

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Thaize Quiroga Chometon Pedro

**GERAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS E SUA RELAÇÃO
COM A VACINA BCG MOREAU**

Rio de Janeiro

2016

Thaize Quiroga Chometon Pedro

**GERAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS E SUA RELAÇÃO
COM A VACINA BCG MOREAU**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira e Paulo Renato Zuquim Antas.

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Pedro, Thaize Quiroga Chometon

Geração in vitro de células dendríticas humanas e sua relação com a vacina BCG Moreau / Thaize Quiroga Chometon Pedro. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016.

110 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadores: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira; Paulo Renato Zuquim Antas

1. Vacina BCG. 2. Potência de Vacina. 3. Técnicas In Vitro. 4. Células Dendríticas. 5. Controle de Qualidade. I. Título

In vitro generation of human dendritic cells and this relationship to the
Moreau BCG vaccine

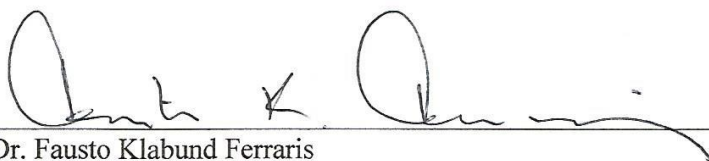
Thaize Quiroga Chometon Pedro

**GERAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS E SUA RELAÇÃO
COM A VACINA BCG MOREAU**

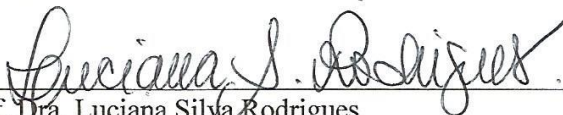
Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: 30/06/2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fausto Klabund Ferraris
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues
Universidade Estadual do Rio de Janeiro



Prof. Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp
Instituto Oswaldo Cruz



Prof. Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira - Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz



Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas - Orientador
Instituto Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pela força e coragem durante toda esta caminhada.

Aos meus pais Marcos e Marinez, a minha irmã Beatriz e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus orientadores, Dra. Ana Cristina Nogueira e Dr. Paulo Antas, pela paciência na orientação, incentivo e aprendizado que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

A Dra. Rosa Pinho, chefe do laboratório de Imunologia Clínica, pela ajuda quando precisei. Muito obrigada por todo apoio e carinho durante todos os anos que estive no laboratório.

Aos amigos que fiz no laboratório Imunologia Clínica, mesmo aos que não estão mais no laboratório, Jéssica, Victor, Alana, Vitor, Julie e Letícia um agradecimento especial, por além de não medirem esforços para ajudar, me dar força todas as vezes que ela me faltou, sempre com palavras de incentivo e carinho. Muito obrigada por tudo, esses dois anos não teriam sido os mesmos sem vocês. Tenho certeza que levarei comigo a amizade que construímos.

Aos colegas também do Laboratório de Imunologia Clínica, Wellington, Eduardo, Periel, Nathalia, Juliana e Carlos que conviveram comigo e me ajudaram de alguma forma ao longo desses dois anos, seja experimentalmente ou emocionalmente. Muito obrigada pelas inúmeras horas de trabalho, risos e brincadeiras.

Ao meu namorado, Raphael, ouvinte atento de algumas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, por sempre estar comigo nos bons momentos ou naqueles que o cansaço ou o desânimo apareciam. Obrigada por ser meu companheiro, por compreender muitas vezes a minha ausência e por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos Renata, Verônica, Talitta, Allan e Gabriela por todo apoio e cumplicidade. Obrigada pela paciência, pelos sorrisos, pelos abraços, pelas mãos que sempre se estendiam quando eu precisava.

A amiga da pós-graduação do Albert Einstein, Fátima, que apesar de pouco tempo de convívio sempre me ajudou e incentivou a crescer.

Ao dr. Álvaro e a Clarrisa por todo apoio e compreensão nessa reta final do mestrado.

Aos integrantes da banca, pela gentileza de aceitarem o convite.

A Mestra Maria Ester Tonus e equipe, especialmente Eliana e Antonio, do setor de vacina do INCQS pela colaboração para a realização da técnica de contagem de UFC.

A Dra. Roberta Olmo Pinheiro e equipe do Laboratório de Hanseníase do IOC por ter gentilmente emprestado reagentes para o isolamento de monócitos.

Ao Laboratório de Imunologia Viral do IOC, especialmente a Dra. Elzinandes Azeredo, e aos alunos Mariana Gandini e Marcio Cipitelli, por gentilmente cederem o espaço do laboratório e o magneto para as microesferas magnéticas.

Ao Serviço de Hemoterapia/HUCFF/UFRJ, o fornecimento dos produtos do sangue (buffy-coats) neste estudo.

A plataforma de citometria de fluxo - núcleos *cell sorting* e análise multiparamétrica do IOC pela utilização do citometro MoFlo Astrios e anticorpos multiusuários, respectivamente.

A plataforma de citometria PDTIS/FIOCRUZ pela utilização do citometro FACS Aria.

Ao Laboratório de Pesquisa sobre o Timo do IOC por gentilmente permitir a utilização do citometro FACS Canto.

Ao Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos do IOC por gentilmente permitir a utilização do leitor de ELISA.

A todos os professores e funcionários do curso, que foram importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação ou que me ajudaram de alguma forma ao longo do mestrado.

Ao Laboratório de Imunologia Clínica do IOC por me acolher durante esses dois anos.

Ao INCQS, em especial ao curso de pós-graduação, que ofereceram a oportunidade de concretizar o sonho de me tornar mestre.

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para a pessoa que sou hoje.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

A Tuberculose é considerada uma das principais causas de morte em todo o mundo. A BCG corresponde a única vacina aprovada, apresentando boa relação custo-eficácia para prevenção das formas disseminadas da TB em crianças. Contudo, a proteção fornecida pela mesma é considerada limitada na prevenção de TB pulmonar em adultos. Com relação ao controle de qualidade da produção da BCG, existe uma carência de ensaios laboratoriais. Hoje o ensaio de UFC é utilizado como método de quantificação para as vacinas vivas e como um substituto dos ensaios de potência. Este trabalho propõe um ensaio *in vitro* utilizando células dendríticas, considerando a primeira linha da resposta imunológica, para avaliação da potência da vacina. Com esse propósito, utilizou-se moDCs diferenciadas *in vitro* de monócitos isolados de PBMCs. Para o isolamento de monócitos e a diferenciação de moDCs foram testadas diferentes técnicas e meios de cultivo, respectivamente. Por fim, a técnica de isolamento por microesferas magnéticas de seleção negativa e positiva e o cultivo e diferenciação das células em placa com RPMI e SH e a concentração de 500 UI/ml de cada GM-CSF e IL-4. As moDCs imaturas foram infectadas com 3 lotes distintos de BCG (lote A- $6,86 \times 10^6$ UFC/ml, lote B- $2,48 \times 10^6$ UFC/ml e lote C- $9,82 \times 10^6$ UFC/ml) em quatro diluições (1:10, 1:20, 1:40 e 1:60) por 24 horas. Como controle utilizou-se DCs não estimuladas (controle negativo), DCs estimuladas com LPS (controle positivo) e BCG contendo bacilos não viáveis (BCG irradiada e irradiada + aquecida). Após as 24 horas foram avaliados os marcadores de superfície CD14, CD1a, CD209, TLR2 e 4, CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR e CCR7 por citometria de fluxo. E a partir do sobrenadante das culturas foram dosadas as citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-18, TNF- α , IL-1 α e a citocina anti-inflamatória IL-10 por ELISA e feito a contagem de UFC para observação dos bacilos não internalizados pelas moDCs. Como resultado, observou-se uma diminuição na expressão de CD14, um aumento de CD209 enquanto a expressão de CD1a não sofreu alterações quando os monócitos eram diferenciados em moDCs. Já como relação os marcadores CD80, CD86 e HLA-DR, esses apresentaram um aumento de expressão nas células infectadas por BCG na comparação com DCs imaturas, enquanto CD40 apresentou resultados semelhante ou uma diminuição da expressão quando as moDCs foram infectadas por BCG. Não foi observada uma proporcionalidade entre o número de UFC e a expressão da maioria desses marcadores. Com relação as citocinas, apenas TNF- α apresentou um aumento em seu nível quando as moDCs foram infectadas com BCG, sendo esse aumento proporcional ao número de UFC e a diluição utilizada. Por fim, com relação a contagem de UFC, mostrou uma menor contagem de bacilos no sobrenadante de moDCs provenientes de seleção positiva. E nesse mesmo grupo, não houve proporcionalidade entre o número de UFC inicial da BCG e o presente no sobrenadante enquanto nas moDCs provenientes de seleção negativa essa proporção se manteve. Como conclusão a BCG foi capaz de induzir maturação das moDCs *in vitro*. TNF- α e CD80, mostraram-se como candidatos mais promissores para um futuro ensaio de potência. Entretanto, mais estudos são necessários.

Palavras-chave: BCG. moDCs. Ensaio de potência.

ABSTRACT

Tuberculosis remains the world's leading cause of mortality. BCG is the only vaccine against TB approved throughout the world, presenting good cost-effective for the prevention of disseminated forms of tuberculosis in children. However, the protection provided by BCG is considered limited when it comes to prevent the pulmonary form in adults. Regarding the quality control of BCG production there is deficiency of assays that indicate directly the protective efficacy of the vaccine. Today, the CFU assay is used to estimate the number of viable bacteria and has been used as a substitute for a potency test. This study proposes an *in vitro* assay using dendritic cells, as the first line of immune response, to evaluate the potency of BCG vaccine. For this, we used *in vitro* differentiated moDCs from isolated PBMC's monocytes. For monocytes isolation and moDCs differentiation were tested difents techniques and culture media, respectively. As result, the isolation technique of magnetic microspheres selection and cells culture in plate with RPMI cells, SH and concentration the 500 UI /ml each of GM-CSF and IL-4. Immature moDCs were infected as 3 different BCG lots (lot A- 6.86×10^6 CFU/ml, lot B- 2.48×10^6 CFU/ml and lot C 9.82×10^6 CFU/ml) in four dilutions (1:10, 1:20, 1:40 and 1:60) for 24 hours. For control DCs unstimulated (negative control), DCs stimulated with LPS (positive control) and BCG containing non-viable bacilli (irradiated BCG and irradiated + heated BCG) was used. After 24 hours, the surface markers CD14, CD1a, CD209, TLR2 and 4, CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR, CCR7 were evaluated by flow cytometry. We measured the pro-inflammatory cytokines IL-12, IL-18, TNF- α , IL-1 α and anti-inflammatory cytokine IL-10 by ELISA. We performed CFU assay for observation of bacilli that was not internalized by moDCs. As a result, there was a decrease in CD14 expression, an increase of CD209, while CD1a expression did not change when the monocytes diferentiated in moDCs. Moreover, the molecules CD80, CD86 and HLA-DR showed an increased of this expression in cells infected with BCG compared to immature DCs, whereas CD40 showed similar results or even a decreased expression in moDCs infected with BCG when compared to immature moDCs. Despite of these changes, there was no observed proportionality between the CFU number and the expression of most of these markers. Regarding cytokines, only TNF- α showed an increase in their level when moDCs were infected with BCG, as well as showed a proportional increase in the number of CFU and the dilution used. Finally, the CFU assay showed lower bacilli counts in supernatant from moDCs positive selection in comparison with negative selection. In addition, in same group, the number of bacilli present in the supernatant did not show proportionality with the initial CFU number of BCG. While the count in supernatant of moDCs derived from negative selection showed this proportionality. In conclusion, BCG was able to induce maturation moDCs *in vitro*. TNF- α and CD80 shown to be the most promising candidates for a future potency assay. Further studies, however, need to be performed.

Keywords: BCG. moDCs. Potency assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotografia de microscopia eletrônica de varredura representando algumas bactérias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
Figura 2: Estimativa da incidência de Tuberculose no mundo no ano de 2014	18
Figura 3: Coeficiente de incidência de tuberculose. Brasil, 2005-2014	19
Figura 4: Coeficiente de mortalidade por tuberculose. Brasil, 2004 - 2013	20
Figura 5: Maturação do granuloma nas lesões de tuberculose pulmonar.	21
Figura 6: Genealogia da vacina BCG	27
Figura 7: Principais subtipos de DCs humanas e suas equivalentes em murinos.....	32
Figura 8: Esquema da maturação de uma Célula Dendrítica.	35
Figura 9: Esquema de placa de cultivo ilustrando as variáveis utilizadas nos experimentos. .	48
Figura 10: Perfil típico de um experimento representativo de morfologia de PBMCs	51
Figura 11: Dotplot das células pós sorting positivo.....	54
Figura 12: Perfis morfológicos típicos de experimento representativo de purificação de monócitos por microesferas magnéticas	54
Figura 13: Perfis morfológicos típicos de experimento representativo com monócitos não diferenciados e moDCS.....	56
Figura 14: Dotplots de CD14 x CD209 de um experimento representativo de monócitos não diferenciados e moDCs – Comparação de meio de cultivo	57
Figura 15: Dotplots de CD14 x CD209 de um experimento representativo de monócitos não diferenciados e moDCs – Comparação tubo e placa	58
Figura 16: Dotplots de CD14 x CD209 em células não diferenciadas e diferenciadas com 300UI/ml e 500 UI/ml de GM-CSF e IL-4	59
Figura 17: Intensidade mediana de fluorescência (MFI) de CD 80, CD 86, CD 40 e HLA-DR	62
Figura 18: MFI de CD80.....	64
Figura 19: MFI de CD86.....	64
Figura 20: MFI de CD40.....	67
Figura 21: MFI de HLA-DR.....	68
Figura 22: MFI de HLA-DR.....	69
Figura 23: Overlay dos histogramas de CD86, CD80, HLA-DR e CD40	70
Figura 24: Média e desvio padrão de TNF-alfa e IL-18 em sobrenadante de cultura de células (moDCs ou macrófagos)	71
Figura 25: Dosagem de TNF- α no sobrenadante de cultura de moDCs	72

