001$), Pasteur ($p = 0,0500$) e Russia ($p = 0,0092$) apresentaram diferenças significantes em comparação à cepa Dinamarquesa (figura 16B).

Figura 15 – Expressão relativa dos alvos inibidores (anti-apoptóticos) em amostras de CMSP infectadas com diferentes cepas vacinais de BCG.

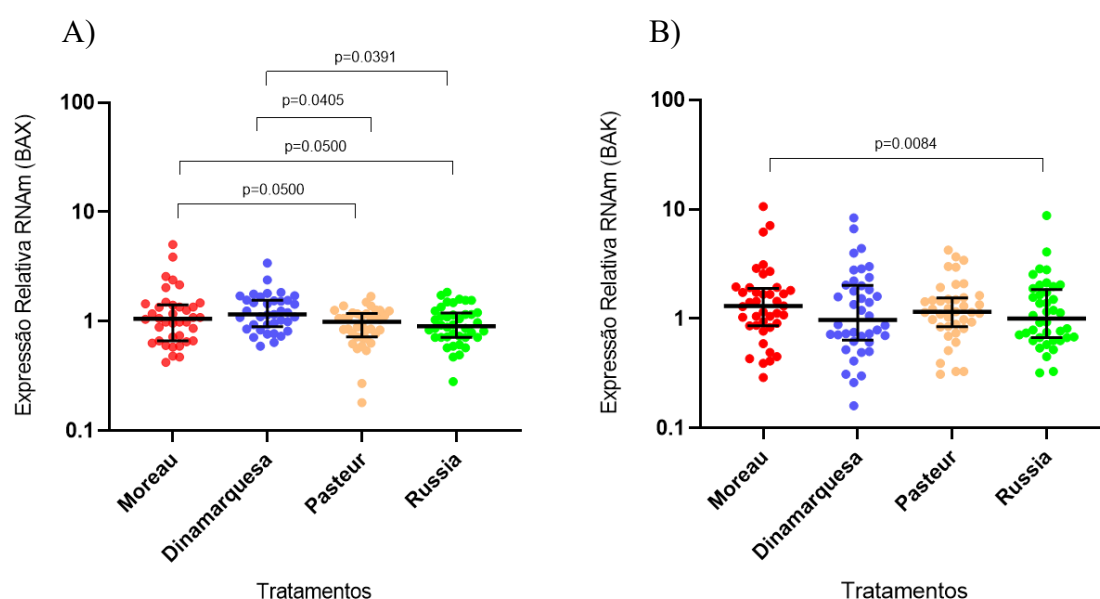


Legenda: valores da análise de quantificação relativa por qRT-PCR em amostras de CMSP ($n = 42$) infectadas com as cepas Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia de BCG. Os valores de expressão (QR) foram calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelos genes de referência GAPDH e β -2-microglobulina. As barras horizontais representam a mediana de cada tratamento para BCL-XL (A) e MCL-1 (B) e as barras verticais representam o intervalo interquartil (IQR).

Os dados de expressão de BAX apresentaram valores para as cepas BCG Moreau (mediana = 1,010, IQR = 0,653 – 1,388), Pasteur (mediana = 1,050, IQR = 0,733 – 1,228)

e Rússia (mediana = 0,900, IQR = 0,710 – 1,188) bem próximos ao controle não estimulado, representando o baixo nível de expressão deste alvo, mesmo sob o estímulo das cepas de BCG (figura 17A). A cepa Dinamarquesa apresentou o maior resultado de expressão relativa (mediana = 1,120, IQR = 0,830 – 1,550), com diferença estatisticamente significativa quando comparada às cepas Pasteur ($p=0,0037$) e Rússia ($p=0,0223$). Os dados de expressão de BAK1 demonstraram maiores níveis de expressão para a cepa Moreau (mediana = 1,300, IQR = 0,863 – 1,893), apresentando relevância estatística apenas com a cepa Rússia ($p=0,0084$). A cepa Dinamarquesa apresentou o menor nível de expressão relativa, com mediana de 0,970, IQR 0,638 – 2,023 (figura 17B).

Figura 16 – Expressão relativa dos alvos efetores pró-apoptóticos em amostras de CMSP infectadas com diferentes cepas vacinais de BCG.



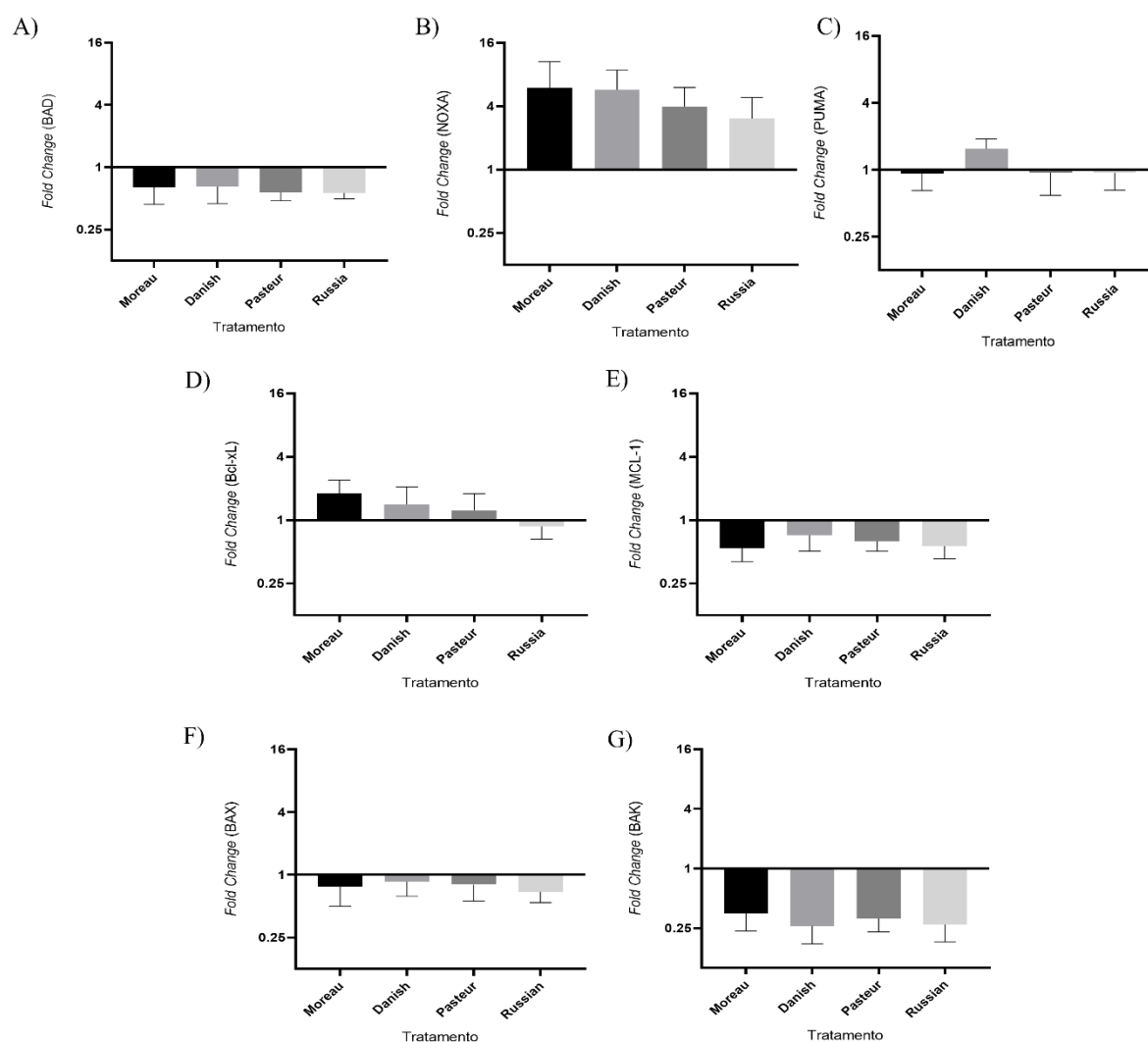
Legenda: valores da análise de quantificação relativa por qRT-PCR em amostras de CMSP ($n = 42$) infectadas com as cepas Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Rússia de BCG. Os valores de expressão (QR) foram calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizados pelos genes de referência GAPDH e β -2-microglobulina. As barras horizontais representam a mediana de cada tratamento para BAX (A) e BAK (B) e as barras verticais representam o intervalo interquartil (IQR).

Com isso, os alvos efetores BAX e BAK1 parecem sofrer baixa influência quando estimulados com as cepas de BCG, principalmente BAX. No entanto, mesmo com os resultados apresentados, as cepas de BCG Moreau e Dinamarquesa induziram uma maior *up regulation* nas diferentes amostras analisadas em comparação às cepas Pasteur e

Russia. A cepa Russia apresentou uma leve redução nas medianas em ambos os alvos efetores, com resultados concordantes quando comparados à expressão dos alvos sensibilizadores pró-apoptóticos.

As análises de *Fold Change* (FC) foram realizadas utilizando as amostras de THP-1 estimuladas com brefeldina-A. O FC foi usado como uma medida que mensurou a variação da expressão dos alvos apoptóticos nos diferentes estímulos com as cepas de BCG em relação ao controle positivo. Os resultados apresentados na figura 18 demonstram que as amostras de CMSP infectadas com as diferentes cepas de BCG estudadas, apresentaram resultados de expressão dos alvos apoptóticos BAD, BAX, BAK1 e MCL-1 abaixo do controle positivo. O alvo sensibilizador NOXA apresentou resultados expressivos, com medidas de FC de 3,976 (Pasteur) e 3,060 (Russia), e um aumento de quase 6 vezes do alvo NOXA nas cepas Moreau (5,964) e Dinamarquesa (5,714), em relação ao controle positivo. Em contrapartida, o alvo PUMA apresentou resultado acima do controle positivo apenas em Dinamarquesa (1,540). As cepas Moreau (0,926), Pasteur (0,945) e Russia (0,936) apresentaram resultados próximos ao controle positivo (1,0). Dentre os alvos inibidores, apenas BCL-XL apresentou medidas de FC acima do controle positivo para Moreau (1,785), Dinamarquesa (1,409) e Pasteur (1,245), mas os níveis de expressão para este alvo sugerem apenas uma leve modulação das cepas em relação ao controle positivo de THP-1 estimulado com brefeldina-A. A Russia foi a única cepa de BCG que não apresentou medidas de FC acima do controle positivo para BCL-XL (0,872).

Figura 17 – Medidas de *Fold Change* dos alvos apoptóticos em amostras de CMSP infectadas com diferentes cepas vacinais de BCG em relação ao controle positivo THP-1 estimulado com brefeldina-A.

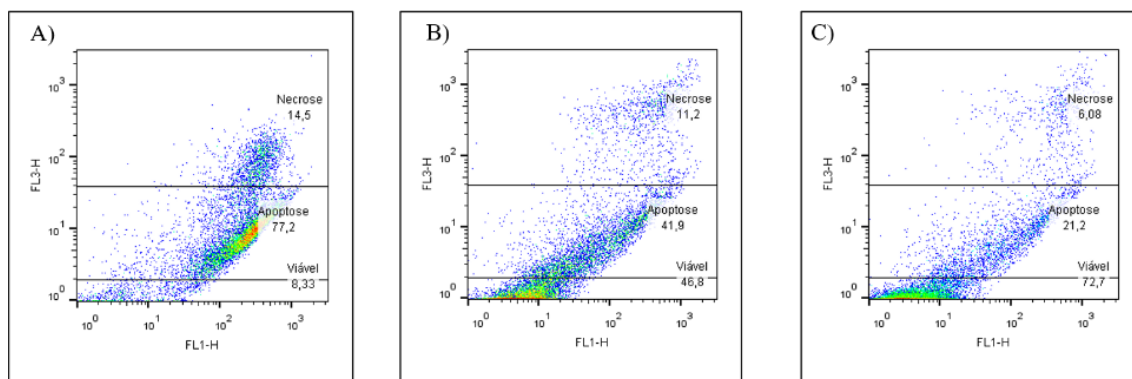


Legenda: medidas de *Fold Change* (FC) em amostras de CMSP (n = 42) estimulados com as cepas Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia de BCG. Os valores de FC foram calculados a pela RQ de cada amostra dividida pela RQ do controle THP-1 estimulado com brefeldina-A. As barras verticais representam as medianas de cada tratamento com os devidos intervalos interquartis para BAD (A); NOXA (B); PUMA (C); BCL-XL (D); MCL-1 (E); BAX (F); BAK1 (G).

5.5 Determinação do perfil de morte celular por citometria de fluxo das amostras de THP-1 estimuladas com brefeldina-A e de CMSP infectadas com as cepas BCG Moreau e Russia

Para o estabelecimento do controle positivo destes testes, células THP-1 estimuladas com brefeldina-A por 48 horas foram analisadas, e comparadas às mesmas células de linhagem monocítica infectadas pelo mesmo período com as cepas Moreau e Russia. O resultado representativo da análise de citometria de fluxo demonstrou apoptose em 77,2% das células analisadas, em comparação a 14,5% de necrose nos tratamentos com brefeldina-A (Figura 19). Em conjunto, células THP-1 infectadas com a cepa BCG Moreau apresentaram 34,6% de apoptose, em relação a 19,1% apresentado nas amostras tratadas com a cepa BCG Russia. O percentual de necrose no tratamento com brefeldina-A foi de 14,5% frente a 7,7% da cepa BCG Moreau e 3,9% da cepa BCG Russia (Figura 19).

Figura 18 – Gráfico *dotplot* representativo para identificação dos níveis (porcentagem) de apoptose e necrose em células THP-1 estimuladas com brefeldina-A ou infectadas com as cepas de BCG Moreau e Russia.



Legenda: populações de THP-1 estimuladas com brefeldina-A (A), infectadas com a cepa BCG Moreau (B) e a cepa BCG Russia (C) para análise de apoptose (Anexina-V+/PI-) e necrose (Anexina-V+/PI+).

Fonte: Silva (2023).

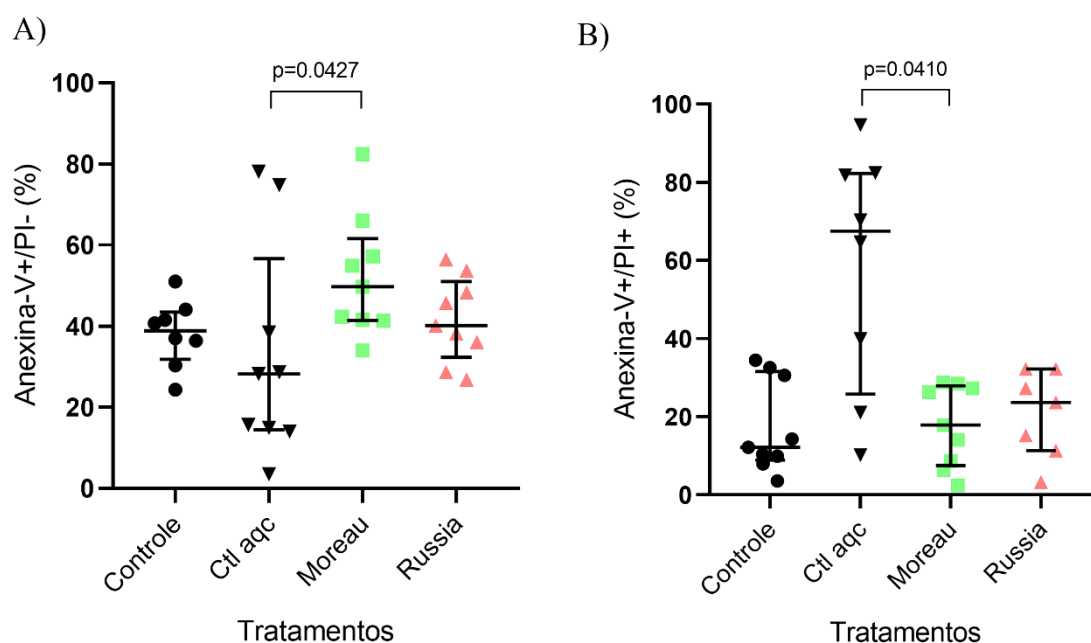
Já na avaliação global do perfil de morte celular em CMSP infectadas com as cepas BCG Moreau e Russia, diferenças importantes foram encontradas (Figura 20). A cepa Moreau induziu um maior nível ($p=0.0427$) de apoptose (mediana = 49,70; IQR = 41,40

– 61,60) em relação ao controle aquecido (mediana = 28,20; IQR = 14,45 – 56,60), mas não ao controle não estimulado (mediana = 38,85; IQR = 31,83 – 43,45) e a cepa Russia (40,10; IQR = 32,30 – 51,00) (Figura 20A).

A cepa Russia não demonstrou significância estatística com nenhum dos tratamentos nos percentuais de apoptose e necrose. No entanto, a indução de necrose foi levemente mais acentuada na cepa Russia (mediana = 23,70; IQR = 11,30 – 32,20) do que na cepa Moreau (mediana = 17,90; IQR = 7,49 – 27,90) (Figura 20B).

É importante ressaltar que o controle não estimulado advém de amostras de mononucleares isolados de indivíduos adultos pré-expostos à vacina BCG Moreau nos primeiros meses de nascimento. Desta forma, o controle não estimulado pode apresentar resposta imune discrepante, se comparado a uma linhagem celular THP-1 que não apresenta exposição prévia às cepas da vacina BCG e a outras micobactérias.

Figura 19 – Percentual de apoptose e necrose de CMSP após diferentes estímulos.

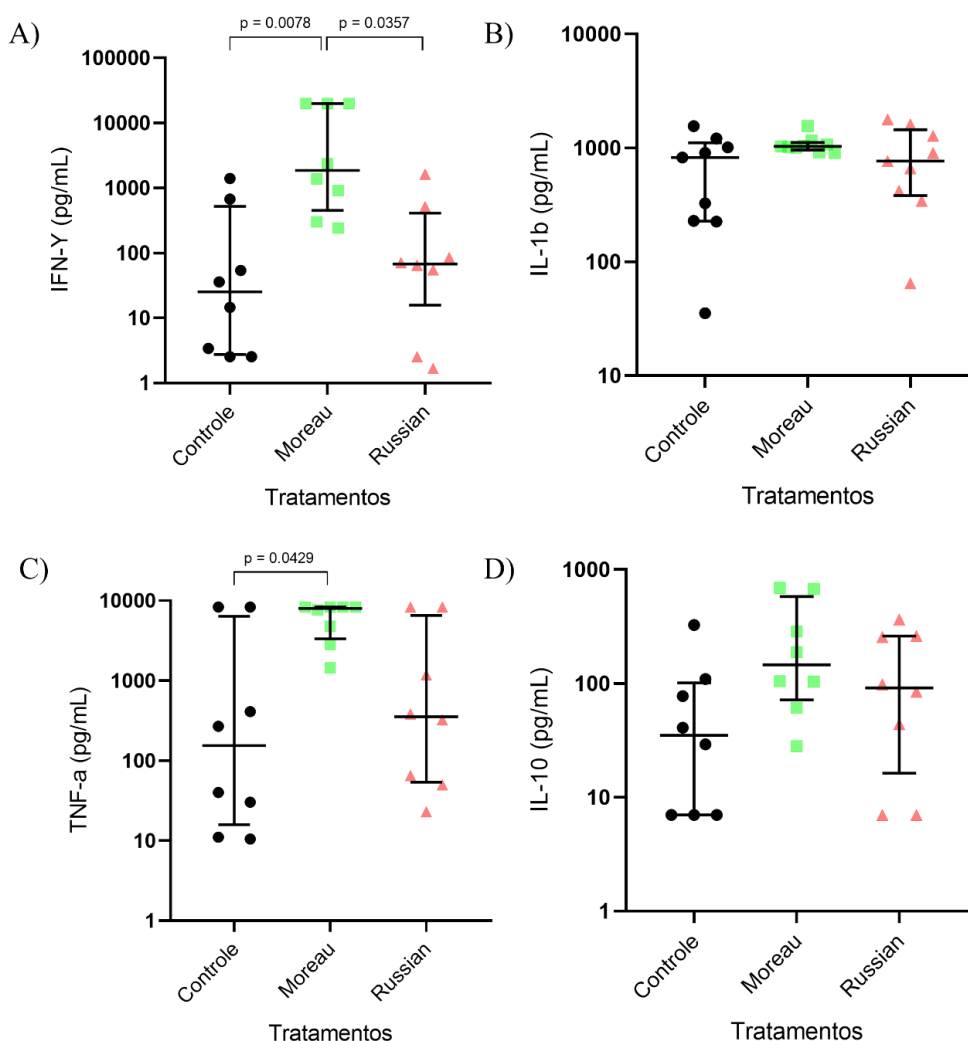


Legenda: percentual de amostras (n = 9) com (A) Anexina-V+/PI- (apoptose) e (B) Anexina-V+/PI+ (necrose). As barras horizontais representam a mediana do controle não estimulado (Círculo), controle positivo aquecido (Ctl aqc - Triângulo invertido), tratamento com a cepa BCG Moreau (Quadrado verde) e Russia (Triângulo vermelho) com seus respectivos intervalos interquartis. **Fonte:** própria do autor (2023).

5.6 Avaliação do perfil de citocinas pelo método de Luminex das amostras infectadas com as cepas BCG Moreau e Russia

A cepa Moreau induziu um aumento significativo nos níveis de IFN- γ ($p = 0,0078$) e TNF ($p = 0,0429$), em comparação ao controle não estimulado e à cepa Russia para IFN- γ ($p = 0,0357$). Além disso, não foi possível observar nenhuma modulação expressiva de IL-1 β e IL-10, nas amostras tratadas (Figura 21). A cepa Russia não apresentou quaisquer diferenças nos níveis de IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-1 β .

Figura 20 – Níveis (pg/mL) de citocinas induzidas pelas vacinas BCG Moreau e Russia.



Legenda: os gráficos representam os níveis em pg/mL de IFN- γ (A), IL-1 β (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) induzidas pelas cepas de BCG Moreau (Quadrado verde) e Russia (Triângulo vermelho). O controle de células mononucleares não estimuladas pelas cepas encontra-se marcada no círculo. As barras horizontais representam as medianas de cada tratamento e as barras verticais os intervalos interquartis **Fonte:** própria do autor (2023).

6. DISCUSSÃO

Desde que passou a ser utilizada amplamente no mundo há mais de um século, a vacina BCG tem sido alvo de pesquisas que visam compreender os principais mecanismos associados à indução de resposta imune a diferentes infecções (BHATT; SALGAME, 2007; KAUFMANN et al., 2018; MOLIVA; TURNER; TORRELLES, 2017; MOORLAG et al., 2020). Amplos efeitos moduladores estimulados pelos bacilos desta vacina foram descritos na literatura no decorrer de décadas, sendo a apoptose e outros padrões de morte celular, apontados como cruciais na resposta imune frente ao *Mtb* (ANTAS et al., 2019; LAI et al., 2007; PANG et al., 2012; SIMAS et al., 2011b). Entretanto, os mecanismos específicos subjacentes à apoptose, induzidos pela vacina BCG, ainda não são completamente elucidados. Ineditamente, este estudo comparou os níveis de expressão gênica de marcadores apoptóticos da via intrínseca, que seriam induzidos *in vitro* em mononucleares humanos pelas cepas de BCG Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia.

Uma das principais questões que norteia os estudos investigativos das vias de modulação da resposta imune frente à administração de BCG refere-se à sua elevada variação na indução de resposta imune frente à TB pulmonar (FAVOROV et al., 2012; KLEYDSON BONFIM ANDRADE, 2015). Hipoteticamente, esta indução deveria levar a proteção. Estudos já sugerem que a resposta imune derivada a partir da apoptose, e a estimulação de um perfil mais pró-inflamatório, estão associados a exacerbação da resposta imune específica ao *Mtb* (ANTAS et al., 2019; PONTE et al., 2018a; SIMAS et al., 2011b). Este fino controle, que permeia pela regulação da apoptose, incluindo todos os eventos mitocondriais e efetores, dependem de mediadores moleculares membros da família de proteínas Bcl-2 (CZABOTAR et al., 2014). Algumas dessas proteínas incluem alvos pró-apoptóticos sensibilizadores, como BAD, NOXA, e PUMA; alvos efetores, como BAX e BAK1; além de alvos anti-apoptóticos, como BCL-2 e BCL-XL (CORY; ADAMS, 2002).

Todas as cepas da vacina BCG deste estudo, parecem modular de forma positiva a expressão dos alvos apoptóticos analisados, mesmo na condição de 16 horas de infecção, e com um MOI 2:1 estabelecido. Estudos de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), demonstraram que todas as células naquela condição oncológica apresentavam elevados níveis de expressão de marcadores pró-sobrevida, como BCL-2, BCL-XL e MCL-1 (DEL GAIZO MOORE et al., 2008). Em pacientes com LLA, a

ausência de sinais bloqueadores destes alvos inibiu a resposta imune apoptótica, mesmo na presença de fármacos indutores de morte celular, como glicocorticóides, o que prejudicou o prognóstico da doença (DEL GAIZO MOORE et al., 2008; STAM et al., 2010). Outro estudo com linhagens celulares de melanoma, detectou elevados níveis de expressão de MCL-1 e BCL-XL, com elevada associação à sobrevivência celular (LEE et al., 2019a).

Resultados recentes de indução de marcadores anti-apoptóticos em tumores sólidos, indicam que a antagonização de BCL-XL e a indução de apoptose, parece ser dependente de proteínas BH3 (GREAVES et al., 2018). Em contrapartida, MCL-1 parece regular a apoptose mesmo na ausência de BH3, indicando que os papéis de sobrevivência celular induzidos por estes alvos anti-apoptóticos podem ser distintos (GREAVES et al., 2018).

Os alvos anti-apoptóticos demonstraram resultados mais expressivos quando comparados aos alvos efetores. Em BCL-XL, todos os tratamentos apresentaram resultados de incremento de expressão, o que indica modulação positiva deste alvo durante a infecção das diferentes cepas de BCG. A cepa Dinamarquesa foi a única que apresentou resultados de forte expressão de sensibilizadores (NOXA e PUMA) maiores em relação ao alvo inibidor BCL-XL. O alvo MCL-1 não sofreu grandes alterações nos diferentes tratamentos, apenas com leve incremento de expressão nas cepas de BCG Dinamarquesa e Pasteur. No entanto, ao analisar as amostras unitariamente, os resultados indicam modulação para baixo (*down regulation*) para este alvo, principalmente na cepa BCG Moreau. A cepa BCG Russia parece não apresentar forte influência tanto nos sensibilizadores quanto nos alvos inibidores de apoptose avaliados.

MCL-1 inibe a apoptose ao sequestrar BAK, impedindo o aumento da permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP – *Mitochondrial outer membrane permeabilization*) (WILLIS et al., 2005). A indução de MOMP é uma etapa crítica na via intrínseca da apoptose, que leva à liberação de citocromo c, e ativação das caspases efetoras (KALKAVAN; GREEN, 2018). Por outro lado, o NOXA é descrito como um fator que desloca o BAK do MCL-1, permitindo a ativação do MOMP e iniciação das vias precedentes à apoptose (KIM et al., 2009b).

Um estudo usando simulações de dinâmica molecular, indicou que a interação de NOXA ao sulco de ligação de BH3, induziu uma grande mudança conformacional em BAK, expondo sítios desta proteína para dimerização (PANG et al., 2012). Estes autores sugerem que esse mecanismo induz a geração de um octâmero de BAK formador de

poros, culminando na liberação de proteínas, como SMAC, indutores de morte celular (PANG et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que os níveis elevados de expressão de NOXA nas amostras tratadas com BCG Moreau, parecem inibir a ação de MCL-1, ao passo que uma leve modulação positiva de BAD pode estar associada à ativação de BAK e BAX. Em concordância com esta relação, as cepas Pasteur e Russia apresentaram os menores níveis de NOXA, BAX e BAK dentre os tratamentos, e níveis mais elevados de MCL-1, quando comparadas à cepa Moreau. Nos cenários descritos de Pasteur e Russia, o balanço entre alvos antiapoptóticos e pró-apoptóticos, parece direcionar à sobrevivência celular por uma inibição de BAX e BAK induzida por MCL-1.

Mesmo que os principais estudos envolvendo o gene MCL-1 tenham foco predominantemente em doenças oncológicas, alguns achados demonstram que a regulação positiva deste gene está associada a uma forte sinalização pró-sobrevivência de células monocíticas infectadas pelo *Mtb* virulento (SLY et al., 2003; WANG et al., 2016). No entanto, a literatura atual ainda carece de dados que associem a sobrevivência de células infectadas com o BCG, em relação à expressão de MCL-1 em células humanas.

Estudos realizados em camundongos, demonstraram que a inibição de MCL-1 promoveu significativamente apoptose em macrófagos infectados com *Mtb* (WANG et al., 2017). É importante destacar que já foi observado um aumento significativo na expressão de MCL-1 em macrófagos infectados com BCG após 10 horas, seguida de regulação negativa deste alvo após 28 horas (KLINGLER et al., 1997; PALAGA et al., 2013). Nosso estudo estabeleceu um período de infecção de 16 horas, com resultados de modulação negativa nos níveis de expressão de MCL-1, principalmente na cepa BCG Moreau. Um estudo com extensos períodos de infecção, idealmente uma cinética temporal, seria necessário para compreender a modulação de expressão de MCL-1 em amostras infectadas com diferentes cepas de BCG e a sua relação com a apoptose.

Chen e colaboradores (2015), sugerem um modelo hierárquico interconectado com as proteínas da família Bcl-2 na indução da apoptose, onde BCL-2, BCL-XL e MCL-1 atuam sequestrando os monômeros ativadores BH3, evitando a apoptose (CHEN et al., 2015). Por outro lado, NOXA se estabelece como um ativador BH3 genuíno, em conjunto com outros marcadores, como PUMA, BID e BIM (CHEN et al., 2015). Segundo os autores, estes alvos sensibilizadores induzem ativação direta e gradual de BAX/BAK. Desta forma, as cepas BCG Moreau e Dinamarquesa poderiam ser consideradas como aquelas

que mais modulariam a resposta imune pró-apoptótica em períodos temporalmente mais intensos de infecção. Seria de se supor se essas duas cepas induziriam gradualmente os marcadores efetores de apoptose. No entanto, esta premissa não foi avaliada neste estudo, e a literatura carece de dados para esta discussão.

Estudos envolvendo a infecção com *Helicobacter pylori* em células epiteliais gástricas, já demonstraram que a superexpressão de NOXA não fosforilável resulta em apoptose pela via intrínseca provavelmente pela ação do fator JNK, que aumentou a interação de NOXA com MCL-1 (RATH et al., 2015). Pesquisas com a linhagem celular renal de mamíferos Vero76, e infectadas por vírus Tacaribe, apontaram a indução da apoptose, dependente de PUMA, NOXA e BAD (HOLZERLAND et al., 2020). Neste estudo, foi possível observar ainda indução aumentada de apoptose em células deficientes de PUMA (HOLZERLAND et al., 2020). Desta forma, os autores sugerem que a expressão de NOXA, e outras proteínas BH3, pode compensar em certa medida, a falta de PUMA ou outros constituintes pró-apoptóticos (HOLZERLAND et al., 2020). Em nosso estudo, a expressão aumentada de NOXA parece influenciar também na expressão de MCL-1 apenas nas amostras infectadas com a cepa Moreau. No entanto, esta relação direta torna-se difícil de comprovar com nossos achados, visto que a cepa BCG Dinamarquesa apresentou elevados níveis de ambos os alvos, NOXA e MCL-1.

Em complemento, Wang e colaboradores (2018) sugerem que NOXA, ao se dissociar de MCL-1, pode ainda interagir com BCL-XL e induzir uma disfunção mitocondrial que culmina na apoptose (WANG et al., 2018). Os níveis altos de expressão de NOXA observados neste estudo, parecem não estabelecer esta relação de inibição direta, uma vez que os tratamentos com maiores níveis de NOXA, também apresentaram níveis elevados de BCL-XL em Moreau e Dinamarquesa. Em cultura primária de fibroblastos de camundongos, NOXA atuou como um indutor fraco de apoptose na ausência de E1A (NAKAJIMA; TANAKA, 2011). Assim, NOXA aparenta atuar como alvo sensibilizador dependente de outros fatores, tais como PUMA e E1A (SHIBUE et al., 2006). Em nosso estudo, as amostras tratadas com a cepa BCG Dinamarquesa apresentaram sinergismos entre os resultados de NOXA e PUMA. NOXA induz efetivamente a apoptose em células que têm acumulações de PUMA, com ativação combinada destes dois alvos aos efetores apoptóticos BAX e BAK (NAKAJIMA; TANAKA, 2007, 2011). Outros estudos relataram que a indução de apoptose por expressão elevada de NOXA, ao invés de PUMA, está fortemente associada a danos no DNA de fibroblastos (SHIBUE et al., 2006).

No entanto, o papel de NOXA na indução da apoptose pela via intrínseca ainda possui muitas lacunas a serem respondidas. Finalmente linhagens celulares nocaute para PUMA e NOXA, demonstraram níveis marcadamente reduzidos de clivagem de caspase-3 e indução de apoptose (HOLZERLAND et al., 2020). Curiosamente, o mesmo estudo demonstrou que os efeitos de nocaute de BAD, resultou em aumento da atividade apoptótica frente a infecção pelo vírus Tacaribe (HOLZERLAND et al., 2020).