Figura 26: Média e desvio padrão de IL-18 em sobrenadante de cultura de moDCs.....	73
Figura 27: Comparação intra-lote (Lote A).....	74
Figura 28: Comparação nos níveis de TNF- α e IL-12 de moDCs diferenciadas a partir de monócitos isolados por microesferas magnéticas de seleção negativa e positiva	77
Figura 29: Comparação entre moDCs diferenciadas a partir de monócitos isolados por microesferas magnéticas de seleção negativa e positiva do MFI de CD80, CD86 e CD40.....	78
Figura 30: Esquema dos resultados obtidos	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedimento para preparo das diluições do ensaio de contagem de UFC	30
Tabela 2: Marcadores fenotípicos e suas respectivas funções.....	49
Tabela 3: Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) do percentual de marcação de CD14 e CD3 na avaliação do isolamento de monócitos por agregação ao frio e gradiente de Percoll (n=6) ...	52
Tabela 4: Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD14 e CD3 na avaliação do isolamento de monócitos por duas etapas de agregação ao frio (n=3)	53
Tabela 5: Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD 209 e CD14 na avaliação da utilização de placa ou tubo para a diferenciação em moDCs (n=2).....	58
Tabela 6: Expressão de CD209 e CD14 na avaliação da concentração de citocinas utilizadas para a diferenciação das células (n=3)	60
Tabela 7: Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD1a, CD209 e CD14 (n=8).....	60
Tabela 8: Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD83, TLR4 e 2, CCR7 (n=8)	61
Tabela 9: Média de desvio padrão da contagem de UFC nos sobrenadantes frescos de cultura de moDCs infectadas com BCG	75
Tabela 10: Média de desvio padrão da contagem de UFC nos sobrenadantes congelados	76
Tabela 11: Resumo dos principais resultados de imunofenotipagem e da detecção de citocinas do sobrenadante (n=8).....	79
Tabela 12: Resumo dos principais resultados de comparação seleção negativa (n=5) em relação a seleção positiva (n=3) de imunofenotipagem, de detecção de citocinas no sobrenadante e contagem de UFC no sobrenadante.	80

LISTA DE SIGLAS

CD	Grupamento de diferenciação
cDCs	Células dendríticas convencionais
CLRs	Receptores do tipo C-lectina
CFP-10	<i>Culture Filtrate Proteine 10 kDa</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
DC	Células dendríticas
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
ESAT-6	<i>Early secreted antigenic target 6 kDa</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção
FAP	Fundação Atauípho de Paiva
FcR	Receptores Fc de imunoglobulina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Tamanho (<i>Forward-scattered</i>)
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HLA	Antígeno leucocitário humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LAM	Lipoarabinomanana
LCs	Células de Langerhans
LJ	Lowenstein-Jensen
LPS	Lipopolissacarídeo
M. bovis	<i>Mycobacterium bovis</i>
mDCs	Células Dendríticas de origem mielóide
MFI	Intensidade mediana de Fluorescência
MHC	Complexo de histocompatibilidade
moDC	Células dendríticas derivadas de monócitos
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NCCAM	Centro Nacional para Medicina Complementar e Alternativa

NK	Células assassinas naturais
NLRs	Receptores do tipo NOD
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
pDCs	Células Dendriticas de origem mielóide plasmocitóide
PE	Ficoeritrina
PNI	Programa nacional de imunização
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
RD	Region of difference
RNI	Espécies reativas de nitrogênio
ROI	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SH	Soro humano AB
SH-	Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da
HUCFF	Universidade Federal do Rio de Janeiro
SRS	Rceptores depuradores
SS	Granulosidade (<i>Side-scattered</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TB	Tuberculose
TCR	Receptor de células T
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A TUBERCULOSE	16
1.1.1 Agente Etiológico.....	16
1.1.2 Epidemiologia.....	17
1.1.3 Fisiopatogenia	20
1.1.4 - Imunopatogenia	22
1.2. A VACINA BCG.....	25
1.2.1 Histórico.....	25
1.2.2 Diferença entre as BCGs pelo mundo.....	26
1.2.3 A BCG no Brasil	28
1.2.4 Controle de Qualidade	29
1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS	31
1.3.2. Estágios de maturação das DCs	34
1.4. BCG E DCs	39
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVO GERAL.....	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	42
3.2. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO.....	42
3.3. PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS	42
3.3.1. Padronização	42
3.3.1.1. Agregação ao frio e Percoll.....	42
3.3.1.2. Separação de monócitos por citometria de fluxo.....	43
3.3.1.3. Separação de monócitos por microesferas magnéticas	44
3.4. DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM DCs.....	44
3.4.1. Padronização da diferenciação de monócitos em DCs.....	44
3.4.1.1. Avaliação de meio e soro para cultivo	44
3.4.1.2. Avaliação da concentração de citocinas utilizadas e avaliação da utilização de tubo ou placa para o cultivo e diferenciação das células.....	45
3.4.2. Diferenciação de DCs	46
3.5. INFECÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS COM A VACINA BCG.....	46
3.6. FENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	48

3.7. DETECÇÃO DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DOS CULTIVOS.....	49
3.8. DOSEAMENTO	50
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4. RESULTADOS	51
4.1. ENSAIO DE ISOLAMENTO DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.....	51
4.1.1 <i>Purificação de monócitos por gradientes de densidade e agregação ao frio</i>	<i>51</i>
4.1.2. <i>Separação de monócitos por citometria de fluxo.....</i>	<i>53</i>
4.1.3. <i>Separação de monócitos por microesferas magnéticas</i>	<i>54</i>
4.2. DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITO EM DC	55
4.2.1. <i>Avaliação do meio para cultivo</i>	<i>55</i>
4.2.2. <i>Avaliação da utilização de tubo ou placa para o cultivo e diferenciação das células..</i>	<i>57</i>
4.2.3. <i>Avaliação da concentração de citocinas utilizadas para a diferenciação das células..</i>	<i>59</i>
4.3. IMUNOFENOTIPAGEM.....	60
4.3.1. <i>Marcadores pan de superfície de moDCs</i>	<i>60</i>
4.3.2. <i>Marcadores de ativação e maturação de moDCs.....</i>	<i>61</i>
4.3.3. <i>Infecção com BCG</i>	<i>62</i>
4.3.3.1. <i>Comparação entre ampolas do mesmo lote.....</i>	<i>69</i>
4.4. DETECÇÃO DE CITOCINAS	70
4.4.1. <i>Comparação entre células não diferenciadas e diferenciadas.....</i>	<i>70</i>
4.4.2. <i>Citocinas na infecção com BCG</i>	<i>72</i>
4.4.2.1. <i>Comparação intra-lote</i>	<i>73</i>
4.5. UFC NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS	74
4.6. COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE SELEÇÃO	76
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÃO	92
7. PERSPECTIVAS	93

1 INTRODUÇÃO

Esta dissertação visa como meta principal o estudo *in vitro* de células dendríticas humanas e sua relação com a vacina BCG Moreau, avaliando a ativação e a maturação daquelas células como possível ferramenta para desenvolvimento de um ensaio *in vitro* de potência. Esta abordagem pode ajudar na concepção de novas intervenções profiláticas, bem como terapêuticas, seguras contra a tuberculose. O Laboratório de Imunologia Clínica do IOC/FIOCRUZ vem ao longo dos últimos anos estudando a resposta imune celular em material humano procedente principalmente da região metropolitana do Rio de Janeiro. Nesta região urbana, foram encontradas altas taxas de infecção pelo bacilo de Koch. Antes, porém, torna-se interessante uma revisão de alguns aspectos da literatura científica relacionados aos objetivos do presente trabalho.

1.1 A TUBERCULOSE

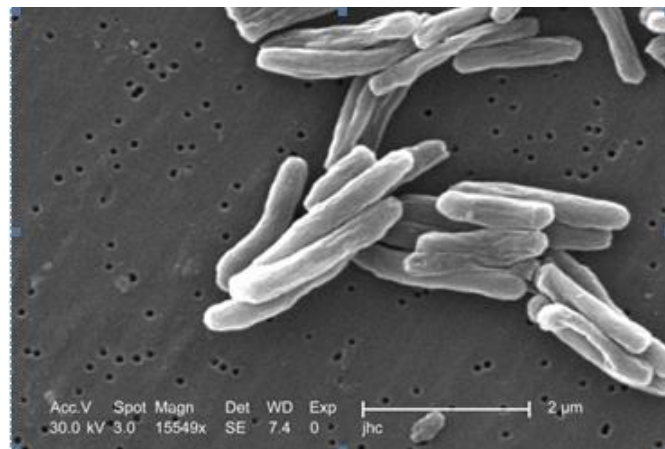
1.1.1 Agente Etiológico

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa milenar que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Essa bactéria, também conhecida como bacilo de Koch, foi descoberta em 1882 por Robert Koch (Prêmio Nobel de Medicina em 1905).

O Mtb é pertencente à ordem Actinomycetales e à família Mycobacteriaceae. Morfológicamente, apresenta-se na forma de bacilo reto ou curvo, com 0,2 a 0,7 μm de largura por 1,0 a 10,0 μm de comprimento (Figura 1). É um patógeno intracelular facultativo capaz de estabelecer infecções que duram uma vida toda, muito característica da forma latente na qual estima-se que um terço da população mundial esteja infectada. Além de aeróbio, este organismo é imóvel e não tem característica de formador de esporos (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009).

Os representantes deste gênero apresentam parede celular rica em lipídeos tornando o micro-organismo resistente a desinfetantes, detergentes, antibióticos comuns e colorações tradicionais. Com relação a coloração, esses bacilos tem como característica a álcool-ácido resistência (marcação BAAR - bacilos álcool-ácido resistentes), podendo formar complexos com os derivados de trifênilmetano, resistindo à ação do álcool-ácido (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009).

Figura 1: Fotografia de microscopia eletrônica de varredura representando algumas bactérias de *Mycobacterium tuberculosis*.



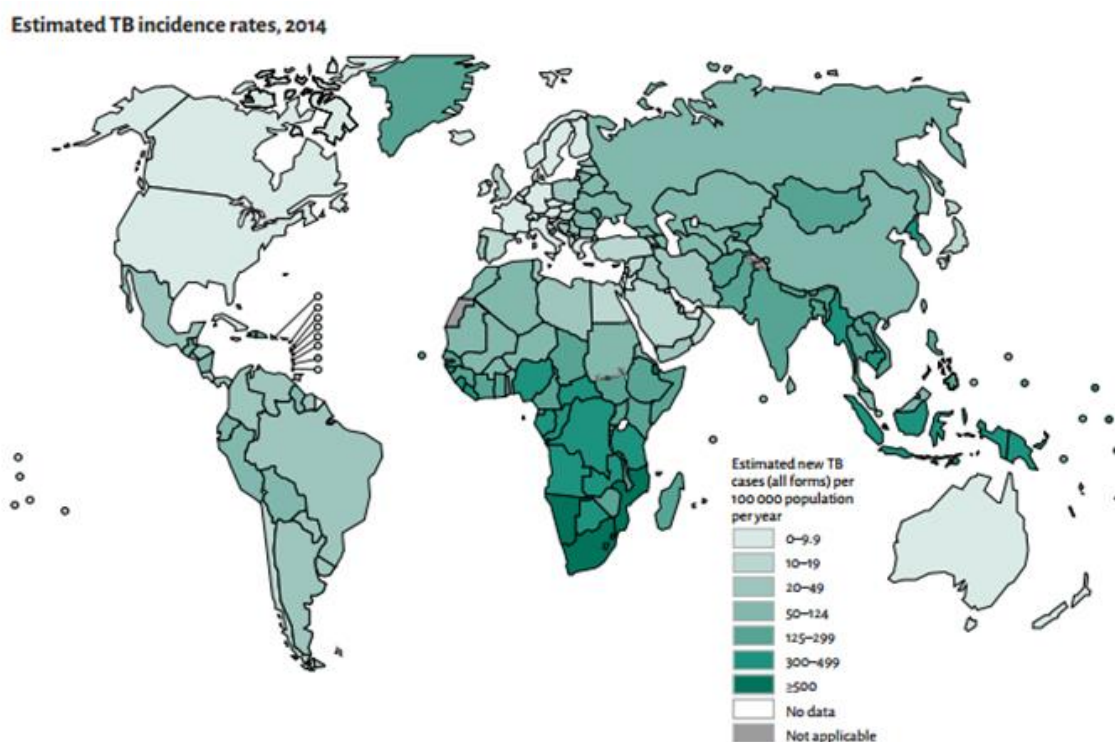
Fonte: CDC website <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>

1.1.2 Epidemiologia

A TB é considerada a principal causa de morte em todo o mundo, juntamente com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em 2014, estimou-se que houve 9,6 milhões de novos casos de TB (Figura 2) sendo 5,4 milhões em homens, 3,2 milhões em mulheres e 1 milhão em crianças. Já o número de mortes foi estimado em 1,5 milhões, sendo que 1,1 milhões estavam entre indivíduos HIV-negativos e 0,4 milhão entre os HIV-positivos, dos quais aproximadamente 890.000 eram homens, 480.000 eram mulheres e 140.000 eram crianças. O número de mortes por TB é inaceitavelmente elevado, levando a TB a ser considerada um problema de saúde mundial (OMS, 2015).

A incidência de TB em relação ao tamanho da população (taxa de incidência) varia muito entre os países (Figura 2). As menores taxas são encontradas predominantemente em países de alta renda, incluindo a maioria dos países da Europa Ocidental, o Canadá, os Estados Unidos da América, Austrália e Nova Zelândia. Nesses países, a taxa de incidência é de menos de 10 casos por 100 000 habitantes por ano. A maioria dos países da Região das Américas, incluindo o Brasil, têm taxas abaixo de 50 por 100 000 habitantes por ano. Esta é a região com a menor carga de TB, em média. Enquanto, os países com maior taxa de incidência se encontram ao Sul do continente africano e asiático.

Figura 2: Estimativa da incidência de Tuberculose no mundo no ano de 2014



Fonte: OMS, 2015

Com relação ao Brasil, ele faz parte do grupo dos 22 países de priorizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que concentram 80% das ocorrências de TB no mundo, ocupando a 16ª posição em número absoluto de casos. Devido a este alto número, a OMS estabeleceu metas desafiadoras para aqueles países em sua estratégia pós-2015, definindo como visão de futuro “Um mundo livre da tuberculose: zero mortes, adoecimento e sofrimento causados pela doença (*A world free of tuberculosis – zero deaths, disease and suffering due to tuberculosis*)”. O Brasil segue a proposta da OMS no que diz respeito às prioridades relacionadas à detecção precoce de casos, ao tratamento do paciente e à sua conclusão com desfecho favorável: a cura (Procópio, 2014; Ministério da Saúde, 2015).