As proteínas BAX e BAK desempenham um papel essencial no desencadeamento da morte celular por apoptose (KIM et al., 2009c). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual essas proteínas são ativadas ainda carece de respostas na literatura. Um modelo de ativação indireta alternativo sugere que as proteínas BH3 precisam se ligar apenas à maioria (e não todas) das proteínas anti-apoptóticas para desencadear a apoptose (ADAMS, 2019). Além disso, a oligomerização de BAK e BAX pode ocorrer de forma espontânea, pelo seu favorecimento termodinâmico na membrana mitocondrial (WICKY et al., 2019). No entanto, estudos já indicam que somente a sinalização pelos mediadores BH3 pode não ser suficiente para impulsionar a ativação de BAX/BAK, tornando a compreensão dos mecanismos indutores de apoptose ainda mais complexos (ADAMS, 2019). Neste sentido, investigações que levem à compreensão dos mecanismos diretos e indiretos envolvidos na modulação da apoptose por intermédio desses marcadores sensibilizadores, efetores e inibidores, e como sua interação é estabelecida dentro de um cenário de indução de apoptose, se tornam peças fundamentais para desvendar os caminhos metabólicos associados à resposta imune protetiva induzida pela vacina BCG.

Lee e colaboradores (2019), ao utilizarem técnicas de edição gênica para exclusão dos genes BAX e BAK em células LM-MEL-28 que expressam níveis mais altos de BAX e BAK, observaram que a deleção desses alvos pró-apoptóticos levou a uma redução de 2 a 20 vezes nos níveis de morte celular nas amostras analisadas (LEE et al., 2019b). Outro estudo utilizando uma vacina BCG recombinante (rBCG::ASP-BAX) encontrou, segundo os autores, um aumento significativo *in vitro* e *in vivo* de morte celular em macrófagos, resultante da alta expressão do gene BAX inserido no plasmídeo recombinante da cepa de BCG (LI et al., 2015). No entanto, este estudo não deixou claro aqueles mecanismos associados à liberação de BAX expresso no plasmídeo recombinante, e consequentemente, o seu mecanismo de escape do vacúolo fagolisossômico para o incorporamento à maquinaria celular eucariótica hospedeira. Além disso, os resultados quase não apresentam diferenças evidentes quanto à indução de apoptose em comparação

à cepa de BCG não transformada. Desta forma, o desenvolvimento de novas cepas de rBCG que tenham como intuito incorporar sequências gênicas dos alvos pró-apoptóticos ou inibidores de anti-apoptóticos, devem levar em consideração outros mecanismos que garantam a funcionalidade da transcrição/tradução do alvo selecionado, com o seu devido acoplamento do produto gerado à maquinaria celular.

Em nosso estudo, as cepas de BCG Moreau e Dinamarquesa induziram níveis maiores de expressão de BAX e BAK em comparação às cepas Pasteur e Russia. Esses resultados estão em concordância com as análises de morte celular por citometria de fluxo, que indicam um percentual maior de células em apoptose nas amostras tratadas com a cepa Moreau, em relação à cepa Russia. No entanto, o incremento desses dois alvos efetores, principalmente BAX, sofreu uma modulação ligeiramente discreta no tempo de infecção de 16 horas. Assim, propomos que as cepas de BCG com maiores níveis de indução dos alvos efetores de apoptose, como Moreau e Dinamarquesa, se estabelecem como boas candidatas para futuros modelos de rBCG na incorporação de plasmídeos recombinantes contendo sequências de genes pró-apoptóticos, como BAX e BAK1. Esta possibilidade já foi anteriormente aventada (ANTAS, 2016). É importante ressaltar que, para a efetividade do processo de aumento da expressão desses marcadores a partir de rBCG, será essencial garantir que os alvos apoptóticos adquiram capacidade de ultrapassar a barreira dos vacúolos fagolisossômicos para o citosol, local onde ocorrem os processos transcritivos e tradutivos. Um dos mecanismos associados à perda de compartimentalização do fagolisossomo que pode ser explorado, é a formação de poros na membrana fagolisossômica, a partir do uso de toxinas bacterianas, como a estreptolisina (BASTIAT-SEMPE et al., 2014).

Desde muito tempo, a avaliação do perfil de citocinas induzidas por diferentes patógenos é fundamental para a compreensão do ambiente celular estimulado por cepas vacinais (BALKWILL, 1988; VAN DER MEIDE; SCHELLEKENS, 1996). As citocinas avaliadas neste estudo foram previamente descritas como essenciais no estabelecimento de resposta imune frente a patógenos micobacterianos, seja com atividades associadas à indução de inflamação e morte celular, como IFN- γ , IL-1 β e TNF, ou com atividade anti-inflamatória, como é o caso da IL-10 (ANTAS et al., 2019; PONTE et al., 2015, 2018a; SIMAS et al., 2011). A indução de citocinas pró-inflamatórias pode sinalizar a expressão de moléculas pró-apoptóticas, como BAD, por intermédio da via de sinalização da fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K), além de controlar a expressão de BAX e induzir ou

inibir outros alvos da via intrínseca da apoptose (LOTTEM; SACHS, 1999). Em um contexto de infecção por *Mtb*, a liberação dessas citocinas pró-inflamatórias desempenha um papel crucial na robustez da resposta imune específica ao patógeno (PONTE et al., 2018a; SIMAS et al., 2011a).

Neste estudo, as cepas precoces Moreau e Russia foram utilizadas na avaliação do perfil de citocinas, por sua maior similaridade genealógica à cepa parental de BCG Pasteur original (BROSCH et al., 2007b). Aquelas duas cepas induzem níveis diferentes de IFN- γ , IL-1 β e TNF, sendo que este último está diretamente associado à indução e apoptose (KIM et al., 2010).

A cepa Moreau apresentou uma maior tendência ao perfil pró-apoptótico pela elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF, e alvos apoptóticos sensibilizadores, como o NOXA e, em menor nível, PUMA, além de apresentar níveis maiores de expressão de BAX e BAK nas amostras analisadas individualmente. Nossos resultados demonstraram níveis maiores de apoptose em células THP-1 e mononucleares humanos infectados pela cepa BCG Moreau, em detrimento à cepa BCG Russia, estando em concordância com dados já publicados (SILVA; PONTE; ANTAS, 2019b). Em contraponto, um estudo já demonstrou um aumento de necrose em modelo de células de cordão umbilical e sem contato prévio com micobactérias ambientais e cepas de BCG (SIMAS et al., 2011a). Outro estudo realizado em mononucleares humanos de indivíduos adultos saudáveis e neonatos infectados com as cepas BCG Moreau, Pasteur e Dinamarquesa, demonstrou que a BCG Moreau induziu níveis mais altos de apoptose em ambos os grupos, além de induzir uma maior resposta imune do tipo Th1 (PONTE et al., 2018a).

O IFN- γ já foi descrito em muitos estudos associados a indução de apoptose, mas não de necrose, em diferentes tipos de tecidos, inclusive frente a infecções pelo *Mtb*, potencializando a resposta imune de macrófagos e células T (ALDWELL; WEDLOCK; BUDDLE, 1997; LUO; CHEN; O'DONNELL, 2003; ULRICH et al., 2000). Em conjunto com IL-1 β , o IFN- γ pode induzir a expressão dos marcadores pró-apoptóticos, como o PUMA, em distintas células humanas, além de potencializar a oligomerização de BAX com BAK (GAO et al., 2010a; GURZOV et al., 2010).

O TNF atua como um forte indutor de apoptose, por induzir a expressão de BAX e sua oligomerização a BAK (SUNDARARAJAN et al., 2001). Estudos sugerem ainda que IFN- γ e TNF podem estabelecer uma colaboração na ativação de fatores transcricionais, como STAT1, IRF-1 e NF- κ B, associados a expressão de marcadores pró-apoptóticos,

como o PUMA e NOXA, e regulação negativa de marcadores anti-apoptóticos, como BCL-2 e BCL-XL (CAO et al., 2015; GAO et al., 2010b, 2010a; PARK et al., 2004; SUNDARARAJAN et al., 2001; WANG et al., 2009). Nossos achados demonstraram aumentos significativos na expressão de NOXA, IFN- γ e TNF, além de um aumento discreto na expressão de PUMA, em amostras infectadas com a cepa Moreau, seguindo uma menor expressão destes marcadores em conjunto estimulados com a cepa Russia.

Como já discutido, NOXA atua sensibilizando os marcadores efetores, induzindo a apoptose pela oligomerização de BAX e BAK (PANG et al., 2012). No caso de uma correlação direta perfeita, poderíamos inferir que a cepa Moreau, através da indução de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF, atua estabelecendo uma forte modulação sobre os alvos pró-apoptóticos em mononucleares humanos, em detrimento das demais cepas analisadas neste estudo. No entanto, a avaliação de outras vias de sinalização ainda são necessárias para o melhor estabelecimento da correlação entre essas citocinas, e a expressão de NOXA e PUMA observada.

Nossos achados corroboram com os resultados de Antas e colaboradores (2019), que demonstraram um aumento significativo na secreção de IL-1 β em células infectadas com BCG Moreau (ANTAS et al., 2019). Estudos anteriores e comparativos entre as respostas imunes induzidas *in vitro* pelas cepas Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia, demonstraram que a vacina BCG Moreau apresentou um perfil de citocinas pró-inflamatórias mais exacerbado, além de apresentar uma correlação positiva entre os níveis de IFN- γ com IL-1 β , IL-17 e IL-6, quando comparada às demais cepas (DA SILVA et al., 2022).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória associada à regulação da morte celular, e à indução de resposta imune do hospedeiro frente ao *Mtb* (KRISHNAN; ROBERTSON; THWAITES, 2013). Esta citocina pode contribuir para a indução de um outro padrão de morte celular diferente da apoptose, a piroptose, dependente de caspase-1 (KRISHNAN; ROBERTSON; THWAITES, 2013). Estudos já demonstraram níveis elevados de IL-1 β e caspase-1, indicando uma sinalização de padrão piroptótico de morte celular em células infectadas com BCG Moreau (ANTAS et al., 2019). Além disso, estudos dirigidos com células THP-1, demonstraram aumento de secreção de IL-1 β após a ativação do inflamossoma NLRP3, com desencadeamento de necrose (CULLEN et al., 2015).

Em estudos realizados com células de cordão umbilical de neonatos e estimuladas com a cepa BCG Moreau, foi possível observar um aumento nos níveis de necrose, mas

não de apoptose, em monócitos (SIMAS, et al., 2018). Desta forma, seria impossível descartar a possibilidade de sinalização para outros padrões de morte celular que não estejam associados diretamente à apoptose, sugerindo que a vacina BCG induz esses diferentes padrões durante a maturação do sistema imunológico (PONTE et al., 2018).

Por outro lado, a elevada expressão de IL-10 nas amostras infectadas com a cepa Moreau, levanta questões sobre o efeito protetor induzido pelas cepas de BCG ao antagonizar a apoptose. Estudos anteriores sugerem que níveis elevados de IL-10 podem estar associados à sobrevivência das micobactérias no hospedeiro, mesmo sob evidências que não esclarecem a real dicotomia entre as resposta imunes dos tipos Th1 e Th2, em relação à imunidade protetora *versus* a suscetibilidade à doença (FULTON et al., 1998; MURRAY; YOUNG, 1999; O’GARRA et al., 2013). Um estudo em modelo de infecção de TB pulmonar em DCs de camundongos deficientes de IL-10, demonstrou promoção de resposta imune do tipo Th1 frente à administração da vacina BCG (XU et al., 2019). Esta vacina aparentemente promove a expressão de IL-10, a partir do estabelecimento de um *feedback* positivo envolvendo SYK/PKC α/β , e levando à ativação da via STAT3 (VILLASEÑOR et al., 2019). Este processo associa a IL-10 a um incremento de BCL-2 e BCL-XL, por meio de mecanismos associados a ativação de uma cascata de sinalização, que culmina em elementos promotores destes dois alvos (THOMPSON et al., 2013). Esta afirmação está de acordo com os incrementos nos níveis de BCL-XL, estes compatíveis com o aumento na produção de IL-10, nas amostras infectadas com a cepa BCG Moreau observados em nosso estudo.

Outro estudo em modelo experimental de camundongos susceptíveis ao *Mtb*, demonstrou que o bloqueio do receptor 1 da IL-10 (IL10R1), melhorou substancialmente o efeito protetor de longo prazo da vacina BCG frente à infecção por *Mtb*, com o aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória, por até 47 semanas (DWIVEDI et al., 2022). Ressaltamos que estudos que visem investigar o impacto na produção de IL-10 e outras citocinas anti-inflamatórias na expressão dos alvos sensibilizadores NOXA e PUMA, e na ativação de BAX e BAK, merecem atenção, dada a sua importante contribuição aos mecanismos associados à modulação negativa de sensibilidade de células imunes frente ao *Mtb*.

Contradizendo certos pontos discutidos anteriormente, outros estudos sustentam a ideia do estabelecimento de um equilíbrio entre a sinalização pró e anti-apoptótica, como essencial para a resposta contra o *Mtb* induzido pelo BCG (SHECHTER et al., 2009;

THOMPSON et al., 2013). Visto que a expressão excessiva de marcadores e citocinas pró-inflamatórias pode resultar em extensos danos teciduais, já foi demonstrado em experimentos com monócitos com baixa expressão de IL-10 aumento de lesões extensivas e recuperação tecidual prejudicada em pacientes com lesão na medula espinhal (SHECHTER et al., 2009; THOMPSON et al., 2013). Ainda, a superexpressão de IL-10 não afetou o resultado de infecções por *Mtb* em estágios crônicos em camundongos, além de não comprometer a proteção conferida pela vacinação com BCG em células T já diferenciadas (FERREIRA et al., 2022). Estudos de Ferreira e colaboradores (2021), corroboram com esta afirmativa (FERREIRA et al., 2021). Desta forma, sugerimos que a elevada expressão de BCL-XL, e uma maior produção de IL-10, frente aos estímulos com as cepas de BCG, principalmente a cepa Moreau, pode resultar em uma resposta imune protetiva em células pré-sensibilizadas com esta cepa da vacina BCG, *Mtb* ou outras micobactérias ambientais, ao inibir a apoptose excessiva, propiciando um estímulo controlado à resposta imune citotóxica, com a manutenção da integridade do tecido infectado.

Nossos achados sugerem ainda que a cepa Moreau estabeleceu um balanço mais controlado entre a expressão de alvos pró e anti-apoptóticos dentre as cepas avaliadas neste estudo, sustentado, ainda, por um maior equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, em comparação à cepa Russia. Corroborando com isso, estudos já demonstraram diferenças quantitativas quanto à indução de citocinas de um perfil do tipo Th1 de células infectadas com distintas cepas de BCG (PONTE et al., 2018a). Neste estudo, as células infectadas com a cepa BCG Moreau apresentaram incrementos de IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, GM-CSF e G-CSF, em comparação às cepas Pasteur e Dinamarquesa (PONTE et al., 2018a). Outro estudo prévio demonstrou aumento de marcadores de ativação de células Treg nos adultos saudáveis, quando mononucleares foram infectados com a vacina BCG Moreau (PONTE et al., 2015). Outro estudo de coorte em neonatos imunizados com as cepas BCG Moreau e Russia, e acompanhados por 12 meses na Bahia, demonstrou aumentos significativos de IL-2, IL-10 e IL-4, apenas com a cepa BCG Moreau (BITENCOURT et al., 2021).

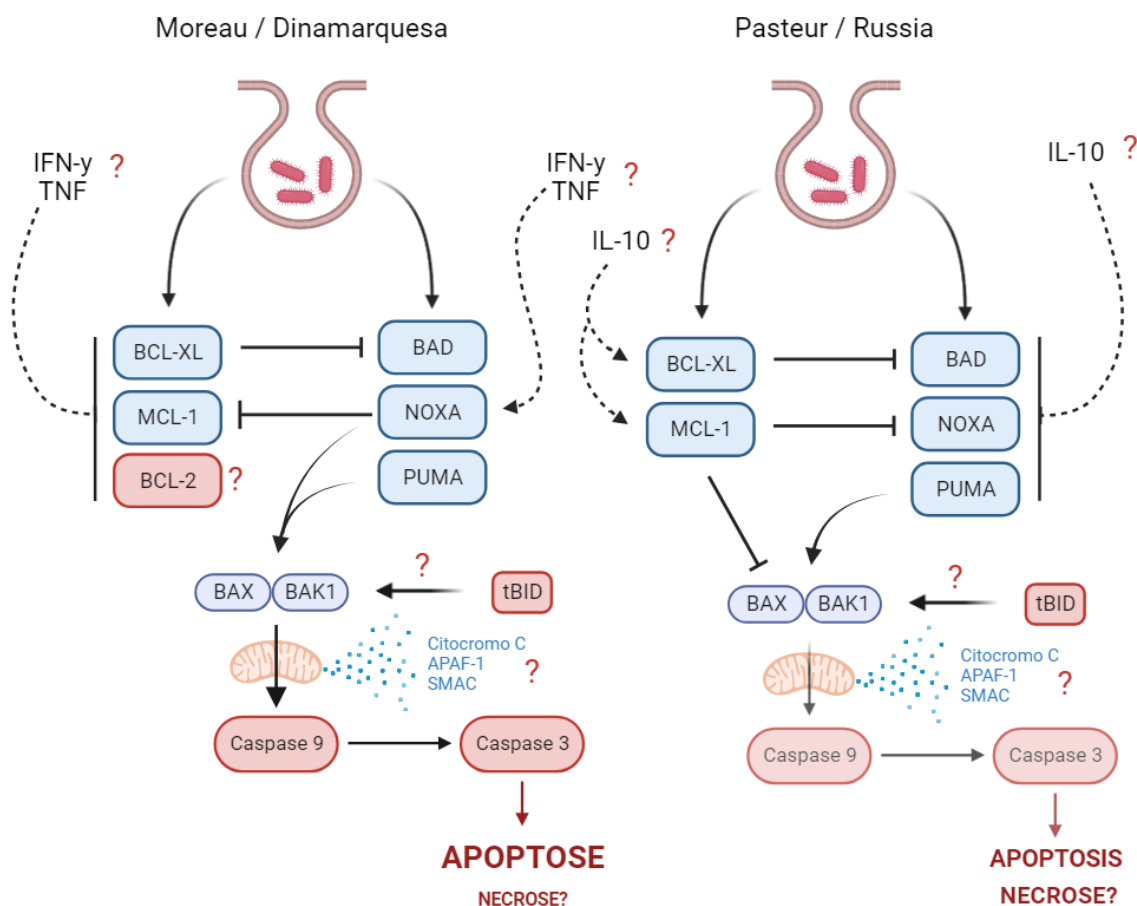
Esses achados levantam questões sobre o impacto da relação filogenética na indução de resposta imune através de mecanismos de morte celular, pois, embora todas as cepas de BCG derivem de uma mesma linhagem de *M. bovis* virulento, existem diferenças genéticas e bioquímicas entre elas que afetam a composição antigênica, e a

disponibilidade de epítomos associados à indução de resposta imune (BOTTAI; BROSCHE, 2016; ORGEUR; BROSCHE, 2018). A perda de RD2 marca a distinção entre as cepas precoces e tardias, o que indicaria que estas primeiras cepas conservam mais regiões associadas a expressão de epítomos a serem reconhecidos pelo sistema imunológico (BOTTAI; BROSCHE, 2016). Bottai e Brosch (2016) demonstraram diferenças entre as estruturas genéticas de diversas cepas da vacina BCG, sugerindo que as cepas precoces podem apresentar maior imunogenicidade pela proximidade genômica com a cepa parental BCG Pasteur original (BOTTAI; BROSCHE, 2016). No entanto, mesmo entre as cepas precoces, diferenças significativas na expressão de marcadores apoptóticos, citocinas pró e anti-inflamatórias e o próprio perfil de morte celular, foram observadas no presente estudo, e em outros (ANTAS et al., 2019; BEHR, 2002a; PONTE et al., 2015, 2018a; SIMAS et al., 2011a). Em resumo, mesmo com elevada proximidade genética, a variabilidade de indução de resposta imune frente às distintas cepas de BCG, sejam elas precoces ou tardias, afetam diretamente a ativação e polarização das respostas imunes a partir da liberação de diferentes perfis de citocinas e marcadores moleculares associados ao padrão de morte celular. Estes aspectos demonstram a relação altamente complexa entre as cepas de BCG, e a indução de resposta imune do hospedeiro.

Diante dos dados apresentados e discutidos neste estudo, modelos esquemáticos foram construídos para mostrar que a cepa BCG Moreau apresentou um maior potencial imunomodulador por intermédio da elevada expressão dos alvos pró-apoptóticos NOXA e, em menor nível, PUMA (figura 22). Ambos alvos podem estar envolvidos na ativação e oligomerização de BAX e BAK1 para a indução da apoptose (WILLIS et al., 2005). Em conjunto, o aumento nos níveis de IFN- γ e TNF apresentados nas amostras infectadas por esta cepa, podem atuar estabelecendo um ambiente pró-inflamatório potencializador da resposta imune contra o *Mtb*, incluindo a indução da apoptose. A supressão de MCL-1 parece estar sendo realizada pelos alvos sensibilizadores, principalmente NOXA na BCG Moreau, indicando que esta cepa de BCG, aparentemente, apresenta qualidades que a tornam uma forte candidata para investimentos em pesquisas de melhoria da vacina BCG (ANTAS, 2016). Em contrapartida, a cepa BCG Rússia, mesmo sendo classificada como uma cepa precoce e filogeneticamente próxima à cepa BCG Moreau, apresentou os menores níveis de IFN- γ e TNF, bem como dos alvos indutores de apoptose, como NOXA, PUMA, BAX e BAK1, sendo classificada, neste estudo, como a cepa com menor capacidade imunomodulatória (figura 22). A cepa BCG Dinamarquesa apresentou

melhores resultados moduladores de alvos tanto pró, quanto anti-apoptóticos, em relação às cepas BCG Pasteur e Russia, indicando que a BCG Dinamarquesa também pode ser uma interessante candidata para pesquisas de melhoramento da vacina (figura 22).

Figura 21 – Modelos de indução de apoptose proposto para as cepas BCG Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia.



Fonte: própria do autor (2023).

Nosso estudo apresenta limitações referentes ao tamanho amostral que dificultam o estabelecimento de correlações diretas e indiretas com os marcadores moleculares da via intrínseca da apoptose entre cepas de BCG estudadas, com a indução de apoptose e a secreção de citocinas. Estes dados preliminares encontram-se disponíveis no **apêndice B**. O conhecimento acerca de outros marcadores, tais como BIM, BID, APAF-1, citocromo c e as próprias caspases efetoras, possibilitariam um estudo mais aprofundado do comportamento apoptótico induzido pelas diferentes cepas vacinais de BCG. No caso de BIM e BID, não conseguimos seguir com os experimentos de padronização para estes

alvos. Ainda, por motivos limitadores da pesquisa, não foi possível analisar os níveis de morte celular e citocinas das cepas tardias Dinamarquesa e Pasteur das amostras utilizadas neste estudo, apesar desse tipo de dado já estar publicado na literatura (DA SILVA et al., 2022). Este último cenário impossibilitou o conhecimento da relação associada à menor disponibilidade de epítomos similares à cepa parental, e ao próprio *Mtb*, nas cepas tardias, em relação às cepas precoces. Além disso, a ausência de dados demográficos e clínicos das amostras de indivíduos adultos obtidas, impossibilita o estudo das relações imunes dos hospedeiros e outros determinantes sociais que podem influenciar na resposta induzida pela vacina BCG.

Acreditamos que novas investigações que visem estabelecer o perfil molecular, celular e de citocinas associadas a outros padrões de morte celular, como piroptose e necroptose, nos mononucleares humanos infectados com BCG, em conjunto com os achados descritos neste estudo, indicarão uma via de compreensão mais clara quanto à resposta imune das distintas cepas de BCG em indivíduos vacinados. Desta forma, auxiliando no desenvolvimento de metodologias vacinais mais robustas que tenham como foco a modulação de marcadores moleculares apoptóticos com potencial indução de uma resposta imune robusta e menos variável ao *Mtb*.

7. CONCLUSÃO

- Padronizamos um protocolo de qRT-PCR em tempo real para a quantificação dos alvos apoptóticos BAD, NOXA, PUMA, BCL-XL, MCL-1, BAX, BAK1, GAPDH, 18S, β -actina e β -2-microglobulina em células humanas.
- Avaliamos e confirmamos *in vitro* a estabilidade e eficiência dos alvos endógenos GAPDH e β -2-microglobulina, dentre os quatro elencados para uso em células humanas.
- Padronizamos *in vitro* e com sucesso os ensaios de expressão relativa de alvos apoptóticos em mononucleares humanos infectados com as cepas de BCG Moreau, Dinamarquesa, Pasteur e Russia.
- Quantificamos *in vitro* os mRNA de BCL-XL e NOXA com níveis elevados em todas as cepas de BCG analisadas, exceto a cepa Russia. MCL-1 e PUMA apresentaram incrementos de mRNA na BCG Dinamarquesa. Tanto BAX, quanto BAK, não sofreram grandes alterações, com leves incrementos para BCG Moreau e Dinamarquesa.
- Corroboramos *in vitro* um aumento expressivo da apoptose em mononucleares humanos infectados com a cepa BCG Moreau, em relação à cepa BCG Russia e ao controle aquecido.
- Presenciamos novamente um aumento significativo nos níveis *in vitro* de IFN- γ e TNF em mononucleares humanos infectados com a cepa BCG Moreau, em relação ao controle não estimulado e a cepa BCG Russia.

REFERÊNCIAS

AAGAARD, C. et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 189–195, fev. 2011.

ABDALLAH, A. M. et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15443, 21 out. 2015.

ABDALLAH, A. M.; BEHR, M. A. Evolution and strain variation in BCG. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York. Springer New York LLC, 2017. v. 1019p. 155–169.

ABEBE, F. Is interferon-gamma the right marker for bacille Calmette-Guérin-induced immune protection? The missing link in our understanding of tuberculosis immunology. **Clinical and Experimental Immunology**, set. 2012.

ACKLEY, S. F. et al. Multiple exposures, reinfection and risk of progression to active tuberculosis. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 3, p. 180999, 20 mar. 2019.

ACUÑA-VILLAORDUÑA, C. et al. Intensity of exposure to pulmonary tuberculosis determines risk of tuberculosis infection and disease. **European Respiratory Journal**, v. 51, n. 1, p. 1701578, 18 jan. 2018.

ADAMS, J. M. BAX and BAK become killers without a BH3 trigger. **Cell Research**, v. 29, n. 12, p. 967–968, 15 dez. 2019.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–787, 17 ago. 2000.

AHMED, A. et al. A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. **Immunological Reviews**, v. 301, n. 1, p. 98–121, 6 maio 2021.

ALDWELL, F.; WEDLOCK, D.; BUDDLE, B. Sequential activation of alveolar macrophages by IFN- γ and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M. bovis* BCG. **Immunology and Cell Biology**, v. 75, n. 2, p. 161–166, abr. 1997.

ANDERSEN, P.; KAUFMANN, S. H. E. Novel Vaccination Strategies against Tuberculosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 6, p. a018523–a018523, 1 jun. 2014.

ANTAS, P. R. Z. Crucial requirement for standardization during the development of novel recombinant BCG vaccines: Does the corresponding substrain background matter? **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 12, p. 3099–3102, 25 dez. 2016.

ANTAS, P. R. Z. et al. The in vitro *Mycobacterium bovis* BCG Moreau infection of human monocytes that induces Caspase-1 expression, release and dependent cell death is mostly reliant upon cell integrity. **Journal of Inflammation**, v. 16, n. 1, p. 18, 15 dez. 2019.

- ARCOS, J. et al. Human Lung Hydrolases Delineate Mycobacterium tuberculosis – Macrophage Interactions and the Capacity To Control Infection. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 372–381, 1 jul. 2011.
- ARTENSTEIN, A. W. Vaccines: A Biography. New York: **Springer** New York, 2010.
- BALBOA, L. et al. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: Role of p38 MAPK. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 2, p. 335–347, fev. 2013.
- BALKWILL, F. Cytokines — soluble factors in immune responses. **Current Opinion in Immunology**, v. 1, n. 2, p. 241–249, dez. 1988.
- BARBER-MAYER, K. D.; BARBER, D. L. Innate and adaptive cellular immune responses to Mycobacterium tuberculosis infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 12, 1 dez. 2015.
- BAR-OZ, M.; MEIR, M.; BARKAN, D. Virulence-Associated Secretion in Mycobacterium abscessus. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 8 jul. 2022.
- BASTIAT-SEMPE, B. et al. Streptolysin O and NAD-Glycohydrolase Prevent Phagolysosome Acidification and Promote Group A Streptococcus Survival in Macrophages. **mBio**, v. 5, n. 5, 31 out. 2014.
- BATISTA, L. A. F. et al. Tuberculosis: A granulomatous disease mediated by epigenetic factors. **Tuberculosis**, v. 123, p. 101943, jul. 2020.
- BEDOUI, S.; HEROLD, M. J.; STRASSER, A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 11, p. 678–695, 1 nov. 2020.
- BEHAR, S. M. et al. Lipids, apoptosis, and cross-presentation: links in the chain of host defense against Mycobacterium tuberculosis. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 8–9, p. 749–756, ago. 2011.
- BEHR, M. A. et al. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. **Science**, v. 284, n. 5419, p. 1520–1523, 28 maio 1999.
- BEHR, M. A. BCG — different strains, different vaccines? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 86–92, fev. 2002.
- BELLONE, M. Apoptosis, cross-presentation, and the fate of the antigen specific immune response. **Kluwer Academic Publishers**, 2000.
- BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T. C. et al. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis - review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 459–465, ago. 2005.
- BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 5, p. 1106–1121, 30 maio 2021.

BHATT, K.; SALGAME, P. Host Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 4, p. 347–362, 16 jul. 2007.

BITENCOURT J, SARNO A, OLIVEIRA C, SOUZA RA, LIMA CC, TAKENAMI I, PEREIRA SM, ARRUDA S. Comparing cytokine production and clinical response following vaccination with BCG Moreau and BCG Russia strains in a Brazilian infant population. *Vaccine*. 2021 May 27;39(23):3189-3196. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.04.028. Epub 2021 May 5. PMID: 33965255.

BOTTAI, D.; BROSCHE, R. The BCG Strain Pool: Diversity Matters. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 2, p. 201–203, fev. 2016.

BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, VAN SOOLINGEN D, COLE ST. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002 Mar 19;99(6):3684-9. doi: 10.1073/pnas.052548299.

BROSCH, R. et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 13, p. 5596–5601, 27 mar. 2007.

BRUST, J. C. M. et al. Integrated, home-based treatment for MDR-TB and HIV in rural South Africa: An alternate model of care. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 1 ago. 2012.

BUFFEN, K. et al. Autophagy Controls BCG-Induced Trained Immunity and the Response to Intravesical BCG Therapy for Bladder Cancer. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004485, 30 out. 2014.

CABRINI, M.; NAHMOD, K.; GEFFNER, J. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. **Current Opinion in Hematology**, jan. 2010.

CALMETTE, M. M.; GUÉRIN, C. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux cultivé sur la bile. **Compte rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, p. 1456, 28 dez. 1908.

CAO, Z. et al. STAT1-Mediated Down-Regulation of Bcl-2 Expression Is Involved in IFN- γ /TNF- α -Induced Apoptosis in NIT-1 Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120921, 26 mar. 2015.

CARDONA, P.-J. Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 1, p. 38–46, jan. 2018.

CDC. **National action plan for combating multidrug-resistant tuberculosis**. USA, may, 2018.

CHARLET, D. et al. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in Mycobacterium bovis BCG strains due to a start codon mutation in sigK. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1302–1313, 30 mar. 2005.

CHEN, H.-C. et al. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 10, p. 1270–1281, 7 out. 2015.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, abr. 1987.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, jun. 1998.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. Mycobacteria. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 4067–4072, 2003.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647–656, 1 set. 2002.

COVIÁN, C. et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 29 nov. 2019.

CREAGH EM, CONROY H, MARTIN SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev.** 2003 Jun;193:10-21. doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00048.x

CULLEN, S. P. et al. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 β Secretion by Triggering Necrosis. **Cell Reports**, v. 11, n. 10, p. 1535–1548, jun. 2015.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 20 jan. 2014.

DA SILVA, A. S. M. et al. Time to face the proofs: the BCG Moreau vaccine promotes superior inflammatory cytokine profile in vitro when compared with Russia, Pasteur, and Danish strains. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 18, n. 1, 31 jan. 2022.

D'AMBROSIO, L. et al. Supporting clinical management of the difficult-to-treat TB cases: The ERS-WHO TB Consilium. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 32, p. 156–160, 1 mar. 2015.

DAVIES, M.-A. HIV and risk of COVID-19 death: a population cohort study from the Western Cape Province, South Africa. **medRxiv : the preprint server for health sciences**, 3 jul. 2020.

DEL GAIZO MOORE, V. et al. BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 2300–2309, 15 fev. 2008.

DELOGU, G. et al. Mycobacterium tuberculosis virulence: insights and impact on vaccine development. **Future Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1177–1194, jul. 2015.

- DESIKAN, S.; NARAYANAN, S. Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in Mycobacterium tuberculosis. Indian Journal of Medical Research. **Indian Council of Medical Research**, 22 jul. 2015.
- DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 387, n. 10024, p. 1211–1226, mar. 2016.
- DICKENS, L. S. et al. A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. **Molecular Cell**, v. 47, n. 2, p. 291–305, 27 jul. 2012.
- DINKELE, R. et al. Aerosolization of Mycobacterium tuberculosis by tidal breathing. **Wood, Robin**, 18 out. 2021.
- DIVANGAHI M, BEHAR SM, REMOLD H. Dying to live: how the death modality of the infected macrophage affects immunity to tuberculosis. **Adv Exp Med Biol**. 2013;783:103-20. doi: 10.1007/978-1-4614-6111-1_6
- DOCKRELL, H. M.; SMITH, S. G. What have we learnt about BCG vaccination in the last 20 years? **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A, 13 set. 2017.
- DWIVEDI, V. et al. IL-10 Receptor Blockade Delivered Simultaneously with Bacillus Calmette–Guérin Vaccination Sustains Long-Term Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 208, n. 6, p. 1406–1416, 15 mar. 2022.
- EDLICH, F. et al. Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. **Cell**, v. 145, n. 1, p. 104–116, abr. 2011.
- EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2013.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 25 jun. 2007.
- ESCOMBE, A. R. et al. The Detection of Airborne Transmission of Tuberculosis from HIV-Infected Patients, Using an In Vivo Air Sampling Model. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 10, p. 1349–1357, 15 maio 2007.
- ESTERHUYSE, M. M.; LINHART, H. G.; KAUFMANN, S. H. E. Can the battle against tuberculosis gain from epigenetic research? **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 220–226, maio 2012.
- FAIRLIE WD, TRAN S, LEE EF. Crosstalk between apoptosis and autophagy signaling pathways. **Int Rev Cell Mol Biol**. 2020;352:115-158. doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.01.003. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32334814.
- FAKSRI, K. et al. In silico region of difference (RD) analysis of Mycobacterium tuberculosis complex from sequence reads using RD-Analyzer. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 2 nov. 2016.