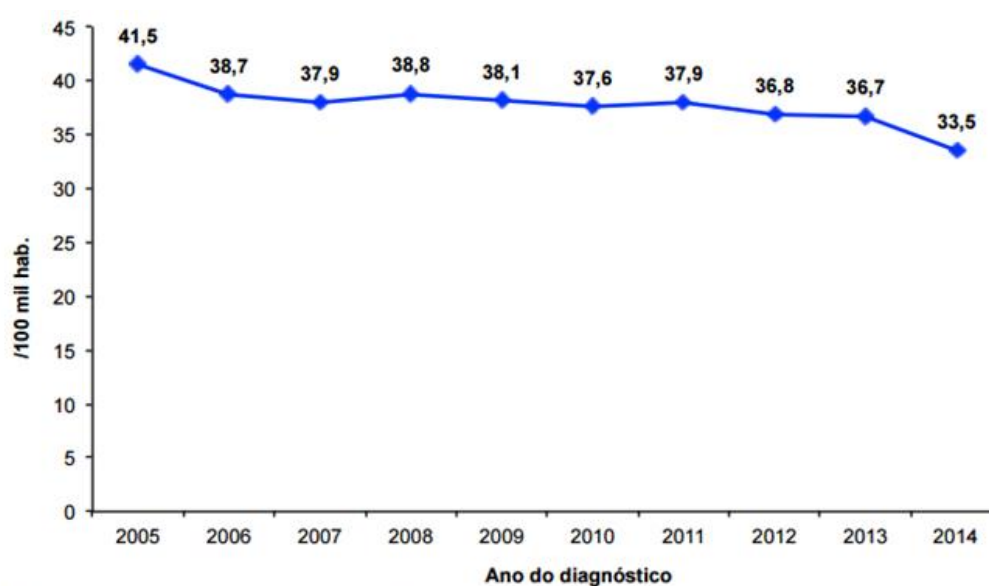
Devido a sua importância, a TB é considerada como prioridade pelo governo federal desde 2003, sendo contemplada em importantes metas nacionais, como no Pacto pela Saúde, Programação das Ações de Vigilância em Saúde, Pacto da Atenção Básica e na Agenda Estratégica da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) (Prócópio, 2014).

Como resultados das medidas tomadas para a redução da TB, de acordo com o Relatório Global da Tuberculose da OMS, o Brasil atingiu todas as metas internacionais relacionadas à incidência, prevalência e mortalidade por TB. As metas propostas foram: parar e reverter a tendência do coeficiente

de incidência da TB até 2015 (meta estabelecida nos Objetivos do Milênio); e reduzir em 50% a prevalência e a mortalidade por TB em 2015, em comparação a 1990 (meta da parceria *Stop TB*) (Ministério da Saúde, 2015).

Em 2014, foram diagnosticados no país 67.966 casos novos de TB. Ao longo dos anos, observou-se uma redução do coeficiente de incidência, passando de 41,5/100 mil habitantes em 2005, para 33,5 por 100 mil destes em 2014, o que corresponde a uma redução média de 2,3% ao ano nesse período (Figura 3) (Ministério da Saúde, 2015).

Figura 3: Coeficiente de incidência de tuberculose. Brasil, 2005-2014



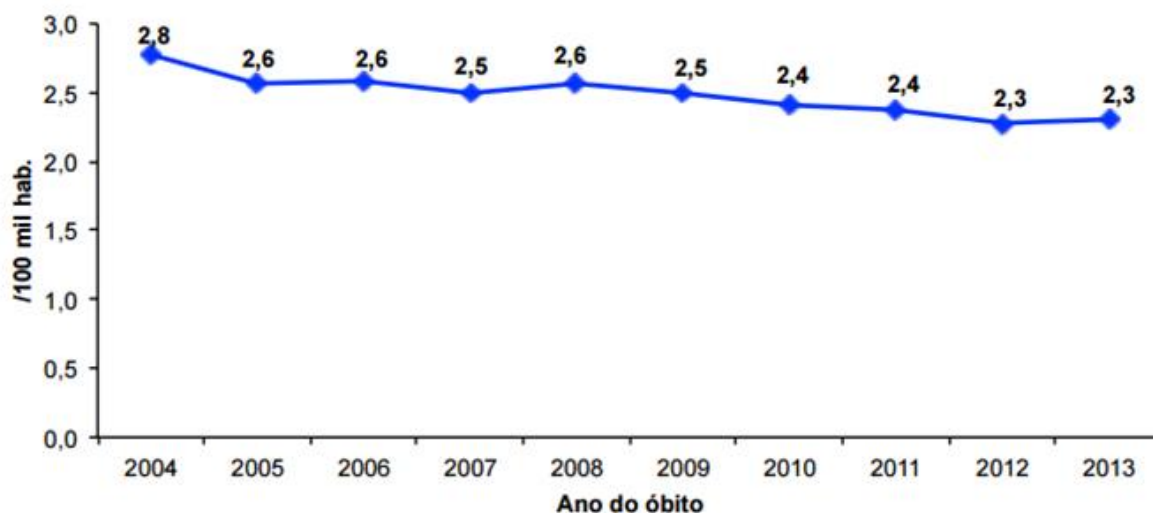
Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan); Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).
Dados sujeitos a alteração.

Fonte: Ministério da Saúde, 2015

Apesar da redução do coeficiente de incidência da TB, ainda restam desafios para a redução do número de casos da doença, visto que o Brasil ainda registra cerca de 73 mil casos novos por ano (Ministério da Saúde, 2015).

Já o coeficiente de mortalidade por TB também apresentou redução no período de 2004 a 2013 (Figura 4). No ano de 2013, dentre os estados, os que apresentaram maiores coeficientes foram Rio de Janeiro (5,0 óbitos/100 mil hab.), Pernambuco (3,8/100 mil hab.) e Acre (3,6/100 mil hab.). Já as capitais, Recife, Rio de Janeiro e Belém foram as que apresentaram maior risco de morte por TB (Ministério da Saúde, 2015).

Figura 4: Coeficiente de mortalidade por tuberculose. Brasil, 2004 - 2013



Fonte: Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM); Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).
Dados sujeitos a alteração.

Fonte: Ministério da Saúde, 2015

1.1.3 Fisiopatogenia

O Mtb é transmitido na maioria dos casos pela via respiratória a partir de pacientes baculíferos que liberam aerossóis pela tosse, espirro e fala. As gotículas contendo bacilos, após a expectoração, podem permanecer no ar por alguns minutos ou até mesmo horas, sendo aspiradas por indivíduos saudáveis. A dose infectante é de 1-200 bacilos, enquanto cada gotícula do aerossol pode conter 1-400 bacilos. Quando inalados, a grande maioria dos bacilos é retida pelas barreiras físicas de defesa do corpo que promovem então a exclusão das partículas para o exterior. Contudo, algumas bactérias não são retidas, sendo aspiradas para o interior do pulmão (American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention 2000).

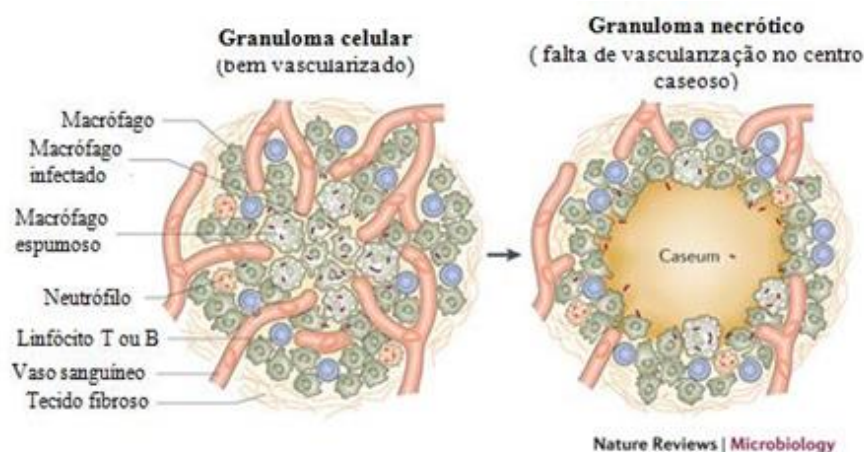
Chegando aos alvéolos pulmonares, os bacilos são rapidamente detectados e capturados por macrófagos alveolares, levando a uma destruição da maioria das bactérias. Entretanto, nem todos os bacilos são destruídos, e um pequeno número destes pode permanecer no ambiente intracelular. Uma vez que os macrófagos são infectados, as bactérias se multiplicam até causarem a morte do macrófago, liberando assim bacilos no meio extracelular, onde estes poderão infectar outros macrófagos. Na tentativa de conter a infecção durante o processo inicial, os macrófagos alveolares secretam citocinas e

quimiocinas, induzindo, portanto uma resposta inflamatória local e a migração de monócitos da corrente sanguínea para o local de infecção (Russell, 2007).

A apresentação de antígenos de Mtb por células dendríticas (DC) a linfócitos T nos nódulos linfáticos induz a expansão e migração dos linfócitos competentes para o local de infecção, iniciando a formação do granuloma. Em alguns casos, os bacilos podem disseminar-se antes da formação dos granulomas através do sistema linfático ou circulatório para outras partes do pulmão ou órgãos do corpo durante os estágios iniciais da doença. Esta etapa caracteriza a forma clínica da TB extrapulmonar (Russell, 2007).

Os granulomas são estruturas bem organizadas, apresentando composição dinâmica com células imunes em vários estágios de diferenciação. A composição celular das lesões granulomatosas de TB inclui principalmente macrófagos, células de Langerhans, linfócitos B e T e fibroblastos. Com o passar do tempo e o crescimento do granuloma, sua porção central pode sofrer necrose caseosa, devido à carência nutricional. Formam-se, então, um centro necrótico na região central e tal agregação é geralmente circundada por linfócitos e, ocasionalmente, por plasmócitos (Figura 5). Esta estrutura é caracterizada por níveis baixos de oxigênio, pH e nutrientes, possibilitando a formação de um microambiente que limita a multiplicação e disseminação das bactérias. Os granulomas podem persistir durante anos e conter eficientemente o patógeno enquanto o indivíduo se mantiver imunocompetente (Russell, 2007; Ramakrishnan, 2012).

Figura 5: Maturação do granuloma nas lesões de tuberculose pulmonar.



Fonte: (Dartois, 2014)

Geralmente, 90% dos indivíduos afetados controlam com sucesso a infecção por *Mtb*, originando uma forma clínica assintomática, sendo os bacilos contidos num estado dormente ou latente, no interior do granuloma. Nestes casos de TB latente, o controle desta infecção crônica resulta em um equilíbrio permanente entre o hospedeiro e a micobactéria (Chee *et al.*, 2013). A TB latente é definida pela presença de resposta imune específica ao *Mtb*, na ausência de sinais clínicos e radiológicos da doença (Pai, 2010). Entretanto, ainda não é claro se os indivíduos que apresentam tal resposta são portadores de bacilos viáveis, ou se apenas mantêm a referida reação após erradicação do *Mtb*. Mais recentemente, tem se proposto que exista um espectro de infecção TB latente que englobe desde aqueles com lesões que contêm bacilos viáveis, mas assintomáticos, até aqueles que tenham erradicado a infecção com praticamente nenhuma chance de reativação, ou imunidade esterilizante (Chee *et al.*, 2013). Contudo, cerca de 5% dos indivíduos desenvolvem doença primária progressiva severa e potencialmente fatal. Os mecanismos que determinam a progressão da doença não são totalmente conhecidos, mas parecem estar relacionados com fatores ambientais e socioeconômicos, como exposição ao *Mtb* e alta densidade populacional, fatores do hospedeiro, como subnutrição e predisposição genética, assim como fatores do *Mtb*, como variação genética e fatores de virulência (Comstock, 1982; Comas e Gagneux, 2009).

Adicionalmente, num pequeno número de indivíduos com infecção TB latente, alterações no sistema imune devido ao envelhecimento, subnutrição, medicação imunossupressora ou infecção pelo HIV, levam a reativação ou TB secundária. O granuloma perde a sua estrutura deixando de conter os bacilos ainda viáveis, o que conduz à sua replicação e à disseminação da doença (reativação da TB) (Verver *et al.*, 2005).

Nestes últimos dois casos, o sistema imune é incapaz de conter a infecção, levando à formação de uma cavidade no granuloma (Russell, 2007). Nesta fase, as células do sistema imune não conseguem mais conter a infecção, e o bacilo pode atingir números muito elevados, sendo bem conhecido o elevado risco de contágio na TB pulmonar (Silva Miranda *et al.*, 2012).

1.1.4 - Imunopatogenia

Dentre as barreiras físicas de defesa do corpo, os mecanismos de imunidade inata contra o *Mtb* envolvem a barreira mucociliar do trato respiratório. Chegando aos alvéolos, os bacilos são reconhecidos e fagocitados por macrófagos alveolares e DCs das vias aéreas, ambas células inatas bem

conhecidas por serem células apresentadoras de antígenos (APCs). A fagocitose do Mtb é realizada, principalmente, pelos macrófagos através de diversos mecanismos, sendo favorecida pelo surfactante A, produzido pelas células epiteliais alveolares tipo II, aumentando a interação entre a micobactéria e os macrófagos (Ferguson e Schlesinger, 2000).

Alguns componentes do Mtb, como arabinogalactanas, peptideoglicanos e a lipoarabinomanana (LAM), são detectados por um conjunto de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) expressos em macrófagos, DCs, células epiteliais, dentre outras (Dorhoi *et al.*, 2011; Sasindran e Torrelles, 2011). Os PRRs incluem receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo C-lectina (CLRs), receptores depuradores (SRS), receptores Fc de imunoglobulina (FcR) e receptores do tipo NOD (NLRs) (Van Crevel *et al.*, 2002; Sasindran e Torrelles, 2011), sendo uns dos principais PRRs envolvidos nesse reconhecimento os TLRs 2 e 4, presentes principalmente nos macrófagos. Ambos receptores estão relacionados ao reconhecimento de vários componentes da parede celular bacteriana, como o Lipopolissacarídeo (LPS), Lipoarabinomanana (LAM), ácido lipoteicóico, lipoproteínas e peptideoglicano solúvel (Tsuji *et al.*, 2000).