- FAN, T. J. et al. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 11, p. 719–727, nov. 2005.
- FATIMA, S. et al. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. **Life sciencesNLM (Medline)**, , 1 jul. 2020.
- FAVOROV, M. et al. Comparative Tuberculosis (TB) Prevention Effectiveness in Children of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Vaccines from Different Sources, Kazakhstan. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32567, 9 mar. 2012.
- FERREIRA, C. M. et al. Early IL-10 promotes vasculature-associated CD4⁺ T cells unable to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **JCI Insight**, v. 6, n. 21, 8 nov. 2021.
- FERREIRA, C. M. et al. IL-10 Overexpression After BCG Vaccination Does Not Impair Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 22 jul. 2022.
- FORCHETTE, L.; SEBASTIAN, W.; LIU, T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. **Current Medical Science**. Huazhong University of Science and Technology, , 1 dez. 2021.
- FRATAZZI, C. et al. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, n. 5, p. 763–764, 1 nov. 1999.
- FREITAS, F. C. P. et al. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in three stingless bee species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17692, 27 nov. 2019.
- FU, T. M. et al. Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex. **Molecular Cell**, v. 64, n. 2, p. 236–250, 20 out. 2016.
- FULTON, S. A. et al. Regulation of Interleukin-12 by Interleukin-10, Transforming Growth Factor- β , Tumor Necrosis Factor- α , and Interferon- γ in Human Monocytes Infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 4, p. 1105–1114, out. 1998.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 15 jan. 2012.
- GAMBHIR, S. et al. **Imaging in extrapulmonary tuberculosis**. **International Journal of Infectious Diseases**Elsevier B.V., , 1 mar. 2017.
- GAO, J. et al. IRF-1 transcriptionally upregulates PUMA, which mediates the mitochondrial apoptotic pathway in IRF-1-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 4, p. 699–709, 23 abr. 2010.
- GORDON, S. V. et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 643–655, maio 1999.

GREAVES, G. et al. PO-061 BCL-2 family of proteins, BCL-XL and MCL-1, regulate apoptosis and cancer cell survival by different mechanisms. **ESMO Open**, v. 3, p. A44–A45, jun. 2018.

GRIMSLEY, C.; RAVICHANDRAN, K. S. Cues for apoptotic cell engulfment: Eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. **Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd**, , 2003.

GUILLIAMS, M. et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p. 571–578, 18 ago. 2014.

GURZOV, E. N. et al. p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis (PUMA) Activation Contributes to Pancreatic β -Cell Apoptosis Induced by Proinflammatory Cytokines and Endoplasmic Reticulum Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 26, p. 19910–19920, jun. 2010.

HANEKOM, W. A. The Immune Response to BCG Vaccination of Newborns. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1062, n. 1, p. 69–78, 1 dez. 2005.

HANSEN, I. S.; BAETEN, D. L. P.; DEN DUNNEN, J. The inflammatory function of human IgA. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 6, p. 1041–1055, 29 mar. 2019.

HARGREAVES, J. R. et al. The social determinants of tuberculosis: from evidence to action. **American journal of public health**, v. 101, n. 4, p. 654–662, abr. 2011.

HELDWEIN, K. A. et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 2, p. 277–286, ago. 2003.

HELMING, L.; GORDON, S. The molecular basis of macrophage fusion. **Immunobiology**, v. 212, n. 9–10, p. 785–793, jan. 2008.

HILL, M. M. et al. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 10, p. 2134–2145, 19 maio 2004.

HO, M. M. et al. WHO Informal Consultation on standardization and evaluation of BCG vaccines Geneva, Switzerland 22-23 September 2009. **Vaccine**. 8 out. 2010.

HOLZERLAND, J. et al. BH3-only sensors Bad, Noxa and Puma are Key Regulators of Tacaribe virus-induced Apoptosis. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008948, 12 out. 2020.

JOZA, N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 549–554, mar. 2001.

KALKAVAN, H.; GREEN, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46–55, 20 jan. 2018.

- KAUFMANN, E. et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 176–190.e19, jan. 2018.
- KAUFMANN, S. H. E. Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 172–181, abr. 2013.
- KELLER, P. M.; BÖTTGER, E. C.; SANDER, P. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural recA mutant. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 120, 17 dez. 2008.
- KESHAVJEE, S. et al. Treating multidrug-resistant tuberculosis in Tomsk, Russia: Developing programs that address the linkage between poverty and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences** Blackwell Publishing Inc., 2008.
- KIM, H. et al. Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 36, n. 3, p. 487–499, nov. 2009.
- KIM, J. J. et al. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1420–1434, 5 set. 2010.
- KIST, M.; VUCIC, D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 5, mar. 2021.
- KLEINNIJENHUIS, J. et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17537–17542, 23 out. 2012.
- KLINGLER, K. et al. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5272–5278, dez. 1997.
- KOZAK, R. A. et al. Region of Difference 2 Contributes to Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 59–66, jan. 2011.
- KRISHNAN, N.; ROBERTSON, B. D.; THWAITES, G. Pathways of IL-1 β secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Tuberculosis**, v. 93, n. 5, p. 538–547, set. 2013.
- KRYSZTOPA-GRZYBOWSKA K, LUTYŃSKA A. Microevolution of BCG substrains. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016 Dec 21;70(0):1259-1266.
- KUMARI, P.; MEENA, L. S. Factors Affecting Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*: a Close View of Immunological Defence Mechanism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 8, p. 2663–2673, 9 dez. 2014.
- LAI, Y.-M. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by BCG infection in cultured human bronchial airway epithelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 293, n. 2, p. L393–L401, ago. 2007.

LANGE, C. et al. Tuberculosis. **Internist**, v. 60, n. 11, p. 1155–1175, 1 nov. 2019.

LANGE, C. et al. 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. **The Lancet Infectious Diseases**. Elsevier Ltd, , 1 jan. 2022.

LEE, E. F. et al. BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 5, p. 342, 24 abr. 2019.

LI, G. et al. A novel recombinant BCG-expressing pro-apoptotic protein BAX enhances Th1 protective immune responses in mice. **Molecular Immunology**, v. 66, n. 2, p. 346–356, ago. 2015.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 97–130, 1 jan. 2002.

LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):487-501. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00237-9.

LOTEM, J.; SACHS, L. Cytokines as suppressors of apoptosis. **APOPTOSIS**, v. 4, n. 3, p. 187–196, 1999.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG Vaccine. **Maedica A Journal of Clinical Medicine**. 8(1): 53-58. Mar, 2013.

LUO, Y.; CHEN, X.; O'DONNELL, M. A. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN- γ production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. **Cytokine**, v. 21, n. 1, p. 17–26, jan. 2003.

LYON, S. M.; ROSSMAN, M. D. Pulmonary Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, 24 fev. 2017.

MAHAIRAS, G. G. et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 5, p. 1274–1282, mar. 1996.

MCEVOY, C. R. E. et al. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 87, n. 5, p. 393–404, set. 2007.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P.; PÉREZ, A.; RIVERA, L. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced activation of PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways regulates expression of CXCL10 in epithelial cells. **Cellular Immunology**, v. 256, n. 1–2, p. 12–18, 2009.

MIKHAILOV, V. et al. Association of Bax and Bak Homo-oligomers in Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 5367–5376, fev. 2003.

MITCHELL, G.; CHEN, C.; PORTNOY, D. A. Strategies Used by Bacteria to Grow in Macrophages. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, 6 maio 2016.

- MOLIVA, J. I.; TURNER, J.; TORRELLES, J. B. Immune Responses to Bacillus Calmette–Guérin Vaccination: Why Do They Fail to Protect against *Mycobacterium tuberculosis*? **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 407, 5 abr. 2017.
- MOORLAG, S. J. C. F. M. et al. BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils. **Cell Reports**, v. 33, n. 7, p. 108387, nov. 2020.
- MOREL, C. et al. Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 2, p. 437–447, fev. 2008.
- MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 12, p. 933–944, 1 dez. 2002.
- MURRAY, P. J.; YOUNG, R. A. Increased Antimycobacterial Immunity in Interleukin-10-Deficient Mice. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 3087–3095, jun. 1999.
- NAKAJIMA, W.; TANAKA, N. Synergistic Induction of Apoptosis by p53-inducible Bcl-2 Family Proteins Noxa and Puma. **Journal of Nippon Medical School**, v. 74, n. 2, p. 148–157, 2007.
- NAKAJIMA, W.; TANAKA, N. Noxa induces apoptosis in oncogene-expressing cells through catch-and-release mechanism operating between Puma and Mcl-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 413, n. 4, p. 643–648, out. 2011.
- NATARAJAN, A. et al. A systemic review on tuberculosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 67, n. 3, p. 295–311, jul. 2020.
- O’GARRA, A. et al. The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 475–527, 21 mar. 2013.
- ORGEUR, M.; BROSCHE, R. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Current Opinion in Microbiology**, v. 41, p. 68–75, 1 fev. 2018.
- PALAGA, T. et al. Notch signaling regulates expression of Mcl-1 and apoptosis in PPD-treated macrophages. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 10, n. 5, p. 444–452, 22 set. 2013.
- PANG, Y.-P. et al. Bak Conformational Changes Induced by Ligand Binding: Insight into BH3 Domain Binding and Bak Homo-Oligomerization. **Scientific Reports**, v. 2, n. 1, p. 257, 10 fev. 2012.
- PARK, S.-Y. et al. IFN- γ enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 21, p. 4222–4228, 20 out. 2004.
- PEÑA-BLANCO, A.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 3, p. 416–431, 4 fev. 2018.
- PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W. Mycobacterium. Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition. **Elsevier Ltd.**, 2013. p. 177–207.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. **Cell Death and Differentiation**, 1 jan. 2003.

PFAFFL, M. W. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36e–336, 1 maio 2002.

DEL POETA G, BRUNO A, DEL PRINCIPE MI, VENDITTI A, MAURILLO L, BUCCISANO F, STASI R, NERI B, LUCIANO F, SINISCALCHI A, DE FABRITIIS P, AMADORI S. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. **Curr Cancer Drug Targets**. 2008 May;8(3):207-22. doi: 10.2174/156800908784293640.

PONTE, C. et al. In vitro T-cell profile induced by BCG Moreau in healthy Brazilian volunteers. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 450–457, fev. 2015.

PONTE, C. et al. The patterns of in vitro cell-death and inflammatory cytokines induced by distinct BCG vaccine strains are differentially induced in human mononuclear cells. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 1, p. 28–35, 2 jan. 2018

PREZZEMOLO, T. et al. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 22 abr. 2014.

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 709–717, 31 out. 2002.

QUARLERI J, CEVALLOS C, DELPINO MV. Apoptosis in infectious diseases as a mechanism of immune evasion and survival. **Adv Protein Chem Struct Biol**. 2021;125:1-24. doi: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.001.

QUELAPIO MI, MIRA NR, ORILLAZA-CHI RB, BELEN V, MUÑEZ N, BELCHEZ R, EGOS GE, EVANGELISTA M, VIANZON R, TUPASI TE. Responding to the multidrug-resistant tuberculosis crisis: mainstreaming programmatic management to the Philippine National Tuberculosis Programme. **Int J Tuberc Lung Dis**. 2010, v. 14, n. 6, p. 751-757.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–366, 20 maio 2012.

RATH, S. et al. Regulation of Noxa-mediated apoptosis in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 3, p. 796–806, 17 mar. 2015.

RAVICHANDRAN, K. S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 9, p. 1807–1817, 30 ago. 2010.

RITZ, N. et al. The Influence of Bacille Calmette-Guérin Vaccine Strain on the Immune Response against Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 2, p. 213–222, 15 jan. 2012.

- ROUFAYEL, R. et al. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. **Life**, v. 12, n. 2, p. 256, 9 fev. 2022.
- SALGAME, P. MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 5, p. 1686–1688, 2 maio 2011.
- SAMEER, A. S.; NISSAR, S. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–14, 12 set. 2021.
- SAMPATH, P. et al. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 30 jul. 2018.
- SAMPERIO, P. M.; TREJO, A.; MIRANDA, E. Role of type I interferon in the bacillus Calmette-Guérin-induced expression of CXCL10 from human monocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 5–6, p. 343–348, 2004.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.
- SEBASTIAN KAMPS, B.; BOURCILLIER, P. **Palomino-Leão-Ritacco From basic science to patient care**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.TuberculosisTextbook.com>.
- SEBINA, I. et al. Long-Lived Memory B-Cell Responses following BCG Vaccination. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51381, 11 dez. 2012.
- SENDIDE, K. et al. Cross-Talk between CD14 and Complement Receptor 3 Promotes Phagocytosis of Mycobacteria: Regulation by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Cytohesin-1. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4210–4219, 1 abr. 2005.
- SEYREK, K. et al. Controlling Cell Death through Post-translational Modifications of DED Proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 5, p. 354–369, 1 maio 2020.
- SHAKERI, R.; KHEIROLLAHI, A.; DAVOODI, J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. **Biochimie**, v. 135, p. 111–125, abr. 2017.
- SHECHTER, R. et al. Infiltrating Blood-Derived Macrophages Are Vital Cells Playing an Anti-inflammatory Role in Recovery from Spinal Cord Injury in Mice. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000113, 28 jul. 2009.
- SHIBUE, T. et al. Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 20, p. 4952–4962, 18 out. 2006.
- SILVA et al. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin or DNA vaccination. **Immunology**, v. 97, n. 4, p. 573–581, ago. 1999.
- SILVA, A.; PONTE, C.; ANTAS, P. R. Z. What a difference a strain makes! **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 23, n. 7, p. 874–874, 1 jul. 2019.

- SIMAS, C. J. A. et al. Patterns of in vitro cell-death, metalloproteinase-9 and pro-inflammatory cytokines in human monocytes induced by the BCG vaccine, Moreau strain. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6446–6450, set. 2011.
- SIMEONE, R. et al. Phagosomal Rupture by *Mycobacterium tuberculosis* Results in Toxicity and Host Cell Death. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002507, 2 fev. 2012.
- SINGH, A. K.; NETEA, M. G.; BISHAI, W. R. BCG turns 100: its nontraditional uses against viruses, cancer, and immunologic diseases. **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, v. 131, n. 11, p. e148291, 1 jun. 2021.
- SINHA, P. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, 12 mar. 2016.
- SLY, L. M. et al. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Host Macrophages Involves Resistance to Apoptosis Dependent upon Induction of Antiapoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 430–437, 1 jan. 2003.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis*: Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 463–496, jul. 2003.
- SRIPAD, A. et al. Effects of Ecuador's national monetary incentive program on adherence to treatment for drug-Resistant tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 1, p. 44–48, 1 jan. 2014.
- STAM, R. W. et al. Association of high-level MCL-1 expression with in vitro and in vivo prednisone resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 1018–1025, 4 fev. 2010.
- STORLA, D. G.; YIMER, S.; BJUNE, G. A. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. **BMC Public Health**, v. 8, n. 1, p. 15, 14 dez. 2008.
- SUÁREZ, I. et al. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. **Deutsches Ärzteblatt international**, 25 out. 2019.
- SUBBARAO, K. The success of SARS-CoV-2 vaccines and challenges ahead. *Cell Host and Microbe*. **Cell Press**, v. 29, n. 7, p. 1111–1123, 14 jul. 2021.
- SUNDARARAJAN, R. et al. Tumor Necrosis Factor- α Induces Bax-Bak Interaction and Apoptosis, Which Is Inhibited by Adenovirus E1B 19K. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45120–45127, nov. 2001.
- SUSEK, K. H. et al. The Role of CXC Chemokine Receptors 1–4 on Immune Cells in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 25 set. 2018.