A ligação dos PRRs induz a expressão dos genes de algumas citocinas pró-inflamatórias de resposta mais precoce, como Interleucina (IL)-1 β , Fator de necrose tumoral (TNF) - α , IL-6, que tem a função de promover a ativação de macrófagos (Kishimoto, 2005). Com isso, a IL-1 β induz episódios febris por ser um pirogênio endógeno, além de ser altamente quimiotática para linfócitos T, estimular a proliferação de células T CD4⁺ e a produção de Interferon (IFN)- γ , controlar os processos iniciais de formação de granulomas, e estimular a geração e o recrutamento de neutrófilos (Sugawara *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2009). Já o TNF- α é crítico para a organização continuada das lesões granulomatosas (Roach *et al.*, 2002) e tem propriedades imunorreguladoras (Orme e Cooper, 1999; Mootoo *et al.*, 2009). Por fim, a IL-6 modula a resposta das células T, é essencial para a formação de anticorpos, e estimula a hematopoiese, em particular, a linhagem mielóide (Liu *et al.*, 1997; Kishimoto, 2005).

As quimiocinas são moléculas pequenas secretadas por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T, células endoteliais e outras células locais. As quimiocinas da família CC, como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, tem a função de atrair monócitos, linfócitos, macrófagos, DC, células assassinas naturais (NK) para o local da infecção e favorecem uma resposta do tipo Th1. Já quimiocinas da família CXC, como CXCL10 (IP-10) e CXCL9 são produzidas em resposta ao IFN- γ e atraem, predominantemente, linfócitos T e monócitos, propagando a resposta por células T. Algumas quimiocinas CXC, como CXCL8 (IL-8), CXCL2 (MIP-2) e CXCL1 (KC), são principalmente quimiotáticas para células-tronco

hematopoéticas e granulócitos, além de serem responsáveis pela inflamação neutrofílica em estágios avançados de TB (Sasindran e Torrelles, 2011).

Uma vez que os neutrófilos estão em altos números na derme e são mais eficiente na fagocitose de um grande número de bacilos de BCG do que as DC, durante a vacinação, eles auxiliam na apresentação antigênica entre DCs e células T. A interação neutrófilo-DC modula esta última, como por exemplo diminuindo a produção de IL-10 quando comparada a uma DC estimulada diretamente pela vacina (Morel *et al.*, 2008). As DC ativadas, assistida por neutrófilos, migram para os gânglios linfáticos visando a apresentação de antígenos para as células da imunidade adaptativa, como os linfócitos T (Kapina *et al.*, 2007).

Devido a uma elevada produção de IL-12, a resposta imune ao Mtb é invariavelmente polarizada para o tipo Th1. Essas células Th1 migram para o local da infecção micobacteriana. No local, esses linfócitos T CD4⁺ sofrem uma maturação funcional aumentando a produção de quimiocinas e citocinas efetoras (Kapina *et al.*, 2007). As quimiocinas irão atrair novas células do sistema imune, amplificando a reação inflamatória e promovendo a formação dos granulomas, como já citado anteriormente. Já citocinas como IFN- γ e TNF- α , irão ativar macrófagos adjacentes (Schluger e Rom, 1998; Flynn *et al.*, 2011). Os macrófagos ativados produzem moléculas bactericidas, como espécies reativas de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI), defensinas, catelicidina, proteases, aumentam a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) Classe II na superfície da célula e aumentam a secreção de mediadores inflamatórios. Isso aumenta a habilidade do macrófago de matar o Mtb, aumenta a apresentação antigênica e propaga a inflamação local e a formação do granuloma (Ottenhoff, 2012).

Outras células imunes também podem se acumular no foco infeccioso, como as células T CD8⁺ que também irão secretar mais IFN- γ e causar um efeito citotóxico nas células infectadas (Cooper, 2009). As células Th17 promovem um aumento de células Th1 e recrutamento de neutrófilos; linfócitos B, que juntamente com os linfócitos T, formam estruturas foliculares que orquestram a resposta imune em curso nos pulmões. (Khader e Cooper, 2008).

Outro caminho para o controle do Mtb é a apoptose de células infectadas. A apoptose é o evento de morte celular, geneticamente programada, que envolve uma série de alterações morfológicas no citoplasma e núcleo, levando à inativação e fragmentação da célula apoptótica, ao final de seu ciclo celular. Este mecanismo resulta em retenção do conteúdo tóxico para não liberação no meio extracelular. Caso contrário, haveria dano tecidual, o que resultaria em necrose, e levaria à uma reação inflamatória

exacerbada (Alberts *et al.* 2007). Os fragmentos celulares, resultantes do processo apoptótico, são fagocitados por macrófagos. Assim, os antígenos da micobactéria são utilizados para apresentação antigênica, sem risco de dano químico ou toxicidade para as demais células do tecido.

A apoptose já é estrategicamente um tipo de morte celular que beneficia o hospedeiro na apresentação antigênica, sendo assim vantajoso para este; enquanto a morte celular induzida por necrose gera a disseminação da bactéria para o meio extracelular, aumentando a inflamação (Simas *et al.*, 2011). Alguns patógenos, como o Mtb, podem deliberadamente provocar esse tipo de morte como uma estratégia de escape e virulência, no sentido de evadir-se das células da imunidade inata do hospedeiro e/ou promover a disseminação do patógeno. (Aachoui *et al.*, 2013).

1.2. A VACINA BCG

A BCG é uma vacina quase secular, que contem um patógeno vivo e atenuado. A mesma emprega cepas de *Mycobacterium bovis* (M. bovis), sendo a mais utilizada no mundo, visando o combate a TB.

1.2.1 Histórico

Em 1900, Albert Calmette e Camille Guérin começaram sua pesquisa para a vacina anti-tuberculose no Instituto Pasteur de Lille, na França. Eles cultivaram o bacilo da tuberculose em um meio de cultivo com glicerina e batata, mas encontraram dificuldades para produzir uma suspensão homogênea de bacilos. Numa tentativa de diminuir a sua tendência a aglutinarem-se, eles adicionaram extrato de bile bovina (*ox bile*) no meio e, para surpresa deles, observaram que esse processo levou a uma redução da virulência do mesmo. Esta descoberta foi um primeiro passo para o longo processo de produção de uma vacina a partir de bacilo atenuado (Luca e Mihaescu, 2013)

Em 1908, iniciando com uma cepa virulenta de tuberculose bovina fornecida por Norcard originalmente isolada por ele em 1902 a partir de uma vaca tuberculosa, Calmette e Guérin cultivaram a mesma naquele seu meio acima descrito, e em seguida, procederam à subcultura em cerca de três intervalos semanais. Em 1913, com a eclosão da Primeira Guerra Mundial, eles tiveram certas dificuldades de continuar com seus experimentos, mas apesar disso, conseguiram manter as culturas da bactéria durante a ocupação alemã de Lille. Em 1919, depois de cerca de 230 subculturas realizadas durante os 11 anos anteriores, eles tinham um bacilo da tuberculose bovina que não conseguia produzir

doença quando injetado em cobaias, como coelhos, gado ou cavalos. Por sugestão de Guérin, o produto foi batizado como Bacilo de Calmette & Guerin Billie. Mais tarde, o termo "Billie" foi omitido, e assim surgiu a denominação BCG (Luca e Mihaescu, 2013)

Em 1921, Calmette decidiu que estava na hora de um teste da vacina, sendo a primeira administração em seres humanos da BCG. No Hospital Charité em Paris, uma mulher havia morrido de TB algumas horas após dar à luz uma criança sadia. Então, com auxílio dos médicos, administrou uma dose de BCG por via oral para o recém-nascido. Após, não foram observados efeitos adversos e a criança não desenvolveu TB. Depois do sucesso dessa vacinação pioneira, outros recém-nascidos foram também vacinados e não foi observado o desenvolvimento da TB na infância, indicando que uma vacina segura e eficaz contra a TB estava finalmente disponível (Liu *et al.*, 2009).

A via oral foi escolhida, uma vez que Calmette acreditava que o trato gastrointestinal era a via de infecção natural pelo bacilo da TB. Mais tarde, foram feitos alguns testes em vias subcutânea e cutânea em outras crianças, mas devido às reações locais, a vacina foi recusada pelos pais, e assim a via oral foi continuada (Luca e Mihaescu, 2013). O Instituto Pasteur em Lille começou a produção em massa da vacina BCG. De 1924 a 1928, 114.000 crianças foram vacinadas, sem complicações graves (Luca e Mihaescu, 2013).

A partir de 1924, o Instituto Pasteur também começou a distribuir culturas de BCG para laboratórios ao redor do mundo. A manutenção das culturas de BCG variou extremamente entre os países beneficiados, uma vez que a BCG é uma vacina viva a qual necessita ser repicada em meio de cultivo fresco em poucas semanas. Apesar dos esforços para a padronização de produção e preparação da vacina, como não existiam normas de agências reguladoras locais ou internacionais, então diferentes condições de passagens seriadas foram utilizadas em diversos laboratórios, gerando assim dezenas de subcepas filhas (Ducati *et al.*, 2006).

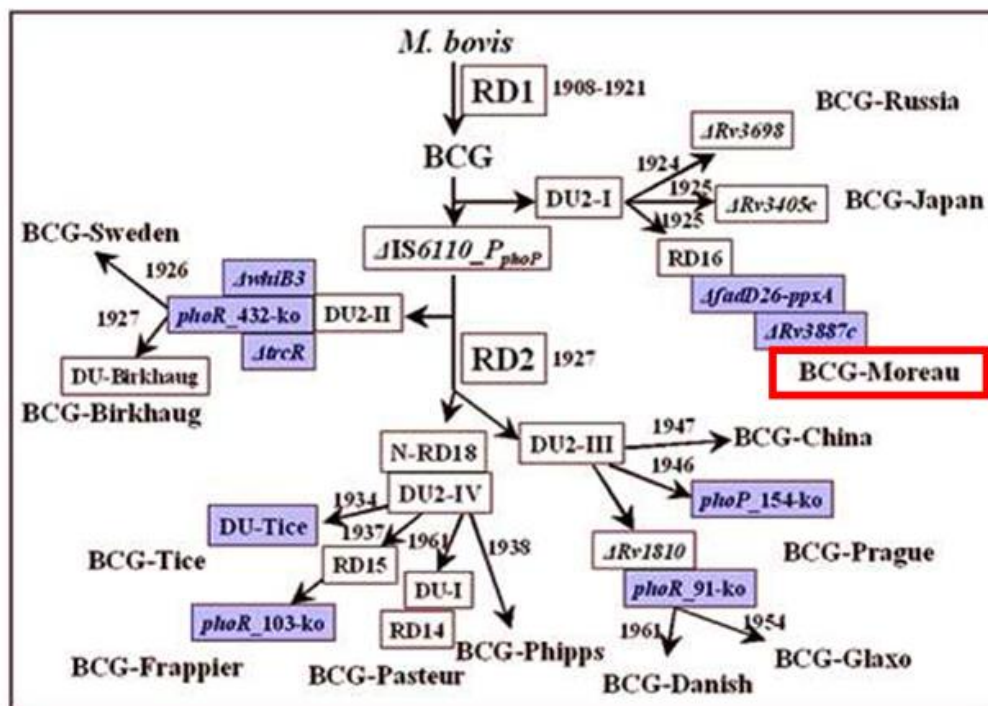
1.2.2 Diferença entre as BCGs pelo mundo

Atualmente, existem várias cepas da vacina BCG em uso. Os principais produtores para o mercado internacional são: Pasteur-Merieux-Connaught, na França, o Statens Serum Institute, na Dinamarca, Evans Medeva, no Reino Unido (antiga Glaxo) e o Japan BCG Laboratory, no Japão. Cada uma destas vacinas é reconhecidamente diferente entre si em vários aspectos, como por exemplo, a

proporção de células viáveis por dose, mas também diferem no genoma dos bacilos utilizados em cada vacina (Benévolo-De-Andrade *et al.*, 2005)

As cepas de BCG são derivadas a partir de uma única cepa, denominada cepa Pasteur original, sendo que devido ao processo de atenuação, esta vacina não contém a região RD (do inglês *region of difference*) -1 do genoma da maioria das micobactérias virulentas (Antas, 2013). Essa região possui genes que estão relacionados a produção e secreção de proteínas, como por exemplo, o CFP-10 (do inglês *Culture Filtrate Proteine 10 kDa*) e o ESAT-6 (do inglês *Early secreted antigenic target 6 kD*), mediadores de virulência do *M. bovis* e do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Behr e Small, 1999). A partir de 1925, a cepa Pasteur sofreu modificações no seu genoma, dando origem a vacinas contendo bacilos onde a região RD-2 encontra-se ausente. A vacina comercializada no Brasil, cepa Moreau (derivada da cepa Pasteur original), contém bacilos que apresentam em seu genoma a região RD-2, como a BCG produzida na Rússia e no Japão. Além disso, a vacina brasileira não contém a região RD-16 do genoma bacteriano (Figura 6) (Benévolo-De-Andrade *et al.*, 2005). Apesar de diversos estudos na área, não existem atualmente dados suficientes para favorecer ou recomendar uma cepa da vacina BCG como melhor ou pior (Luca e Mihaescu, 2013).

Figura 6: Genealogia da vacina BCG



Fonte: Adaptado de Liu et al. 2009.

Na tentativa de controlar a diversificação crescente, em 1956 foi implantado o sistema de lote semente (*seed-lot*), e em 1966, a OMS publicou uma série de requerimentos para a vacina liofilizada, que é utilizada até hoje. A partir de então, vem se incentivando a produção de vacinas com o menor número possível de subcepas, visando a padronização dos sistemas produtivos e de controle de qualidade das vacinas (OMS, 2003)

1.2.3 A BCG no Brasil

A subcepa BCG Moreau chegou ao Brasil, em 1925, trazida pelo médico uruguaio, Julio Elvio Moreau. Essa amostra foi entregue ao pesquisador Arlindo de Assis, no Rio de Janeiro, e foi então chamada de BCG Moreau RDJ. Ainda hoje, a razão pela qual a amostra não foi levada para o Uruguai permanece desconhecida (Benévolo-de-Andrade *et al.* 2005).