- TAYLOR, J. L. et al. Role for Matrix Metalloproteinase 9 in Granuloma Formation during Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6135–6144, nov. 2006.
- TESTA U, RICCIONI R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. **Haematologica**. 2007 Jan;92(1):81-94. doi: 10.3324/haematol.10279.
- THOMPSON, C. D. et al. The Therapeutic Role of Interleukin-10 after Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 15, p. 1311–1324, ago. 2013.
- ULRICHS, T. et al. Numbers of IFN-gamma-producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. **International Journal of Tuberculosis Lung Disease**, v. 4, n. 12, p. 1181–1183, 4 dez. 2000.
- URANGA, S. et al. Protective Efficacy and Pulmonary Immune Response Following Subcutaneous and Intranasal BCG Administration in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 115, 19 set. 2016.
- VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 2002.
- VAN DER MEIDE, P. H.; SCHELLEKENS, H. Cytokines and the immune response. **Biotherapy**, v. 8, n. 3–4, p. 243–249, set. 1996.
- VAN INGEN, J. *Mycobacteria*. **Infectious Diseases, 2-Volume Set**. Elsevier, 2017. p. 1645-1659.e2.
- VAN LOO, G. et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 1, p. 20–26, 21 jan. 2002.
- VERHAGEN, A. M. et al. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 43–53, jul. 2000.
- VILLASEÑOR, T. et al. *Mycobacterium bovis* BCG promotes IL-10 expression by establishing a SYK/PKC α/β positive autoregulatory loop that sustains STAT3 activation. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 3, 1 abr. 2019.
- VOLOKHOV, D. V. et al. Molecular detection of drug-resistant mycobacterium tuberculosis with a scanning-frame oligonucleotide microarray. **Methods in Molecular Biology**, v. 465, p. 395–417, 2008.
- VON STEBUT, E. Was ist ein Granulom? **Der Hautarzt**, v. 68, n. 7, p. 520–525, 2 jul. 2017.
- WAMAN, V. P. et al. Mycobacterial genomics and structural bioinformatics: opportunities and challenges in drug discovery. **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 109-118, 1 jan. 2019.

WANG, F. et al. Suppression of Mcl-1 induces apoptosis in mouse peritoneal macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. **Microbiology and Immunology**, v. 60, n. 4, p. 215–227, abr. 2016.

WANG, J. et al. Autophagy regulates apoptosis by targeting NOXA for degradation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 8, p. 1105–1113, ago. 2018.

WANG, P. et al. PUMA is directly activated by NF- κ B and contributes to TNF- α -induced apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 9, p. 1192–1202, 15 set. 2009.

WANG, X. et al. The regulatory role of Mcl-1 in apoptosis of mouse peritoneal macrophage infected with M. tuberculosis strains that differ in virulence. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 10, n. 7, p. 7565–7577, 1 jul. 2017.

WHO. THE STOP TB STRATEGY: Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. **World Health Organization**, 2006.

WHO. **Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing**. The World Health Organization monitors the global tuberculosis epidemic and evaluates surveillance, planning and financial data in support of national TB control programmes. WHO report, 2007.

WHO. **International collaborative study to evaluate and establish the 1st WHO reference reagent of BCG vaccine of moreau-RJ sub-strain**. p. 1–33, 2012.

WHO. **Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines**, Annex 3, TRS No 979. p. 1–50, 31 dez. 2013.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2015**. World Health Organization, 2015.

WHO. **GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021**. World Health Organization, 14 oct. 2021.

WHO. **WHO Information Note. COVID-19: considerations for tuberculosis (TB) care**. World Health Organization, 5 may 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/tuberculosis>>.

WHO. **Global Tuberculosis report**. World Health Organization. 27 oct. 2022. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>.

WICKY, B. et al. Spontaneous oligomerization of BAK/BAX is suppressed by heterodimerization with MCL-1. **BioRxiv**, 4 set. 2019.

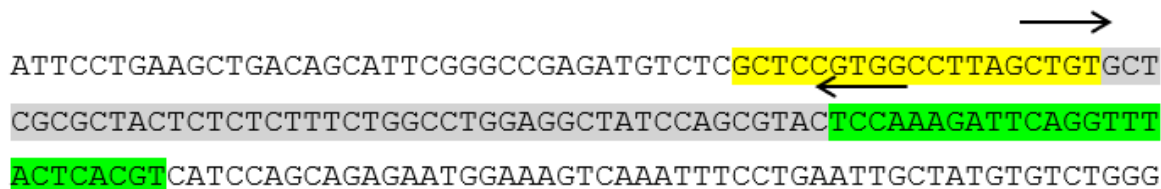
WILLIS, S. N. et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-x_L, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. **Genes & Development**, v. 19, n. 11, p. 1294–1305, 1 jun. 2005.

WILSON, N. S.; DIXIT, V.; ASHKENAZI, A. Death receptor signal transducers: Nodes of coordination in immune signaling networks. **Nature Immunology**, 2009.

- WIRTH, T. et al. Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, set. 2008.
- WONG, K.-W. The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 19 maio 2017.
- XIE, F.; WANG, J.; ZHANG, B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. **Functional & Integrative Genomics**, v. 23, n. 2, p. 125, 15 jun. 2023.
- XU, H. et al. IL-10 Dampens the Th1 and Tc Activation through Modulating DC Functions in BCG Vaccination. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 1–10, 12 jun. 2019.
- YAMAZAKI-NAKASHIMADA, M. A. et al. BCG: a vaccine with multiple faces. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 16, n. 8, p. 1841–1850, 2 ago. 2020.
- YOSHIMURA, F. K. et al. Tuberculose: revisão de literatura/ Tuberculosis: a review of the literature. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 14223–14231, 29 jun. 2021.
- YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 47–59, jan. 2008.
- ZHANG, W. et al. Genome Sequencing and Analysis of BCG Vaccine Strains. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71243, 19 ago. 2013.
- ZHU, B. et al. Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. **Respirology**, v. 23, n. 4, p. 359-368, 1 abr. 2018.

ANEXO A – PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR ANÁLISE *IN SILICA*

>NM_004048.4 Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA
89 bp

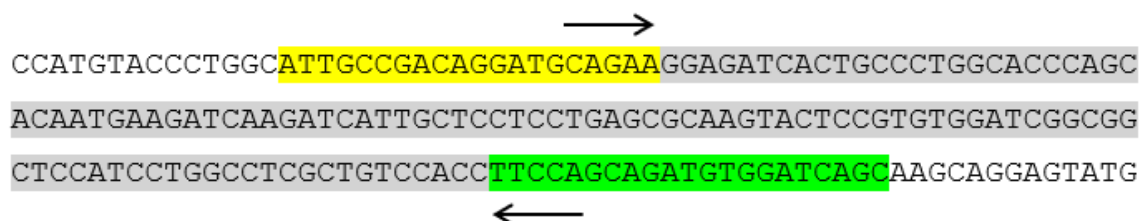


 ATTCCTGAAGCTGACAGCATTTCGGGCCGAGATGTCTC **GCTCCGTGGCCTTAGCTGT** GCT

 CGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTAC **TCCAAAGATTTCAGGTTT**

ACTCACGT CATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTCCTGAATTGCTATGTGTCTGGG

>NM_001101.5:85-1212 Homo sapiens actin beta (ACTB), mRNA
150 bp

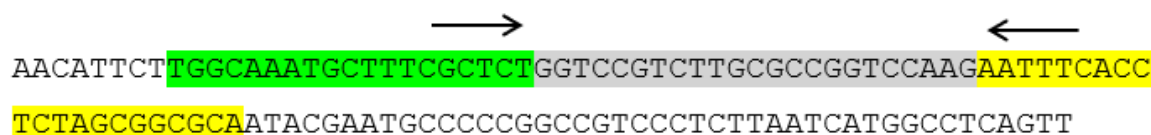


 CCATGTACCCTGGC **ATTGCCGACAGGATGCAGAA** GGAGATCACTGCCCTGGCACCCAGC

 ACAATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCGG

 CTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACC **TTCCAGCAGATGTGGATCAGC** AAGCAGGAGTATG

>XM_047442803.1:1-786 PREDICTED: Homo sapiens translation initiation
factor IF-2-like (LOC124905331), mRNA
63 bp



 AACATTCT **TGGCAAATGCTTTCGCTCT** GGTCCGTCTTGCGCCGGTCCAAG **AATTTACCC**

TCTAGCGGCGCA ATACGAATGCCCCGGCCGTCCCTCTTAATCATGGCCTCAGTT

Legenda: sequência dos produtos de amplificação para os alvos endógenos β -2-microglobulina, β -actina e 18S a partir das análises *in silico* utilizando o software Primer BLAST (NCBI).

>NM_032989.3:44-550 Homo sapiens BCL2 associated agonist of cell death (BAD), transcript variant 2, mRNA
123 bp

→
GACGAGTTTGTGGACTCCTTTAAGAAGGGACTTCCTCGCCCGAAGAGCGCGGGCACAGC
←
AACGCAGATGCGGCAAAGCTCCAGCTGGACGCGAGTCTTCCAGTCTGGTGGGATCGGA
ACTTGGGCAGGGGAAGCTCCGCCCCCTCCCAGTGA

>NM_021127.3 Homo sapiens phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1), transcript variant 6, mRNA
89 bp

→
GCAGAGCTGGAAGTCGAGTGTGCTACTCAACTCAGGAGATTTGGAGACAAACTGAACTT
←
CCGGCAGAAACTTCTGAATCTGATATCCAAACTCTTCTGCTCAGGAACCTGACTGCATC
AAAAACTTGCATGAGGGGACTCCTTCAAAGAGTTTTCTCAGGAGGTGCACGTTTCATC

>NM_001127240.3:66-851 Homo sapiens BCL2 binding component 3 (BBC3), transcript variant 1, mRNA
127 bp

→
GCCCGTGACCGCCCCCGCCCCATCAATCCCATTGCATAGGTTTAGAGAGAGCACGTGT
GACCACTGGCATTTCATTGGGGGTGGGAGATTTTGGCTGAAGCCGCCCCAGCCTTAGT
←
CCCCAGGGCCAAGCGCTGGGGGGAAGACGGGGAGTCAGGGAGGGGGGGGAAATCTCGGAA
GAGGGAGGAGTCTGGGAGTGGGGAGGGATGGCC

Legenda: sequência dos produtos de amplificação para os alvos sensibilizadores BAD, NOXA e PUMA a partir das análises *in silico* utilizando o software Primer BLAST (NCBI).

>NM_138578.3 Homo sapiens BCL2 like 1 (BCL2L1), transcript variant 1, mRNA
110 bp

GTTTTGGACAATGGACTGGTTGAGCCCATCCCTATTATAAAAATGTCTCAGAGCAACCG
 GGAGCTGGTGGTTGACTTTCTCTCCTACAAGCTTTCCCAGAAAGGATACAGCTGGAGTC
 AGTTTAGTGATGTGGAAGAGAACAGGACTGAGGCCCCAGAAGGGACTGAATCGGAGATG

→
←

>NM_182763.3 Homo sapiens MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member (MCL1), transcript variant 2, mRNA
75 bp

GCCACCAGCAGGAAGGCGCTGGAGACCTTACGACGGGTTGGGGATGGCGTGCAGCGCAA
 CCACGAGACGGCCTTCCAAGGATGGGTTTGTGGAGTTCTTCCATGTAGAGGACCTAGAA
 GGTGGCATCAGGAATGTGCTGCTGGCTTTTGCAGGTGTGCTGGAGTAGGAGCTGGTTT

→
←

Legenda: sequência dos produtos de amplificação para os alvos inibidores Bcl-xL e MCL-1 a partir das análises *in silico* utilizando o software Primer BLAST (NCBI).

>XM_047439168.1:86-694 PREDICTED: Homo sapiens BCL2 associated X, apoptosis regulator (BAX), transcript variant X1, mRNA
117 bp

→

CATGTT **TTCTGACGGCAACTTCAACT** GGGGCCGGGTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCCA
 GCAAAGTGGTGCTCAAGGCCCTGTGCACCAAGGTGCCGGAAGTGA **ATCAGAACCATCATG**
GGCTG GACATTGGACTTCCTCCGGGAGCGGCTGTTGGGCTGGATCCAAGACCAGGGTGG

←

>NM_001188.4 Homo sapiens BCL2 antagonist/killer 1 (BAK1), mRNA
168 bp

→

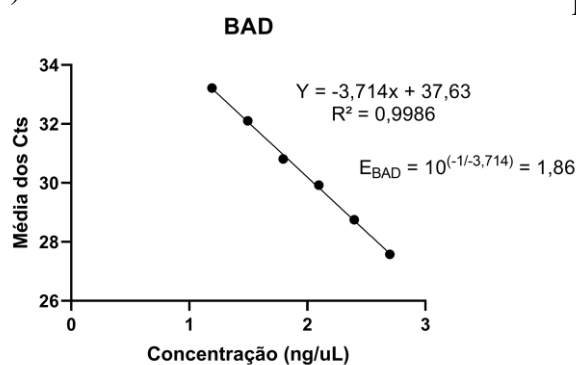
CCGACTTCATGCTGCATCACTGCATTGCCCGGTGGATTGCACAG **AGGGGTGGCTGGGTG**
GCAGCCCTGAACTTGGGCAATGGTCCCATCCTGAACGTGCTGGTGGTTCTGGGTGTGGT
 TCTGTTGGGCCAGTTTGTGGTACGAAGATTCTTCAAATCATGACTCCCAAGGGTGCCCT
 TTGGGGTCCCGGTTCA **AGACCCCTGCCTGGACTTAA** GCGAAGTCTTTGCCTTCTCTGTTC

←

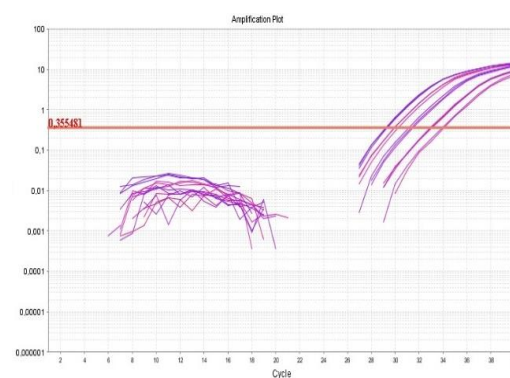
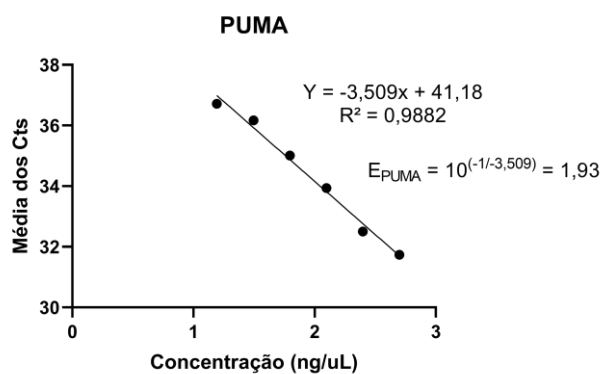
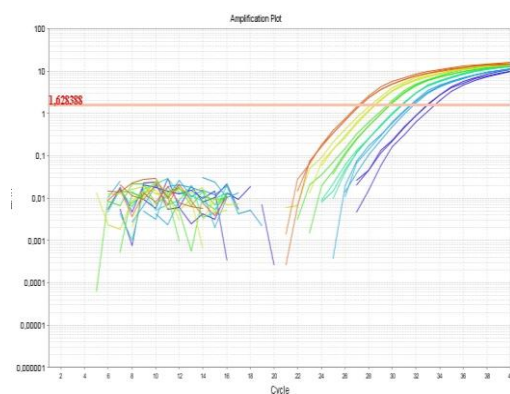
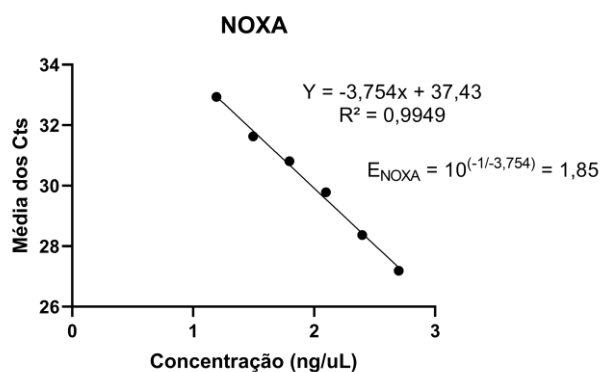
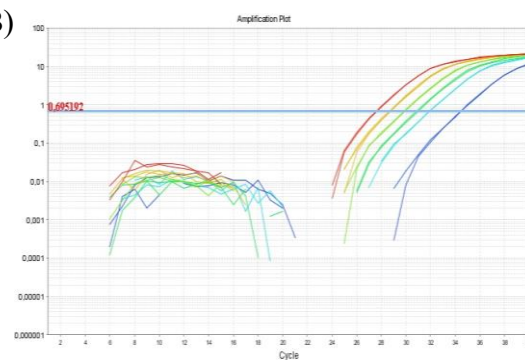
Legenda: sequência dos produtos de amplificação para os alvos efetores BAX e BAK a partir das análises *in silico* utilizando o software Primer BLAST (NCBI).