No intuito de controlar a TB, o Sistema Único de Saúde (SUS) investe bastante na prevenção e o tratamento para a doença. Como principal forma de prevenção, temos a vacina BCG, sendo uma das vacinas preconizadas no calendário de vacinação infantil do programa nacional de imunização (PNI) pelo Ministério da Saúde. Essa vacina corresponde ao imunógeno mais amplamente utilizado no mundo e proporciona uma boa relação custo-eficácia para prevenção das formas disseminadas da TB em crianças. Já o tratamento para as pessoas que possuem a TB é feito à base de antibióticos; entretanto, hoje o número de casos de bacilos resistentes aos antibióticos usados vem aumentando consideravelmente (Ministério da Saúde, 2013).

Quanto a proteção fornecida pela vacinação com a BCG, esta é considerada limitada, sendo a TB pulmonar, principalmente em adultos, ainda um problema de saúde pública, apesar de extensa cobertura vacinal pelo PNI. Na literatura, discute-se que a melhoria na vacinação contra a TB depende, por um lado, de uma compreensão da natureza da sua imunidade protetora (Morel *et al.*, 2008), por outro, de um melhor controle de qualidade da vacina visando principalmente a sua eficácia/potência (Parra *et al.*, 2009). Além disso, sabendo-se que a proteção concedida por esta vacina cobre os casos mais graves de TB que ocorrem geralmente na infância, aumentar o conhecimento da fase inicial da resposta imune induzida pela vacina BCG que molda essa imunidade protetora é ainda um desafio para a comunidade científica (Morel *et al.*, 2008).

A complexa interação de células da imunidade inata com as da adaptativa, particularmente, nos primeiros dias após a vacinação e o que leva a imunidade protetora após a vacinação, ainda não são

compreendidos por completo. No entanto, esta informação pode ser crucial para o desenvolvimento de novas vacinas ou melhorar as vacinas atuais com relação à eficiência, especialmente em grupos de risco e prevenção de efeitos colaterais (Kohler *et al.*, 2012)

1.2.4 Controle de Qualidade

Os critérios mínimos necessários para a produção e controle da vacina BCG liofilizada de acordo com a OMS são avaliações de viabilidade do bacilo, termoestabilidade, sensibilidade tuberculínica, pesquisa de micobactéria virulenta e esterilidade bacteriana e fúngica para o controle do produto final (OMS, 1987).

Atualmente, a farmacopéia brasileira descreve os seguintes testes para a produção e controle de qualidade da vacina BCG: Testes de (1) identificação, (2) Características e ensaios físico-químicos, como o pH e verificação de umidade residual, (3) Doseamento por contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC), (4) Termoestabilidade e (5) Testes de segurança biológica, como esterilidade e teste para procura de micobactérias virulentas, que é feito inoculando-se BCG em cobaias animais.

A avaliação do número de unidades viáveis representa o controle que oferece mais informações a respeito da viabilidade e estabilidade, sendo considerada essencial para a estimulação de respostas imunológicas protetoras nos indivíduos vacinados; portanto, a avaliação do controle de qualidade dos bacilos viáveis é fundamental para a sua eficácia. Além disso, a vacina BCG é frequentemente utilizada como referência para comparação em ensaios laboratoriais durante o desenvolvimento de novas vacinas contra a TB (Mcshane, 2002; Ho *et al.*, 2011).

O ensaio de UFC é amplamente utilizado como método de quantificação para as vacinas vivas, e tem sido utilizado como um substituto dos ensaios de potência da vacina BCG (OMS, 1987). A técnica de UFC é lenta, tem baixa reprodutibilidade e alta variabilidade nos resultados dos testes, principais razões para os fabricantes e laboratórios de controle de qualidade buscarem novas alternativas (Jensen *et al.*, 2008).

Para realização desse ensaio a farmacopéia Brasileira e a OMS recomendam oficialmente a técnica de contagem de UFC em meio sólido para a determinação da viabilidade e termoestabilidade da vacina BCG. A técnica indicada pela OMS consiste no preparo de diluições (tabela 1) da vacina em meio de cultura líquido, inoculação de volumes destas diluições na superfície de meio sólido de

sensibilidade comprovada, como Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa, seguida de incubação a 37°C +/- 1°C por quatro a cinco semanas e posterior contagem das unidades de colônias formadas. A farmacopéia brasileira recomenda apenas a utilização do meio sólido de LJ. O resultado obtido é expresso em UFC por mililitro (UFC/mL) do produto reconstituído conforme orientação do fabricante (Silva, 2013).

Tabela 1: Procedimento para preparo das diluições do ensaio de contagem de UFC

Diluição	Procedimento
1/100	1 mL da vacina reconstituída + 99 mL de Sauton ¼
1/10000	1 mL da diluição 1/100 + 99 mL de Sauton ¼
1/20000	4 mL da diluição 1/10000 + 4 mL de Sauton ¼
1/40000	2 mL da diluição 1/10000 + 6 mL de Sauton ¼
1/80000	2 mL da diluição 1/10000 + 14 mL de Sauton ¼

Fonte: Silva, 2013

Em resumo, as técnicas laboratoriais disponíveis hoje e os padrões empregados não oferecem a precisão necessária (OMS, 2003, 2004). Com isso, a OMS tem realizado, desde 1999, revisões dos requerimentos de qualidade da vacina BCG em vigor visando à atualização de metodologias e padrões empregados no controle, conforme abordado em encontros com especialistas da vacina BCG. Essas reuniões de colaboração internacional têm buscado métodos alternativos que ofereçam maior precisão para avaliar a viabilidade e termoestabilidade da vacina BCG (Knezevic e Corbel, 2006)

Com isso, conclui-se que existe uma carência de ensaios laboratoriais que indiquem diretamente a eficácia protetora da vacina. A estratégia da OMS tem sido a avaliação, por meio de estudos clínicos, das diferentes preparações da BCG que já tenham suas características *in vitro* e segurança constatadas (Tonus, 2005).

Neste contexto, metodologias que abranjam por um lado a capacidade de infecção da BCG em células e por outro lado indiquem a capacidade da vacina de induzir uma resposta imunológica e com isso demonstrar um grau de eficácia poderiam ser desenvolvidas e vir a acrescentar, junto aos ensaios de viabilidade, um maior grau de segurança a vacina.

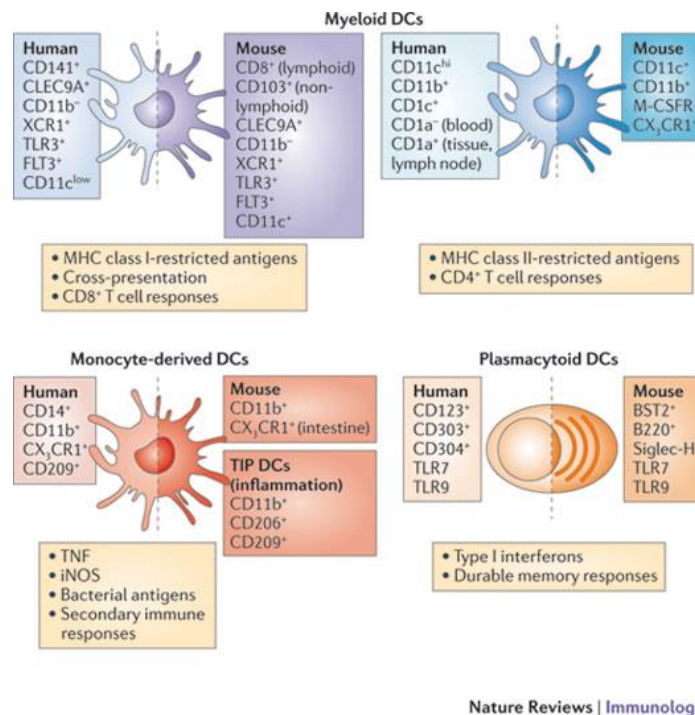
1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As DCs compreendem menos de 1% do número total de células do sangue periférico (Steinman, 1991). As DCs são células da imunidade inata, desempenhando um papel importante na conexão deste braço da resposta imune com a adaptativa, sendo consideradas como as principais células apresentadoras de antígeno profissionais, além de ampliar a resposta imune inata (Abbas, Lichtman e Pilai, 2007). Elas reconhecem e processam antígenos, apresentando-os as células T, desencadeando assim uma resposta adaptativa frente ao antígeno, podendo essa gerar tolerância ou imunidade (Kelsall *et al.*, 2002).

1.3.1. Populações de DCs

Nos últimos anos, relevante conhecimento foi adquirido sobre a origem e função de DCs em sistemas imunológicos. Diferentes subtipos de DCs tem sido descritos, tanto de origem humana como seus correspondentes de origem murina. Essas populações distintas são classificadas de acordo com seu fenótipo (Figura 7). Esses subtipos com origens distintas são complexos, muitas vezes com diferenças sutis e funções especializadas (Collin *et al.*, 2011).

Figura 7: Principais subtipos de DCs humanas e suas equivalentes em murinos



Fonte: Collin *et al.*, 2011

Com relação as DCs humanas, acredita-se que a maioria das DCs se origine de precursores da medula óssea. Apesar disso, as mesmas formam uma família heterogênea, podendo ser de origem mielóide (mDCs) ou plasmocitóide (pDCs). Esses dois subgrupos podem ser discriminados com base em seus fenótipos e características funcionais.

As pDCs recirculam continuamente entre a corrente sanguínea e os órgãos linfóides, através de locais específicos das veias de endotélio, podendo assim serem encontradas nas zonas T dos órgãos linfóides, no timo e no sangue (Lipscomb e Masten, 2002). Essas células tem um importante papel inicial na resposta imune antiviral, podendo ser encontradas nos locais de agressão ativa, promovendo a inflamação. Através da produção de quimiocinas/citocinas, principalmente a secreção de IFN do tipo I, ou através do contato intercelular, essas células modulam o papel de outras células da resposta imune inata, como mDCs e células NK.

O subconjunto mDC também é conhecido como DCs convencionais (cDCs), e elas podem ser migratórias ou residentes em tecidos linfóides (Banchereau *et al.*, 2000). As DCs migratórias capturam antígenos na periferia, migram via linfáticos para os linfonodos, onde os antígenos são apresentados as células T. Exemplos dessa subpopulação são as DCs encontradas na epiderme e no epitélio intestinal, chamadas de células de Langerhans (LCs), e as DCs intersticiais e dermais, encontradas na derme. Já as

mDCs residentes nos tecidos linfóides possuem funções restritas ao órgão residente, onde os antígenos coletados no órgão são apresentados no mesmo local, como por exemplo, as DCs encontradas no timo e no baço (Shortman e Naik, 2007).

De acordo com suas características fenotípicas, as mDCs podem ser ainda divididas em subpopulações Grupamento de diferenciação (CD) $1c^+$ e $CD141^+$; estas apresentam um elevado grau de semelhança tanto na expressão de proteínas, quanto em algumas funções específicas na ativação das respostas imunes adaptativas. As mDCs $CD1c^+$ demonstram prontamente estimular as células T $CD4^+$ virgens e secretam elevadas quantidades de IL-12 em resposta a ligação ao TLR, ao passo que as DCs $CD141^+$ não secretam tanto IL-12, mas estão preparadas para reconhecer células em processo de morte para a subsequente apresentação de antígenos para os linfócitos T $CD8^+$.

Apesar das diferenças entre pDCs e mDCs, ambas são capazes de apresentar antígenos pelos dois MHCs (Classes I e II) de maneira eficaz (Mathan, Figdor e Buschow, 2013).

Há também a possibilidade em se diferenciar DCs a partir de monócitos em cultura frente a determinadas citocinas. Essas são denominadas de DCs derivadas de monócitos (moDC). Essas células se assemelham com as mDCs, apesar de possuírem algumas diferenças fenotípicas. Quando monócitos se diferenciam em DCs, eles apresentam baixa ou nenhuma expressão de CD14 (receptor pan de monócitos) e passam a expressar outros marcadores, como CD1a e CD209 (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin- DC-SIGN*) (Cella, Sallusto e Lanzavecchia, 1997). Esse subtipo de DC não está presente, *in vivo*, em estado estacionário, mas sim em condições inflamatórias, diferentemente das mDCs (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2015). Apesar disso, a diferenciação de monócitos *in vitro* tem se provado uma ferramenta útil para diversos estudos, fornecendo informações sobre situações fisiológicas como o processo de reconhecimento patógenos, ativação e apresentação antigenica ocorre frente a determinados patógenos. Além disso as moDCs são utilizadas como imunoterapia para determinamos tipos de cancer, sendo considerado padrão ouro para o tratamento (Figdor *et al.*, 2004).

Um mecanismo eficiente de classificação das populações acima emprega métodos relacionados a expressão de marcadores de superfície nas diferentes subpoplações de DCs, podemos destacar alguns com principais, são eles: CD1a, CD11c, CD11b e CD209 (Cella, Sallusto e Lanzavecchia, 1997; Banchereau *et al.*, 2000).

CD1a ainda tem sua expressão pouco compreendida. As mDCs podem se diferenciar, a partir de um precursor comum, em duas vias independentes, e que dão origem a precursores sanguíneos

CD11c⁺ com ou sem a expressão de CD1a (Caux *et al.*, 1996; Shortman e Naik, 2007). As DCs CD11c⁺ CD1a⁺ diferenciam em LCs na epiderme e outras superfícies epiteliais, enquanto o subtipo CD11c⁺ CD1a⁻ reabastece vários tecidos, como DCs intersticial/teciduals (Caux *et al.*, 1997; Banchereau *et al.*, 2000).

Já com relação ao papel do CD1a, essa molécula participa da ativação de células T (Cernadas *et al.*, 2009). Ela tem grande homologia estrutural com moléculas de MHC, inclusive com a utilização da cadeia β -2 microglobulina, e sendo assim, denominados de MHC classe I não polimórficos (Martin *et al.*, 1987). Além disso, embora o papel específico de CD1a na indução de IL-12 pelas DCs não estar 100% elucidado, é possível que DCs CD1a⁺ possam influenciar ainda mais a sua função nas células T ativadas. Essas DCs têm capacidade de produzir grandes quantidades de IL-12, sugerindo que podem assim desempenhar um papel importante na promoção da resposta imune do tipo Th1. E sabe-se hoje que esse tipo de resposta imune é crucial para defesa contra o Mtb (Cernadas *et al.*, 2009).

Além disso, DCs apresentam positividade para alguns outros receptores de superfície membranar, como o CD11c e altos níveis de CD11b (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Abbas, Lichtman e Pilai, 2007). O CD11b é considerado um marcador pan de macrófagos, embora não seja exclusivo desse tipo celular, pois essa molécula também é expressa em uma grande variedade de leucócitos. Já o CD11c é geralmente expresso por DCs, porém não exclusivo desse tipo celular. Esses dois receptores ajudam a diferenciar algumas subclasses de DCs, com aquelas mDC, que geralmente co-expressam ambos, enquanto aquelas pDC tendem a não expressar CD11b (Siddiqui *et al.*, 2015).

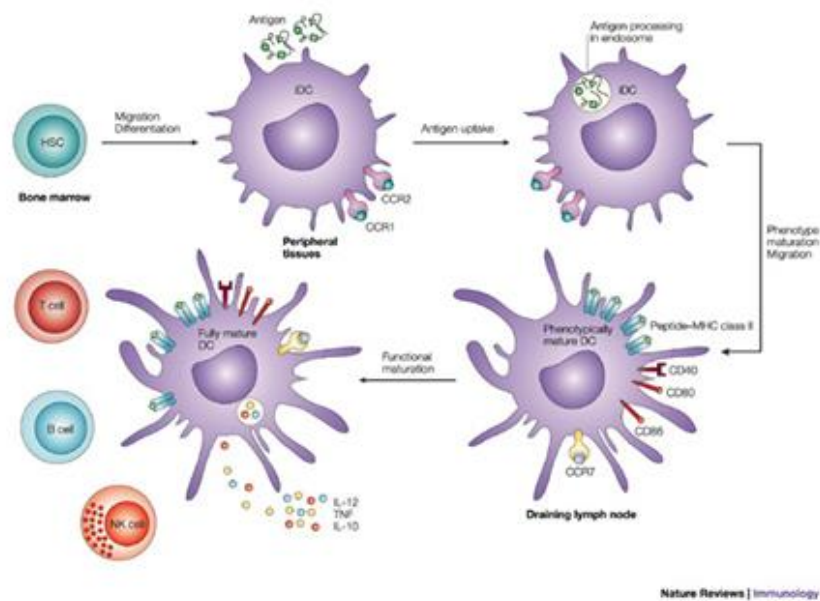
CD209 ou *Dendritic cell-specific ICAM 3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) é um membro da família CLR expressa principalmente em moDCs diferenciadas *in vitro*, apesar de também ser expressa mDCs e pDCs. Ele é um receptor de adesão e reconhecimento de PRRs e desempenha um papel importante na migração e adesão DC, resposta inflamatória, a ativação de células T (Granelli-Piperno *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006).

1.3.2. Estágios de maturação das DCs

As DCs epiteliais e teciduals normalmente se encontram no estado imaturo. Quando capturam um antígeno, sofrem um processo de maturação, perdendo a capacidade de capturar novos antígenos e ganhando a capacidade de processar e apresentar o antígeno capturado eficientemente. A apresentação do antígeno ocorre então após a migração dessas células para órgãos linfóides secundários. Durante a migração, depois de sua ativação, as DCs apresentam outro perfil de receptores (Geijtenbeek *et al.*,

2003; Abbas, Lichtman e Pilai, 2007). Isto é utilizado para definição do estágio em que uma DC se encontra (Figura 8).

Figura 8: Esquema da maturação de uma Célula Dendrítica.



As células tronco hematopoiéticas (HSCs) diferenciam-se em células dendríticas imaturas (iDCs) que são recrutadas para os tecidos periféricos, onde tem função de internalizar antígenos que são processados e apresentados via de MHC de classe II. Depois da captura de antígeno, as DCs migram para o tecido linfóide e maturam fenotipicamente aumentando a expressão de CD40, CD80, CD86, MHC de classe II e do receptor de quimiocina CCR7. Já no tecido linfóide, elas interagem com células T, células B e NK apresentando o antígeno. Essa interação leva a ativação das células lá presentes e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12 e o TNF. Fonte: Hackstein e Thomson, 2004

Em seu estado imaturo, as DCs expressam receptores endocíticos, fagocíticos e de quimiocinas. O último tipo é responsável por atrair as DCs para os tecidos periféricos. São exemplos desses receptores, os Receptores Cisteína-cisteína (CCR) 6, CCR1, CCR2 e CCR5 (Lipscomb e Masten, 2002).

Existe uma grande variedade desses receptores endocíticos descritos em DCs. Os imunocomplexos são capturados por FcRs, como FcαR (CD89), FcεRI e II (CD23) e FcγRI (CD64), RII (CD32) e RIII (CD16) (Cella *et al.*, 1997; Sabatté *et al.*, 2007). Já para os CLRs, temos representados os de manose (CD206), o DEC-205 de macrófagos (CD205), o CD209, o BDCA-2, o DECTIN-1, o DCIR, o DCAL-1 e o C-LEC (Sabatté *et al.*, 2007).

Como relação a interação das DCs com componentes estruturais das micobactérias, tais como Mtb e BCG, o CD209 tem sido proposto como crucial para a infecção de DC (Geijtenbeek *et al.*, 2003;

Gagliardi *et al.*, 2005). Segundo Geijtenbeek e colaboradores, a ativação dessa molécula pela micobactéria prejudica a maturação de DC e induz a produção de IL-10 anti-inflamatória. Estas condições promovem a imunossupressão e podem contribuir para a sobrevivência do Mtb (Geijtenbeek *et al.*, 2003). Contudo, também já foi demonstrado que o bacilo pode ser interiorizado sem a presença de CD209, e que a vacina BCG induz uma deficiência de IL-12 e a secreção de IL-10 por DCs, independente da expressão de CD209. Estes dados sugerem que CD209 não pode ser considerado como o único receptor de interiorização para a vacina BCG, e também não pode ser considerado como o receptor responsável e exclusivo para a imunossupressão induzida por micobactérias (Gagliardi *et al.*, 2005). Apesar do papel endocítico, o CD209 ainda é expresso nas DCs maduras, pois é fundamental no primeiro contato e na ligação entre as DCs e células T durante a sinapse imunológica, ou seja, na estimulação antígeno específica (Steinman, 2000)

Além dos receptores endocíticos, as DCs possuem os PRRs. A família de PRRs melhor caracterizada é a dos TLRs que reconhecem os padrões moleculares em lipídeos, carboidratos, peptídeos e estruturas relacionadas com ácidos nucleicos amplamente expressos em diferentes grupos de microorganismos, como lipoproteínas de procariotos, glicolipídeos, flagelina, CpG DNA e lipossacarídeos (Janeway e Medzhitov, 2002). Em DCs, foram encontrados TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR8 e TLR9 (Van Kooyk e Geijtenbeek, 2003). A distribuição dos TLRs varia de acordo com a população de DCs, permitindo respostas imunes especializadas de acordo com o patógeno. Por exemplo, TLR4 é responsável pela detecção de LPS e TLR2 é responsável pela detecção de peptídeoglicanos e lipoproteínas, sendo geralmente ambos encontrados em populações de monócitos e mDCs (Uronen-Hansson *et al.*, 2004). Enquanto as pDCs expressam TLR7 e TLR9, a ativação dessas vias por produtos virais induz altos níveis de IFN- α /IFN- β (tipo I) pelas células (Waller *et al.*, 2005).

Já quando maturadas, as DCs perdem esses receptores endocíticos e fagocíticos, e aumentam a expressão de moléculas de adesão, como CD2, CD11a, MHC classes I e II e moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) e de ativação CD83, sendo este último um típico marcador de maturação de DCs (Morel *et al.*, 2008).

O MHC humano também é chamado de antígeno leucocitário humano (HLA). O MHC é uma região genética ampla que codifica as moléculas de classe I e II e outras proteínas, são altamente polimórficos, sendo o sistema proteico mais polimórfico da espécie humana. O sistema HLA é geneticamente determinado por genes que se localizam no braço curto do cromossoma 6. Os antígenos

HLA podem ser divididos em duas classes: HLA classe I e II, sendo diferenciados de acordo com sua distribuição nos tecidos e suas funções. As principais proteínas de classe I do HLA são chamadas A, B e C e as principais proteínas do HLA classe II são chamadas DR, DP e DQ. Durante anos após a descoberta do MHC sua única função documentada estava relacionada com a rejeição de transplantes, entretanto anos depois descobriu-se seu papel fundamental da resposta imunológica. O MHC classe II é constitutivamente expresso em APCs tais como células dendríticas, células B, monócitos e macrófagos. Sua expressão é aumentada quando essas células são ativadas, sendo sua principal função é a apresentação de antígenos para as células T CD4⁺ (Abbas, Lichtman e Pilai, 2007).

As moléculas co-estimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), fazem parte da família de ligante B7, são expressos em DCs, macrófagos ativados e células B, principalmente. Entretanto CD 80 geralmente esta ausente ou pouco expresso em células não estimuladas enquanto CD86 é expresso constitutivamente em níveis moderados. Seus receptores são encontrados principalmente em células T e são CD28 e CTLA-4 (CD152). Apesar da função principal desses ligantes ser a participação na ativação de células T naive, eles também têm papel importante na proliferação de células T, produção de IL-2 e também podem ter função inibidora das células T (Abbas, Lichtman e Pilai, 2007).

Ambos, B7-1 e B7-2, são capazes de se ligarem aos receptores CD28 e *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4* (CTLA-4) (Alegre et al., 2001; Sharpe e Freeman, 2002), entretanto a ligação com CTLA-4 parece ter uma afinidade muito maior do que a ligação a CD28 (Linsley *et al.*, 1994). Isto sugere que não são aminoácidos conservados que formam os locais de ligação críticos. Enquanto CD28 desempenha um papel importante na ativação de células T juntamente como a ligação da molécula de MHC ao receptor de células T (TCR), CTLA-4 funciona como um receptor inibitório importante. Embora B7-2 seja geralmente a primeira molécula B7 encontrada devido a sua expressão constitutiva nas APCs, não parece haver diferenças significativas nas funções de B7-1 e B7-2. Em vez disso, a ligação receptor-ligante depende mais do tipo de APC e o seu estado de ativação (Sharpe e Freeman, 2002).

CD40 é um membro da superfamília dos receptores de necrose tumoral e é expresso tanto em células imunológicas como macrófagos, DCs, monócitos e linfócitos B quanto em células não imunológicas como células endoteliais, epiteliais e mesenquimais (Schönbeck e Libby, 2001; Danese *et al.*, 2004). Seu ligante, CD40L (CD154), é expresso principalmente em células T CD4⁺ ativadas, mas também pode ser encontrado em células NK, linfócitos T CD8⁺ e B, basófilos, entre outros (Danese *et al.*, 2004).

Apesar do CD40 ter sido primeiramente descrito como importante molécula na imunidade humoral de células B, hoje se sabe que essa molécula também contribui para a ativação de células da imunidade adaptativa por células da imunidade inata, conferindo também um papel importante na imunidade celular. A ligação CD40/CD154 regula diferentes ações da imunidade celular e humoral como ativação de células T, proliferação de linfócitos B, síntese de imunoglobulinas, indução de apoptose em células T CD4⁺ e geração de células T CD8⁺ de memória, entre outras (Blair *et al.*, 2000; Bourgeois *et al.*, 2002).

Nas DCs, a ligação de CD40 induz um aumento da expressão moléculas co-estimulatórias como CD86 e CD56 na superfície celular (Danese *et al.*, 2004), além de estimular a produção de diferentes citocinas como IL-8, TNF- α , MIP-1 α e IL-12 (Karimi e Pourfathollah, 2012). A regulação da expressão de CD40 na superfície celular não está relacionada ao tipo de DC (mDC, pDC ou moDC) mas sim ao receptor utilizado para ativação da mesma e a sinalização geradas por essa ligação inicial (Ma e Clark, 2009; Karimi e Pourfathollah, 2012)

CD83 é um membro da superfamília das imunoglobulinas que tem sua expressão aumentada após a maturação de DCs (Elkord *et al.*, 2005). Ela tem sido utilizada como um marcador de DCs maduras apesar do seu papel preciso ainda permanecer desconhecido. Tem sido sugerido que o CD83 é um receptor funcionalmente importante na regulação do desenvolvimento de imunidade celular (Scholler *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que o domínio extracelular CD83 inibe a proliferação de células T mediadas por DCs (Lechmann *et al.*, 2001). O aparecimento de CD83, como um marcador de maturação funcional, também vem sendo correlacionado com a capacidade das DC para produzir maiores quantidades de citocinas (Corinti *et al.*, 2001; Elkord *et al.*, 2005).

Por fim, as DCs maduras também passam a expressar receptores de quimiocinas, como CCR7, que são responsáveis pela migração das DCs para os linfonodos (Banchereau *et al.*, 2000).

Juntamente com a expressão de moléculas co-estimulatórias, há um aumento da secreção de citocinas pelas DCs. Essas também têm um papel importante na resposta imune. Alguns trabalhos vêm mostrando o aumento de citocinas por DCs infectadas com a vacina BCG (Lozza *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013); tanto das pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23, quanto da anti-inflamatória IL-10, além do aumento das quimiocinas pró-inflamatórias, como CCL2 (MCP-1) e CCL5 (RANTES) (Zhang *et al.*, 2013).

Dessas citocinas, a IL-12 possui um papel importante, aumentando a capacidade de DCs associadas com a vacina BCG em induzirem uma resposta imune efetora do tipo Th1, e resposta de

células NK (Marongiu *et al.*, 2013). Já o TNF- α desempenha um papel importante na fisiologia das infecções por micobactérias e também é fundamental na maturação das DCs (Thurnher *et al.*, 1997; Demagel 2000; Zhang *et al.*, 2013). Ao inverso, a IL-10 tem papel imunorregulatório e seus efeitos inibidores antagonizam a resposta imune protetora das células T; essa citocina pode contribuir para micobactérias se estabelecerem no hospedeiro infectado (Morel *et al.*, 2008).