APÊNDICE A – CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DOS ALVOS APOPTÓTICOS

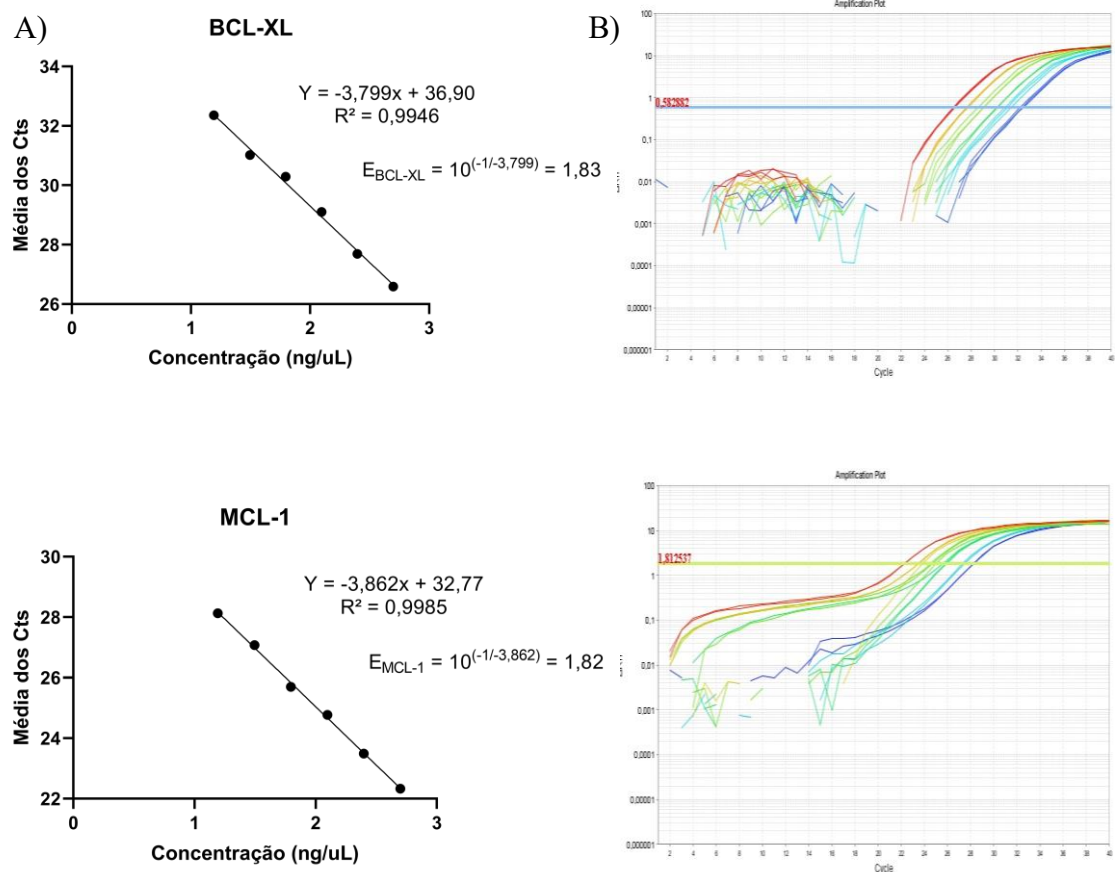
A)



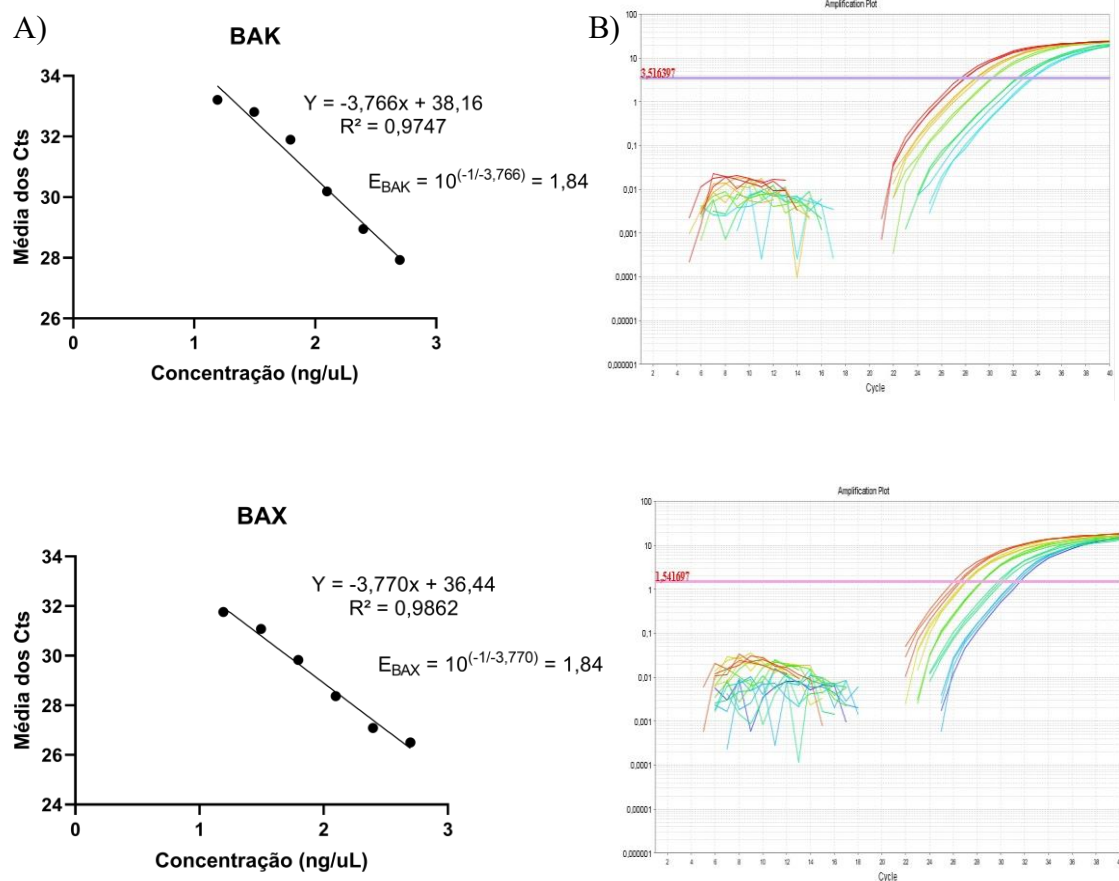
B)



Legenda: gráficos de eficiência dos alvos sensibilizadores pró-apoptóticos (BAD, NOXA e PUMA). Nos gráficos são apresentados a equação da reta, o valor do coeficiente de angulação (*slope*) e o cálculo da eficiência (A). As curvas de amplificação a partir das diluições seriadas para verificação da eficiência de amplificação (B).

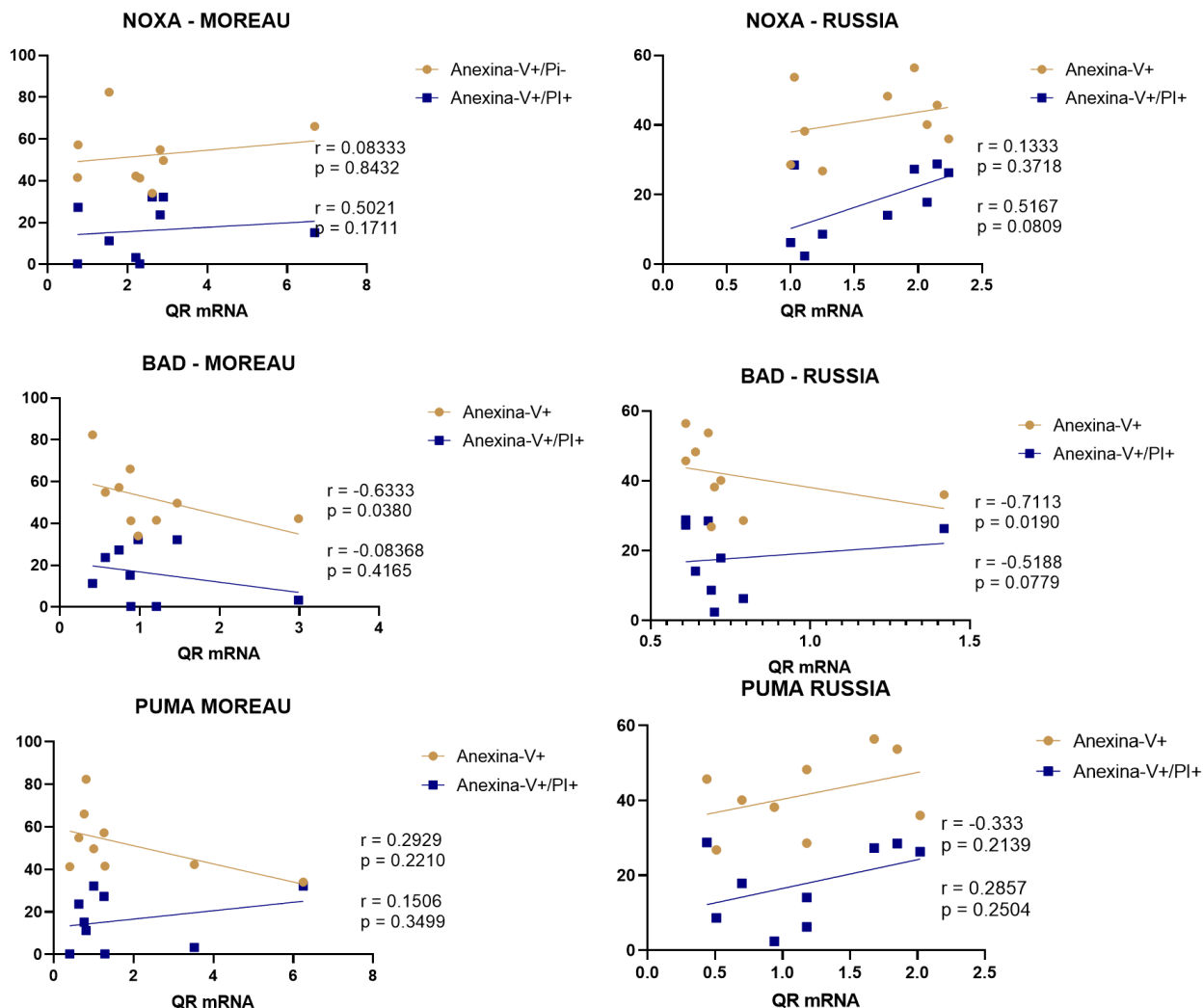


Legenda: gráficos de eficiência dos alvos inibidores (anti-apoptóticos – Bcl-xL e MCL-1). Nos gráficos são apresentados a equação da reta, o valor do coeficiente de angulação (*slope*) e o cálculo da eficiência (A). As curvas de amplificação a partir das diluições seriadas para verificação da eficiência de amplificação (B).

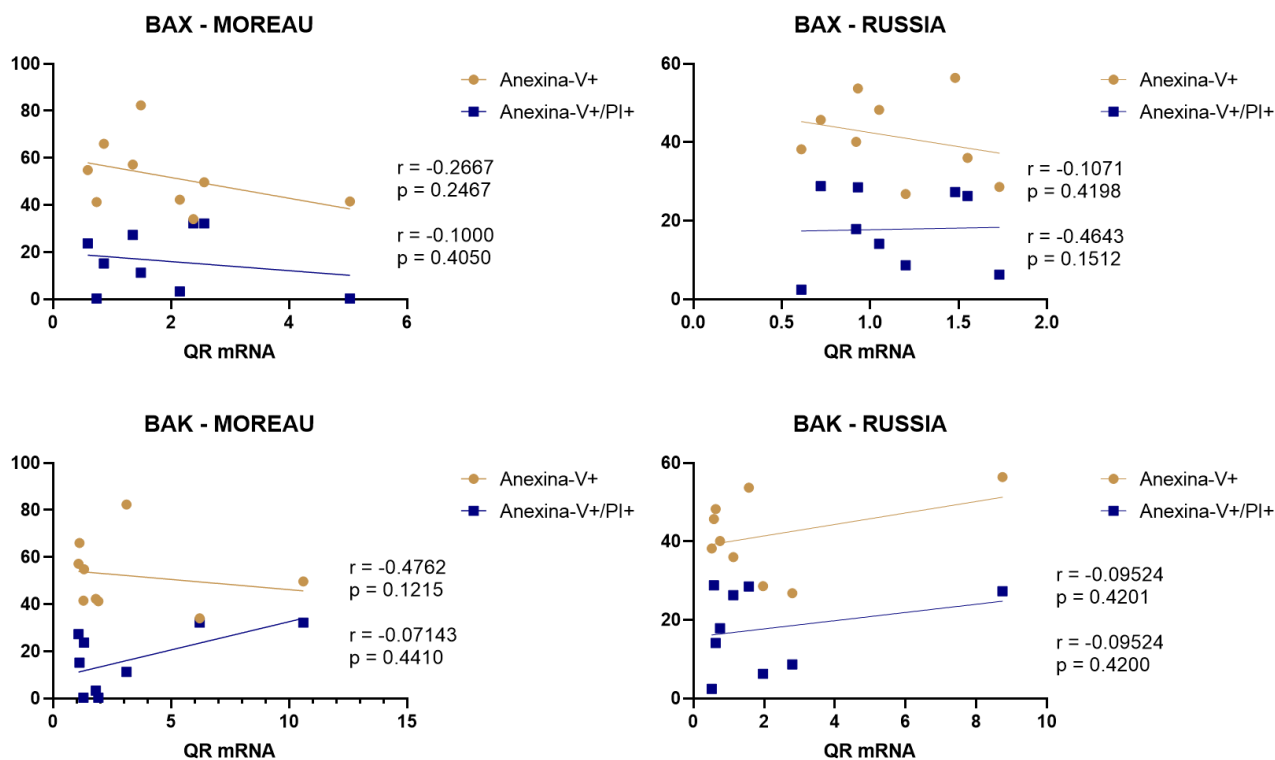


Legenda: gráficos de eficiência dos alvos efetores pró-apoptóticos (BAX e BAK). Nos gráficos são apresentados a equação da reta, o valor do coeficiente de angulação (*slope*) e o cálculo da eficiência (A). As curvas de amplificação a partir das diluições seriadas para verificação da eficiência de amplificação (B).

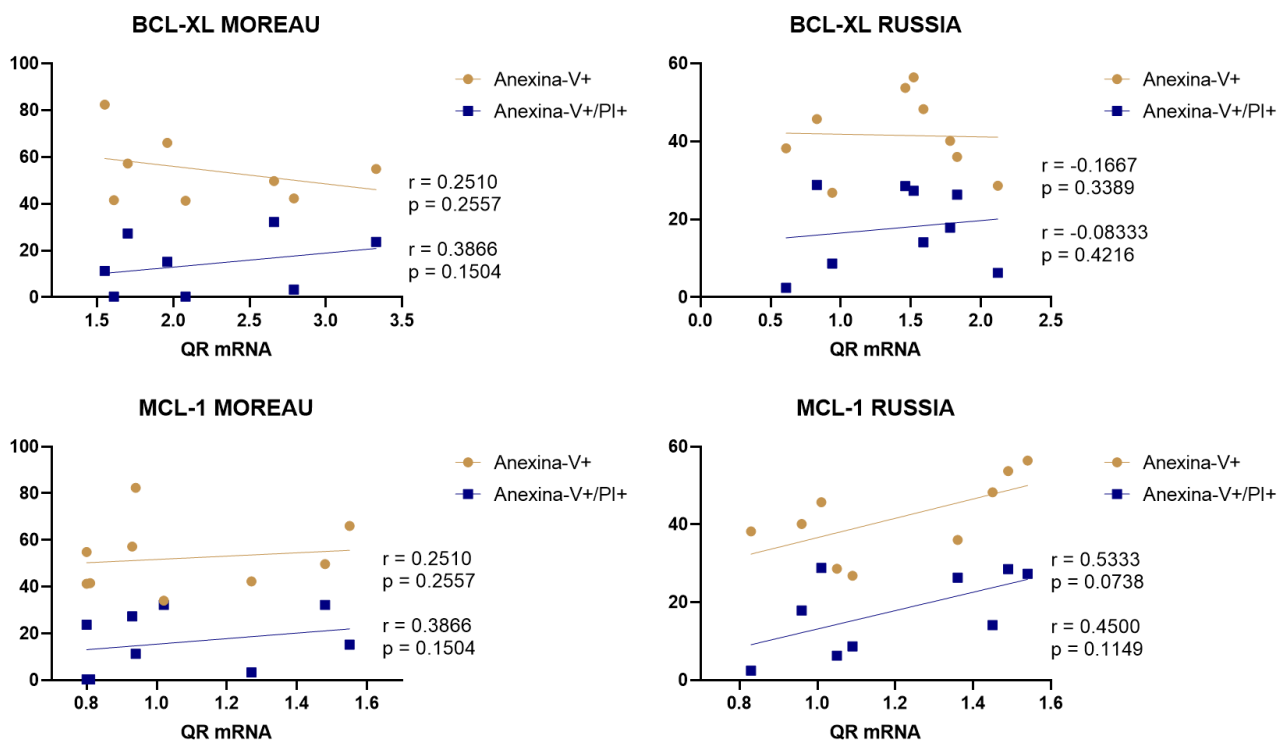
APÊNDICE B – CORRELAÇÃO ENTRE OS ALVOS APOPTÓTICOS E O PERFIL DE MORTE CELULAR



Legenda: gráficos de correlação dos alvos sensibilizadores pró-apoptóticos (BAD, NOXA e PUMA) induzidos em CMSP infectadas com a cepa BCG Moreau e Russia. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Spearman para dados não paramétricos, através do software Graph Pad Prism, v8. Para todos os testes, um intervalo de confiança de 95% foi levado em consideração, com nível de significância menor ou igual a 0,05.