1.4. BCG E DCS

Na maioria dos casos, para se garantir a potência da vacina BCG é realizado apenas o doseamento, porém, sem um correlato de uma resposta imune induzida pela vacina. Ensaios *in vivo* em cobaias animais, além de serem de difícil execução, são feitos apenas no intuito de testar a virulência da cepa. Devido a estes fatos, alguns autores vêm tentando desenvolver ensaios *in vitro* como o estudo que utiliza células imunocompetentes de cobaias animais previamente imunizados com a vacina BCG (Parra *et al.*, 2009). No entanto, faltam propostas de ensaios em células humanas considerando principalmente a primeira linha da resposta imunológica, vista como crucial no desenrolar do papel protetor da vacina contra a TB (Kaufmann, 2002).

Por outro lado, a interação da vacina BCG com DCs originadas *in vitro* a partir de monócitos humanos de sangue periférico vem sendo utilizada em pesquisas envolvendo a resposta imune inicial conferida por essa vacina (Cheadle, Selby e Jackson, 2003; Morel *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013). Hoje, a hipótese para a possível falha da vacina BCG na proteção contra a TB pulmonar envolve o estímulo insuficiente das células T CD8⁺ e duração restrita da memória imunológica (Kaufmann *et al.*, 2010; Kaufmann, 2012). Isto poderia ser devido a um estado inadequado de ativação de DCs e de mecanismos de evasão explorados pelo patógeno. Em adição, a persistência contínua da vacina BCG no organismo, após a imunização, pode induzir anergia ou o esgotamento da resposta das células T (Lozza *et al.*, 2014).

Além disso, a vacina BCG também vem sendo utilizada como um maturador de DCs em testes que visam a utilização destas células como imunoterapia ou vacina em alguns tipos de câncer (Thurnher *et al.*, 1997; Shankar *et al.*, 2004).

Esta área tem ganhado grande importância ultimamente, tanto que o Centro Nacional para Medicina Complementar e Alternativa (NCCAM) é a principal agência do governo norte-americano, um instituto do NIH (Institutos Nacionais de Saúde), para a investigação científica sobre os diversos sistemas médicos e de saúde, práticas e produtos que não são geralmente considerados parte da medicina

convencional. Um dos objetos de estudo do NCCAM é a geração de células potentes que possam substituir as cobaias animais de laboratório nos testes de drogas.

Neste contexto, este projeto visa por um lado desenvolver um ensaio *in vitro* para avaliação da potência de vacina contra TB utilizando células dendríticas humanas, e por outro, uma compreensão melhor da resposta imune inicial *in vitro* em humanos, no intuito de tentar identificar os mecanismos específicos que podem conferir proteção contra a tuberculose.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Estudar a geração de DCs *in vitro* a partir de monócitos humanos do sangue venoso periférico e sua relação com a vacina BCG Moreau, avaliando assim a ativação e a maturação daquelas células como possível ferramenta para desenvolvimento de um ensaio de potência.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo de isolamento de monócitos;
- Estabelecer um protocolo de geração *in vitro* de DCs;
- Padronizar um ensaio de diferenciação de DCs;
- Avaliar a resposta do ensaio de diferenciação de DCs em diferentes diluições da vacina BCG;
- Dosar as citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-18, TNF- α , IL-1 α e a citocina anti-inflamatória IL-10 nos sobrenadantes das culturas acima.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras de produtos do sangue venoso periférico de indivíduos adultos saudáveis, via doações espontâneas e voluntárias, foram obtidas do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (SH-HUCFF). As bolsas de fase leucocitária, um produto excedente da capa de leucócitos conhecida como “buffy-coat” e contendo aproximadamente 50 ml de volume celular, foram obtidas após a confirmação dos testes sorológicos negativos realizados pelo próprio banco de sangue. Este projeto conta com aprovação do comitê de ética da FIOCRUZ/IOC sob o número CAAE: 35775014.0.0000.5248.

3.2. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

A obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi realizada a partir do buffy-coat por separação através do método de diferença de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). O material foi diluído em meio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640/Hepes (LGC technologies) na proporção de 1:2, adicionado lentamente ao gradiente de densidade de Ficoll (densidade 1077g/ml) e centrifugado a 300g por 25 minutos a temperatura ambiente. As PBMC presentes na fase em forma de anel foram coletadas, lavadas três vezes com meio e ressuspensas para contagem e aferição da viabilidade celular através de uma solução corante de azul de trypan (diluída 1:100, Sigma- Aldrich), utilizando uma câmara de Neubauer, para posterior isolamento de monócitos.

3.3. PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS

3.3.1. Padronização

3.3.1.1. Agregação ao frio e Percoll (n=6)

Após a etapa de separação de PBMC, o isolamento dos monócitos foi feito em duas etapas. A primeira pela técnica de agregação ao frio (Santos *et al.*, 2001) e posteriormente uma segunda separação foi feita, por diferença de densidade gerada por gradiente de Percoll (1135 g/ml) (Sigma- Aldrich)

(Repnik, Knezevic e Jeras, 2003), como a seguir:(A). As PBMC obtidas (5×10^7 células) foram lavadas em meio e contidas em tubos cônicos de 15 ml (Falcon). Os tubos foram mantidos em uma roller table por meia hora a 4°C em uma câmara fria de temperatura controlada. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados por 40 segundos a 100g a 4°C. O sobrenadante contendo os linfócitos foi descartado e o pellet de monócitos enriquecido foi ressuspensionado em meio. Após, as células foram submetidas à separação por gradiente de densidade de Percoll; (B) Uma solução de Percoll a 100% foi preparada através de diluição de 9:1 em solução de sais balanceados de HANK's 10x concentrado (Sigma-Aldrich). Esta solução mãe foi diluída em meio, de forma a gerar 4 diferentes diluições de Percoll (70%, 50%, 40% e 25%). As diluições foram preparadas como 3,5 ml da solução mãe diluída em 1,5 ml de meio para a diluição de 70%; 2,5 ml da solução mãe diluída em 2,5 ml de meio para a diluição de 50%; 1,0 ml da solução mãe diluída em 1,5 ml de meio para a diluição de 40%; e 2,5 ml da solução de 50% de Percoll diluída em 2,5 ml de meio para a diluição de 25%. As células foram ressuspensionadas em 2 ml da solução de Percoll 70% em tubos cônicos de 15 ml. Em seguida, neste mesmo tubo, foram adicionados 2 ml da solução de Percoll 50%, 2 ml da solução de Percoll 40% e 3 ml da solução de Percoll 25%, respeitando esta ordem. O tubo contendo as células e as 4 diferentes diluições de Percoll foi centrifugado a 250g por 5 minutos). Após a centrifugação, formaram-se três fases em forma de anel: uma fase superior localizada entre os gradientes de Percoll 25% e 40%, uma fase intermediária localizada entre os gradientes de Percoll 40% e 50%, e uma fase inferior localizada entre os gradientes de Percoll 50% e 70%. A fase superior, que contém os monócitos, foi retirada e para a avaliação da qualidade da pureza foi realizada a marcação com CD14 e CD3 e analisado por citometria de fluxo (ver item 4.1.1).

3.3.1.2. Separação de monócitos por citometria de fluxo (n=1)

Este método foi feito elaborado a partir de sangue total. Então, foi necessário reduzir a quantidade de hemácias para evitar entupimento do citômetro de fluxo e otimizar a separação celular. Para isso, foi utilizada uma solução de lise comercial (BD lysing solution) diretamente na amostra na proporção de 2 ml de sangue para 6 ml de solução de lise, seguindo o tempo e a lavagem recomendados pelo fabricante. Apesar da quantidade de eritrócitos ter sido reduzida, essa diminuição não foi suficiente. Então, repetiu-se o passo anterior, mas dessa vez utilizando 2 ml da solução diretamente no pellet de células formado após a primeira lise, resultando em uma maior lise das hemácias. Depois, as células

foram contadas e aferida a viabilidade celular através de uma solução corante de azul de trypan (diluída 1:100), utilizando uma câmara de Newbauer.

Dois parâmetros foram utilizados para o sorting: o primeiro, a diferença morfológica (FS vs. SS) das células presentes no sangue, e o segundo, a presença da molécula de superfície CD14 (marcação com anticorpo anti-CD14 humano conjugado a FITC – Invitrogen - em uma alíquota de 50µl das células retirada da suspensão total de células, que foi adquirida no citometro de fluxo antes de se iniciar o sorting). Depois de definidos os critérios para a separação, um gate foi feito na região desejada utilizando ambos os parâmetros. Quando a suspensão de células total foi adquirida, os eventos estavam dentro do gate pré-estabelecido, e assim foram separados.

Após a separação, para avaliação do sorting, as células foram novamente marcadas com anticorpos anti-CD14 humano conjugado a FITC e anti-CD3 humano conjugado a Alexa fluor 647 (eBiosciences).

3.3.1.3. Separação de monócitos por microesferas magnéticas (n=1)

Após a separação das PBMCs conforme descrito na seção 3.2, as células foram submetidas ao isolamento de monócitos utilizando um kit comercial de separação magnética negativa (EasySep – Human Monocyte Enrichment kit, STEMCELL) ou kit comercial de separação positiva (MACS- CD14 Microbeads human, Miltenyi Biotec) ambos seguindo as orientações do fabricante.

Após o isolamento e para avaliação da pureza, as células foram adquiridas no citometro de fluxo e as populações de monócitos e linfócitos foram avaliadas com base no gráfico de morfologia FS vs. SS das mesmas.

Por apresentar um melhor resultado na purificação de monócitos, quando comparada as outras técnicas utilizadas, a separação por beads magnéticas foi a eleita para dar prosseguimento a este estudo.

3.4. DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM DCS

3.4.1. Padronização da diferenciação de monócitos em DCS

3.4.1.1. Avaliação de meio e soro para cultivo (n=3)

Após a separação, as PBMC (n=3) foram diretamente distribuídas em placa de 24 poços (Falcon), contendo 4×10^6 células por poço em 2 ml de meios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's

medium (DMEM) (Gibco) ou RPMI sem soro, sendo a placa incubada por 2 horas em estufa (37°C/5% CO₂) visando sua adesão. Após incubação, a fim de eliminar as células não aderentes (linfócitos), foram feitas três lavagens com meio RPMI ou DMEM. Em seguida, e de acordo com as variáveis abaixo, foi feita a adição de 1 ml de meio completo, RPMI ou DMEM + 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) ou soro humano AB (SH, Sigma-Aldrich), e nos poços para diferenciação de DCs foram adicionados Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e IL-4 (ambos PeproTech) a 300 UI/ml de GM-CSF e 300 UI/ml de IL-4. Após 2 dias, metade do volume total de cada poço foi cuidadosamente retirado, e adicionou-se aos cultivos os respectivos meios completos com citocinas 2x por mais dois dias. Enquanto isso, os poços de monócitos não diferenciados receberam o mesmo tratamento, porém sem a adição das citocinas.

As variáveis utilizadas, tanto para as células não diferenciadas (monócitos) quanto para as células diferenciadas (DCs), foram:

- Cultivadas em RPMI e SFB
- Cultivadas em RPMI e SH
- Cultivadas em DMEM e SFB
- Cultivadas em DMEM e SH

Após um total de 7 dias, a avaliação foi feita através de citometria de fluxo, visando tanto as características morfológicas, FS vs. SS, quanto a expressão dos marcadores CD14 e CD209 (DC-SIGN). A marcação dessas moléculas de superfície foi feita utilizando anticorpos anti-CD14 humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Invitrogen) e anti-CD209 humano conjugado a ficoeritrina (PE) (Biolegend).

3.4.1.2. Avaliação da concentração de citocinas utilizadas e avaliação da utilização de tubo ou placa para o cultivo e diferenciação das células (n=3)

Após a separação dos monócitos por microesferas magnéticas, uma parte foi colocada em placa, e outra em tubo de polipropileno próprio para cultivo de células em suspensão (Falcon), na concentração de 5×10^5 células/ml cada. O protocolo de diferenciação utilizado foi semelhante ao da seção anterior, variando apenas o meio de cultivo completo, o qual foi eleito RPMI com SH, e a

concentração das citocinas GM-CSF e IL-4, sendo duas concentrações distintas utilizadas: 300 UI/ml, já utilizada anteriormente, e 500 UI/ml.

As variáveis utilizadas nessa etapa, tanto para as células cultivadas em tubo, quando para aquelas cultivadas em placa, foram:

- Células não diferenciadas
- Células diferenciadas, utilizando 300 UI/ml de citocinas
- Células diferenciadas, utilizando 500 UI/ml de citocinas

A avaliação daquelas variáveis foi feita por meio de citometria de fluxo. Após o término da diferenciação, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 humano conjugado a PE/Dazzle 594 (Biolegend), anti-CD209 humano conjugado a PE (Biolegend), anti-CD1a humano conjugado a APC (Biolegend) e anti-CD11c humano conjugado FITC (eBioscience), e fixadas com tampão FluoroFix (Biolegend) para posterior leitura.

3.4.2. Diferenciação de DCs

Após a padronização, as células na concentração de 5×10^5 /ml foram cultivadas com 1 ml de meio RPMI com SH e 500 U/ml de GM-CSF e IL-4 cada, em placas de 24 poços em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 2 dias, metade do volume do poço foi cuidadosamente retirado, e adicionou-se aos cultivos meio com 10% de SH e citocinas por 2x por mais dois dias. Como controle da diferenciação, dois poços não receberam citocinas.

3.5. INFECÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS COM A VACINA BCG (N=8)

Para a infecção das DCs imaturas após o dia 6 e no início da diferenciação, foram utilizados três lotes diferentes da vacina BCG (cepa Moreau), todas cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ). Cada um dos lotes possui concentração de bacilos distinta ($2,48 \times 10^6$, $6,86 \times 10^6$ e $9,82 \times 10^6$ UFC/ml) e todos se tratam de lotes previamente aprovados, tanto pela Fundação Atauilho de Paiva (FAP), a fabricante da vacina, quanto pelo próprio INCQS. As ampolas estavam liofilizadas, sendo reconstituídas em meio RPMI da seguinte forma: um lote (A) com

concentração intermediária ($6,86 \times 10^6$ UFC/ml) foi reconstituído em 1 ml (conforme recomendado pelo fabricante), um lote (B) com a concentração menor de bacilos ($2,48 \times 10^6$ UFC/ml) foi reconstituído em 2ml (no intuito de simular um lote reprovado por conter uma contagem de bacilos inferior a faixa permitida pelo controle de qualidade da vacina), enquanto um lote (C) com concentração maior ($9,82 \times 10^6$ UFC/ml) foi reconstituído em 0,5 ml (no intuito de simular um lote reprovado por conter uma contagem de bacilos superior a faixa permitida pelo controle de qualidade da vacina).