Legenda: gráficos de correlação dos alvos efetores pró-apoptóticos (BAX e BAK1) induzidos em CMSP infectadas com a cepa BCG Moreau e Russia. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Spearman para dados não paramétricos, através do software Graph Pad Prism, v8. Para todos os testes, um intervalo de confiança de 95% foi levado em consideração, com nível de significância menor ou igual a 0,05.



Legenda: gráficos de correlação dos alvos efetores antiapoptóticos (BCL-XL e MCL-1) induzidos em CMSP infectadas com a cepa BCG Moreau e Russia. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Spearman para dados não paramétricos, através do software Graph Pad Prism, v8. Para todos os testes, um intervalo de confiança de 95% foi levado em consideração, com nível de significância menor ou igual a 0,05.

APÊNDICE C – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DOS PRIMERS

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

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

Primer lenght= 23bp

Cálculo

nmoles per OD → 4.1

OD's → 10.80

nmoles → 44.5 (não confiável)

Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4.1 \times 10.8 = 44,28 \text{ nmoles}$ (confiável).

Depois multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

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

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

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

Primer lenght= 22 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4.7

OD's → 11.10

nmoles → 51.6 (não confiável)

Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4.7 \times 11.10 = 52,17 \text{ nmoles}$ (confiável)

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

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

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer BID fwd: 5'- CCT ACC CTA GAG ACA TGG AGA A –3'

Primer lenght= 22 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4.5

OD's → 10.80

nmoles → 48.5 (não confiável)

Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4.5 \times 10.80 = 48,60 \text{ nmoles}$ (confiável)

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

48600 → x, x = 97,20 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer BID rev: 5'- GGT GCG TAG GTT CTG GTT AAT A -3'

Primer lenght= 22 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4.6

OD's → 10.60

nmoles → 48.7 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4.6 \times 10.60 = 48.76$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

48760 → x, x = 97,52 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer BAX fwd: 5'- TTC TGA CGG CAA CTT CAA CT -3'

Primer lenght= 20 bp

Cálculo

nmoles per OD → 5.5

OD's → 10.20

nmoles → 55.7 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $5.5 \times 10.20 = 56.1$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

56100 → x, x = 112,20 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer BAX rev: 5'- CAG CCC ATG ATG GTT CTG AT -3'

Primer lenght= 20 bp

Cálculo

nmoles per OD → 5.3

OD's → 9.80

nmoles → 52.2 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $5.3 \times 9.80 = 51.94$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

51940 → x, x = 103,88 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer BAD fwd: 5'- GAC GAG TTT GTG GAC TCC TTT A -3'

Primer lenght= 22 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4.8

OD's → 9.90

nmoles → 47.2 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4.8 \times 9.90 = 47.52$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

47520 → x, x = 95,04 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer BAD rev: 5'- CAA GTT CCG ATC CCA CCA G -3'

Primer lenght= 19 bp

Cálculo

nmoles per OD → 5.6

OD's → 10.80

nmoles → 60.7 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $5.6 \times 10.80 = 60.48$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

60480 → x, x = 120,96 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer Bcl-xL fwd: 5'- GGT GGT TGA CTT TCT CTC CTA C -3'

Primer lenght= 22 bp

Cálculo

nmoles per OD → 5.1

OD's → 9.10

nmoles → 46.8 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $5.1 \times 9.10 = 46.41$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

46410 → x, x = 92,82 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer Bcl-xL rev: 5'- TCT CCG ATT CAG TCC CTT CT -3'

Primer lenght= 20 bp

Cálculo

nmoles per OD → 5.9

OD's → 9.00

nmoles → 52.7 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $5.9 \times 9.00 = 53.1$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

53100 → x, x = 106,20 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer NOXA fwd: 5'- GTG CTA CTC AAC TCA GGA GAT TT -3'

Primer lenght= 23 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4.5

OD's → 10.50

nmoles → 47.5 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4.5 \times 10.50 = 47.25$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

47250 → x, x = 94,50 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (24-JULHO-2022)

Primer NOXA rev: 5'- AAA CTC TTC TGC TCA GGA ACC -3'

Primer lenght= 21 bp

Cálculo

nmoles per OD → 5.1

OD's → 8.30

nmoles → 42.4 (não confiável)

*Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $5.1 \times 8.30 = 42.33$ **nmoles** (confiável)*

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

42330 → x, x = 84,66 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (14-NOVEMBRO-2022)

Primer 18S fwd: 5'- TGG CAA ATG CTT TCG CTT T – 3'

Primer lenght= 19 bp

Cálculo

nmoles per OD → 5,90

OD's → 9,30

nmoles → 55,1 (não confiável)

Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $5,90 \times 9,30 = 54,87 \text{ nmoles}$ (confiável).

Depois multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

54870 → x, x = 109,74 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (14-NOVEMBRO-2022)

Primer 18S rev: 5'- TGT GCC GCT AGA GGT GAA ATT – 3'

Primer lenght= 21 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4,90

OD's → 9,10

nmoles → 44,3 (não confiável)

Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4,9 \times 9,10 = 44,59 \text{ nmoles}$ (confiável).

Depois multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

44590 → x, x = 89,18 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (14-NOVEMBRO-2022)

Primer ACTB fwd: 5'- ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA – 3'

Primer lenght= 20 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4,90

OD's → 8,50

nmoles → 41,6 (não confiável)

Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4,9 \times 8,5 = 41,65 \text{ nmoles}$ (confiável).

Depois multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)500 pmoles $\rightarrow$ 1 μ l41650 $\rightarrow$ x, x = 83,3 μ l de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (14-NOVEMBRO-2022)

Primer ACTB rev: 5'- GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA - 3'

Primer lenght= 21 bp

Cálculo*nmoles per OD* $\rightarrow$ 5,10*OD's* $\rightarrow$ 4,90*nmoles* $\rightarrow$ 24,8 (não confiável)*Fórmula: nmoles/OD $\times$ OD = nmoles*, $5,1 \times 4,9 = 24,99$ *nmoles* (confiável).

Depois multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)500 pmoles $\rightarrow$ 1 μ l24990 $\rightarrow$ x, x = 49,98 μ l de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (14-NOVEMBRO-2022)

Primer B2M fwr: 5'- GCT CCG TGG CCT TAG CTG T - 3'

Primer lenght= 19 bp

Cálculo*nmoles per OD* $\rightarrow$ 6,00*OD's* $\rightarrow$ 10,40*nmoles* $\rightarrow$ 62,7 (não confiável)*Fórmula: nmoles/OD $\times$ OD = nmoles*, $6,0 \times 10,40 = 62,40$ *nmoles* (confiável).

Depois multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)500 pmoles $\rightarrow$ 1 μ l62400 $\rightarrow$ x, x = 124,8 μ l de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

Fabricante dos Primers: INVITROGEN (14-NOVEMBRO-2022)

Primer B2M rev: 5'- ACG TGA GTA AAC CTG AAT CTT TGG A - 3'

Primer lenght= 25 bp

Cálculo

nmoles per OD → 4,00
OD's → 12,20
nmoles → 48,7 (não confiável)

Fórmula: $nmoles/OD \times OD = nmoles$, $4,0 \times 12,20 = 48,8 \text{ nmoles}$ (confiável).
 Depois multiplica x1000 e entra na regra de três

Concentração do estoque (final)

500 pmoles → 1 µl

48800 → x, x = 97,6 µl de TE 1x a ser adicionado ao liofilizado

CÁLCULO DA DILUIÇÃO DOS PRIMERS PARA SOLUÇÃO DE TRABALHO

Cálculo para 250 pmol

$$C_1V_1 \times C_2V_2$$

$$500 \text{ pmol} \times V_1 = 250 \text{ pmol} \times 100 \text{ µl}$$

$$V_1 = 25 \text{ µl}$$

25 µl de solução em 25 µl de água

Cálculo para 25 pmol a partir de 50 pmol

$$C_1V_1 \times C_2V_2$$

$$50 \text{ pmol} \times V_1 = 25 \text{ pmol} \times 100 \text{ µl}$$

$$V_1 = 10 \text{ µl}$$

10 µl de solução em 90 µl de água

Adicionar a solução concentrada à água a fim de facilitar a homogeneização.

RECOMENDAÇÕES DE TRABALHO

Concentração de *trabalho* a ser usada no PCR é de 25pmol

O liofilizado deverá ser centrifugado (max speed 30seg) e depois adicionar o volume de TE 1X calculado. Ao final realizar vortex rapidamente.

Fazer a **diluição de trabalho** somente após 24 horas de mantido à 4°C. Fazer spin rápido antes de colocar á agua.

$$C_1V_1 = C_2V_2, 500\text{pmol} \times V_1 = 25\text{pmol} \times 100\mu\text{l}, V_1 = 5\mu\text{l do estoque concentrado.}$$

Adicionar 95µl de água + 5µl do primer concentrado = 100µl volume final

Identificar bem os oligos, de estoque e de trabalho, tampa e lateral!!! Armazenar de estoque e trabalho a -20oC.

Obs.: Tampão TE em alta concentração pode funcionar como inibidor para a PCR.

Dessa forma, indicamos que você utilize água deionizada para preparar a solução de uso dos seus primers.

METODOLOGIA PARA DILUIÇÃO DE PRIMER

Primer liofilizado: Com base no número de moles específico para cada primer (quantidade), deve-se calcular o volume de água deionizada ou tampão TE que deve ser adicionado.

$$V = \frac{\eta\text{mol} \times 1000}{C_f}$$

C_f

V= Volume (em µL) que deverá ser adicionado no tubo de primer liofilizado

ηmol = quantidade de primer na escala em ηmol (muitas vezes a quantidade de primer vem especificada como pmol, que equivale a 10⁻³ ηmol).

C_f= Concentração final desejada.

Exemplo: Primer W: n° de moles = 38,4 ηmoles e concentração final de 200 µM.

$$V = \frac{38,4 \times 1000}{200}$$

200

V= 192 µL de água deionizada

Obs.: µM é igual a pmol/µL, por isso é necessário multiplicar a quantidade em ηmoles por 1000 (1 ηmol = 1000 pmoles).

Como fazer uma solução de trabalho

Utilize a fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C₁ - concentração da solução estoque

V₁ - volume a ser pipetado da solução estoque

C₂ - concentração desejada da solução de trabalho

V₂ - volume desejado da solução de trabalho

Exemplo: Para preparar 100 µL de solução de trabalho, a 20 µM, a partir de uma solução estoque de 200 µM, faça:

$$V1 = \frac{20\mu\text{M} \times 100\mu\text{L}}{200\mu\text{M}}$$

$$V1 = 10 \mu\text{L}$$

Portanto, você deve diluir 10 µL da sua solução estoque em 90 µL de água deionizada.

Obs.: Tampão TE em alta concentração pode funcionar como inibidor para a PCR.

Dessa forma, indicamos que você utilize água deionizada para preparar a solução uso dos seus primers.

APÊNDICE D – PROTOCOLO DE PADRONIZAÇÃO DE RT-PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE CMSP

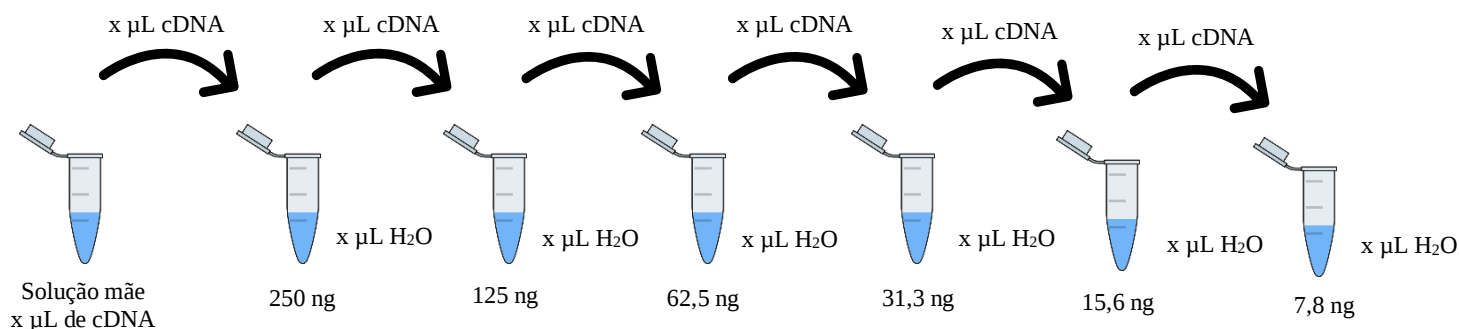
Objetivo: determinar as concentrações de cDNA ideais para a reação de PCR em tempo real em uma faixa não limitante.

1. SÍNTESE E DILUIÇÃO DO CDNA

- 1 µg de RNA total como template de THP-1 + Brefeldina
- Kit utilizado: SuperScript™ VILO IV – Invitrogen

1.1 A síntese de cDNA deve partir de amostras de RNA na quantidade de 1 µg/µL. Devem ser realizadas **duas reações** para obtenção final de 40 µL de cDNA (volume necessário para todas as reações de padronização). Seguir protocolo de síntese de cDNA*.

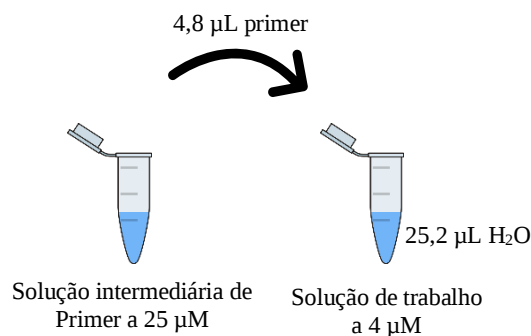
1.2 Cada amostra de cDNA recém sintetizada (solução mãe) deve ser quantificada e diluída para a concentração de 250 ng. Posteriormente, deve seguir com diluições seriadas para a obtenção de amostras nas concentrações de 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng, 15,63 ng e 7,8 ng, como segue:



1.3 Armazenar cDNA a -20 °C com as concentrações devidamente identificadas.

2. DILUIÇÃO DOS PRIMERS

2.1 Os primers em estoque a serem usados estão na concentração de 25 µM (pmoles/µL) e devem ser diluídos para a concentração de 4 µM, como segue:



2.2 Os primers devem ser estocados com suas concentrações devidamente identificadas.

3. REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS

3.1 Descongele lentamente a GoTaq® MasterMix e a água livre de RNase.

3.2 Misture o MasterMix por 3-5 segundos cuidadosamente para evitar aeração.

3.3 Determine o número de reações, incluindo os controles positivo e negativo. Adicione 1 ou 2 reações a mais para compensar o erro de pipetagem. Garanta que terá disponibilidade para o número total de reagentes necessários para as próximas reações.

Prepare o mix de reação como segue (Obs.: o cDNA deve ser adicionado na placa de PCR):

- Homogeneíze o Mix contendo o SYBR protegendo da luz direta.

Os primers devem ser testados na concentração de 400 nM

Os mixes devem ser preparados de acordo com a quantidade de poços analisados.

Para cada mix, seguir recomendações abaixo (volumes para 1 poço).

Componente	Volume (µL) p/1 reação
GoTaq® qPCR MasterMix (2X)	5
Forward Primer (20X)	1 (400 nM)
Reverse Primer (20X)	1 (400 nM)
Template de cDNA	2
Água livre de Nuclease	1
Volume Final	10

Para a reação, utilizar 10 µL do Mix em triplicata.

3.4 Cuidadosamente, pipetar os mixes em cada poço de reação na placa de PCR.

3.5 Adicione o cDNA (ou água, no caso do controle negativo) em seus respectivos poços contendo o mix de reação (seguir o desenho da página seguinte).

3.6 Sele a placa e centrifugue-a brevemente. Após a centrifugação, a placa está pronta para ser analisada no termociclador.

Obs.: Proteja os reagentes de qualquer fonte de luz direta ou elevadas temperaturas.

3.7 Condições de ciclagem da PCR em tempo real

Passo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação da GoTaq® Hot Start Polymerase	1	95 °C	2 minutos
Desnaturação	40	95 °C	15 segundos
Anelamento e Extensão		60 °C	1 minuto

**Incluir curva de Melting*

4. Teste de modulação do estímulo sobre o controle endógeno

Este teste objetiva analisar se a presença do estímulo no controle positivo (brefeldina e/ou brefeldina) afeta significativamente a expressão dos genes endógenos.

- As amostras de cDNA recém-sintetizadas de controle positivo estimulado e controle não estimulado devem ser quantificadas e diluídas, a fim de obter uma concentração de 250 ng.
- Cada alvo endógeno deve ser testado em triplicata, utilizando 2 µL de cDNA diluído em cada poço, a fim de obter uma quantidade de 500 ng para cada reação.
- Ambas as amostras devem estar na mesma quantidade para entrar em reação.
- As condições de ciclagem seguem como estabelecido para as análises de padronização dos primers.
- Deve ser preparado o mesmo mix para as amostras de controle estimulado e não estimulado e todas as replicatas de cada um dos controles deve entrar em reação obrigatoriamente na mesma placa.