Além da comparação interlotes, 3 ampolas distintas de um mesmo lote, lote (A), foram utilizadas para testar a reprodutibilidade de um mesmo lote. Enquanto os demais (B e C) foram utilizados apenas em monoplicata. Todos os três lotes (A, B e C) foram utilizados em 4 concentrações distintas: 1:10, 1:20, 1:40 e 1:60 (Figura 9).

No intuito de se comparar uma possível diferença do bacilo atenuado vivo, com o morto, após se reconstituir uma ampola comercial (FAP) com 1 ml de meio, este lote (D) foi irradiado seguindo protocolo estabelecido no Laboratório de Imunologia Clínica (IOC). Além disso a partir desse mesmo lote irradiado a vacina foi subsequentemente aquecida (100°C por 3 minutos) e resfriada (-20°C por 3 minutos), sendo esse processo repetido por 3 vezes, no intuito de "destruir" moléculas do bacilo que mesmo morto pudessem servir como antígeno para as DCs. Este lote (D) foi utilizado apenas na concentração de 1:10 (Figura 9).

Além destas diferentes variáveis de infecção com BCG descritas acima, também foi utilizado como controle negativo DCs não estimuladas (DCs imaturas), bem como DCs estimuladas com LPS de *Escherichia coli* (026:B6) a $0,5\mu\text{g/ml}$ (Sigma- Aldrich) como controle positivo de maturação (Elkord et al., 2005) (Figura 9).

Para controle da diferenciação de monócitos em DCs, foi adicionado LPS na mesma concentração acima nos poços de contendo monócitos não diferenciados, além do cultivo sem estímulo.

Após os estímulos, BCG ou LPS, os cultivos permaneceram por 24 horas em 37°C e 5% CO_2 .

Figura 9: Esquema de placa de cultivo ilustrando as variáveis utilizadas nos experimentos.

	BCG LOTE A	BCG LOTE A	BCG LOTE A	BCG LOTE B	BCG LOTE C
Imatura	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
LPS	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
BCG Irrad	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
BGG Irrad e Aq.	1:60	1:60	1:60	1:60	1:60

Todos os poços contêm DCs após a diferenciação. LPS (0,5 µg/ml) e BCG Irradiada e BCG Irradiada e Aquecida (ambas do lote D) na concentração de 1:10. BCG lote A- $6,86 \times 10^6$ UFC/ml, BCG lote B- $2,48 \times 10^6$ UFC/ml e BCG lote C- $9,82 \times 10^6$ UFC/ml. Sedo o Lote A feito com 3 ampolas distintas (1 ampola para cada coluna).

Após as 24 horas, as células foram coletadas para marcações por citometria de fluxo, e os respectivos sobrenadantes coletados, onde parte foi submetido para contagem de bacilos (UFC), e outra parte foi armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

3.6. FENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO (N=8)

Após o tempo determinado, as células foram retiradas da placa ou dos tubos e lavadas e resuspendidas com meio RPMI para contagem e aferição da viabilidade celular conforme o item 3.2. Posteriormente, as células foram lavadas em solução tampão para citometria de fluxo (PBS com 0,01% de Azida sódica- NaN_3 e 0,1% de albumina sérica bovina).

As células foram submetidas a marcação com os seguintes anticorpos monoclonais anti-humanos: CD80 (B7-1) conjugado a Alexa 750 (Beckman Coulter), CD86 (B7-2) conjugado a APC (Biolegend), CD40 conjugado a APC-Cy7 (Biolegend), CD83 conjugado a FITC (Biolegend), CD1a conjugado a APC (Biolegend), CD209 (DC-SIGN) conjugado a PE (Biolegend), CD282 (TLR2) conjugado a PE (Biolegend), CD284 (TLR4) conjugado a PE (Biolegend), HLA-DR conjugado a Alexa 647 (Biolegend) e CD197 (CCR7) conjugado a Alexa 647 (Biolegend) (tabela 2). Como estratégia para não haver sobreposição de fluorescências, foram elaborados quatro grupos distintos de marcação. A

diluição dos anticorpos acima utilizados foi de 1:40 no mesmo tampão, e após sua adição, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro.

Tabela 2: Marcadores fenotípicos e suas respectivas funções

CD1a	Marcador fenotípico de uma subpopulação de DCs; Papel na ativação de células T; DCs CD1a ⁺ tem capacidade de produzir grandes quantidades de IL-12
CD209 (DC-SIGN)	Importante na interação com micobactérias para sua interiorização. Induz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e prejudica a maturação de DC
CD284 (TLR2)	Reconhecimento de PAMPs, principalmente de bactérias
CD282 (TLR4)	Ativado predominantemente por LPS
HLA-DR	MHC classe II, responsável pela apresentação de antígenos
CD 80 (B7-1)	Molécula co-estimulatória
CD 86 (B7-2)	Molécula co-estimulatória
CD 40	Molécula co-estimulatória
CD 83	Típico marcador de maturação de DCs
CD197 (CCR7)	Receptor de quimiocina envolvido na migração da DC

Após incubação as células foram lavadas no mesmo tampão, e fixadas com tampão FluoroFix para posterior aquisição no citometro de fluxo (FACSaria, Becton & Dickson Biosciences) da plataforma de citometria de Fluxo (PDTIS/FIOCRUZ). Foram adquiridos 10.000 eventos na região de interesse, e as marcações simples para compensação de fluorocromos foram feitas utilizando-se beads de calibração comercial (OneComp eBeads, eBioscience). A análise foi feita pelo programa FlowJo versão 10 (TreeStarR).

3.7. DETECÇÃO DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DOS CULTIVOS (N=8)

Os respectivos sobrenadantes de cultivo celular foram descongelados para a dosagem de citocinas por meio da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando-se kits comerciais para detecção de IL-10, IL-12, TNF- α , IL-1 α e IL-18 (RD Systems), seguindo-se as instruções do fabricante.

Os limites mínimos de detecção da curva para os ELISAs em pg/ml foram 3,91; 15,63; 29,23; 46,88; 7,81 e os limites máximos foram 500,00; 2.000,00; 2.000,00; 6.000,00; 1.000,00 para a IL-1 α , IL-12, IL-10, IL-18 e TNF- α , respectivamente.

3.8. DOSEAMENTO (N= 6)

Os sobrenadantes dos cultivos infectados foram submetidos a técnica de UFC, para o doseamento e comparação.

Inoculou-se 100 μ L dos sobrenadantes em cada tubo contendo meio Lowenstein-Jensen, sendo 3 tubos para cada variável (triplicata). O inóculo foi distribuído uniformemente por toda a superfície do meio e os tubos foram deixados na posição horizontal e ao abrigo da luz, durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25°C). Após esse tempo foram vedados com rolhas de silicone parafinadas e aquecidas em chama e, posteriormente incubados a 37°C ao abrigo da luz na posição vertical, durante 4 semanas. A contagem das colônias foi realizada com o auxílio de lente de aumento, avaliando-se o aspecto característico das colônias, aspecto rugoso e esbranquiçado. Depois da contagem, foi feita a média das triplicatas para chegar ao resultado final em UFC de cada variável.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados o teste de Wilcoxon (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test) para comparação entre os grupos. Para tal, foram empregados os programas GraphPad Prism e GraphPad InStat, nas versões 5.01 e 3.9, respectivamente (GraphPad software). As comparações foram consideradas significantes quando o p-valor teve um alpha menor ou igual a 5%.

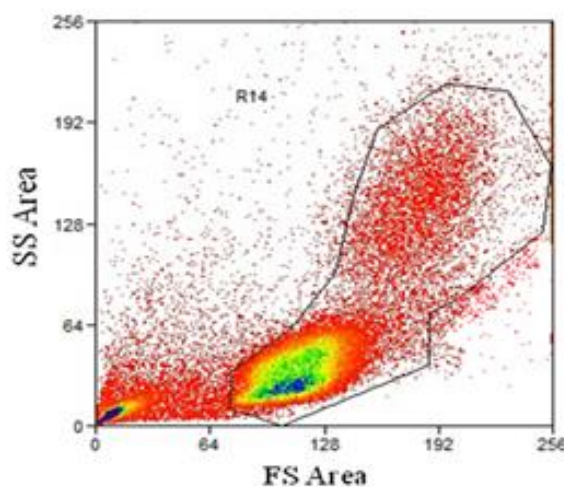
4. RESULTADOS

4.1. ENSAIO DE ISOLAMENTO DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

4.1.1 Purificação de monócitos por gradientes de densidade e agregação ao frio

O procedimento teste inicial para a separação de monócitos do sangue periférico foi feito em 3 etapas: (a) purificação das PBMCs pela técnica de gradiente de densidade de Ficoll, (b) enriquecimento de monócitos via técnica de agregação ao frio e, por último, (c) purificação de monócitos pela técnica de gradiente de Percoll (n=6). A avaliação da qualidade do procedimento foi feita por citometria de fluxo, e para isso, as células purificadas após cada uma das três etapas acima foram marcadas com anticorpos anti-CD14 humano conjugado a FITC e anti-CD3 humano conjugado a Alexa fluor 647, marcadores de monócitos e linfócitos T, respectivamente. Para análise da porcentagem de marcação, a fim de excluir os debris celulares, as populações de monócitos e linfócitos foram selecionadas com base no gráfico de morfologia, tamanho (*Forward-scattered* - FS) vs. granulosidade (*Side-scattered* - SS), e também a partir de um retogate feito para identificar as células marcadas com CD3 e CD14. Na etapa a, um gráfico e seus percentuais foram gerados (Figura 10 e tabela 2).

Figura 10: Perfil típico de um experimento representativo de morfologia de PBMCs



Morfologia de PBMCs separadas por gradiente de densidade de Ficoll, o qual foi feito um gate R14 na região onde se encontram os linfócitos (população mais abaixo, menor e menos granulosa) e monócitos (população mais acima, maior e mais granulosa).

Com o objetivo de reduzir o contaminante crítico de linfócitos, as PBMC foram subsequentemente submetidas à técnica de agregação ao frio (etapa b). Com isso, a agregação ao frio possibilitou um aumento significativo da porcentagem de monócitos CD14⁺; porém, a porcentagem média de linfócitos CD3⁺ permaneceu alta, acima de 50% (Tabela 2).

Como último passo na purificação (etapa c), as células foram subsequentemente submetidas a separação por gradiente de densidade de Percoll. Essa última técnica possibilitou uma redução significativa da porcentagem de linfócitos CD3⁺, bem como consequente aumento significativo da porcentagem de monócitos CD14⁺, quando comparados às etapas b e c (Tabela 2).

Tabela 3 – Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) do percentual de marcação de CD14 e CD3 na avaliação do isolamento de monócitos por agregação ao frio e gradiente de Percoll (n=6)

	CD3 ⁺	CD14 ⁺
Pós Ficoll (etapa a)	61,7 ± 5,3	6,8 ± 2,2
Pós Cold (etapa b)	56,8 ± 9,3	16,1 ± 6,2 *
Pós Percoll (etapa c)	21,7 ± 10,8 *	48,4 ± 17,7 *

Percentual de células CD3⁺ e CD14⁺ dentro do gate de PBMCs (R14, figura 10); * $p \leq 0,05$, quando comparado as PBMCs (etapa a)

Apesar dessa redução de linfócitos nessa última etapa, a pureza da amostra na obtenção de monócitos variou bastante entre os indivíduos testados, como mostra o desvio padrão, e apesar da significativa redução de linfócitos, o enriquecimento obtido não atingiu em média, um total maior que 50% de monócitos. Além disso, houve uma perda considerável da viabilidade das células, quando as mesmas foram observadas ao microscópio utilizando uma solução de marcação com corante vital, tendo essa sido em torno de 50% após todo o processo de isolamento e enriquecimento.

A partir desses resultados, uma nova tentativa de purificação foi feita, trocando-se a última etapa c, por repetição da etapa b (b2, n=3) no intuito de aumentar o enriquecimento de monócitos e melhorar a viabilidade celular. Entretanto, ao contrário do que se esperava, a segunda agregação ao frio resultou em uma perda de aproximadamente 5% na população de células CD14⁺ (Tabela 3).

Tabela 4 - Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD14 e CD3 na avaliação do isolamento de monócitos por duas etapas de agragação ao frio (n=3)

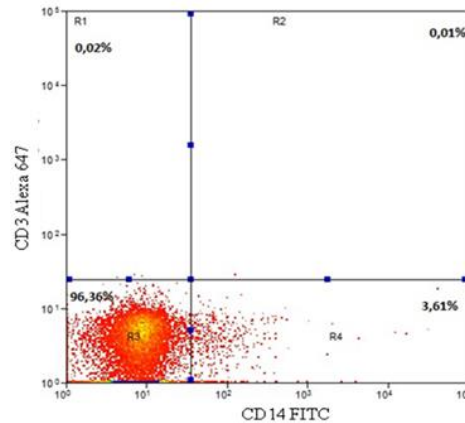
	CD3⁺	CD14⁺
Pós 1^a Cold (etapa b)	22,0 ± 0,4	10,0 ± 3,8
Pós 2^a Cold (etapa b2)	16,4 ± 4,9	4,6 ± 0,7

Tendo em vista a necessidade de uma melhor pureza da população de monócitos, uma nova técnica de separação também foi testada: A purificação por sorting via citometria de fluxo, a partir de sangue venoso total. Para isso, foi utilizado o equipamento Cell Sorter (MOFLO ASTRIOS, BC) da plataforma de citometria de fluxo (IOC/ FIOCRUZ).

4.1.2. Separação de monócitos por citometria de fluxo

Como descrito na seção 3.3.1.2, para avaliação do sorting após a separação, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14 humano conjugado a FITC e anti-CD3 humano conjugado a Alexa fluor 647 (Figura 11). Assim, pode-se concluir que, apesar da redução significativa da população CD3⁺, não foi possível melhorar a pureza neste experimento único representativo, pois apenas 3,61% das células obtidas eram monócitos CD14⁺. Possivelmente, essa população separada, dupla negativa, seria potencialmente de granulócitos.

Figura 11: Dotplot das células pós sorting positivo

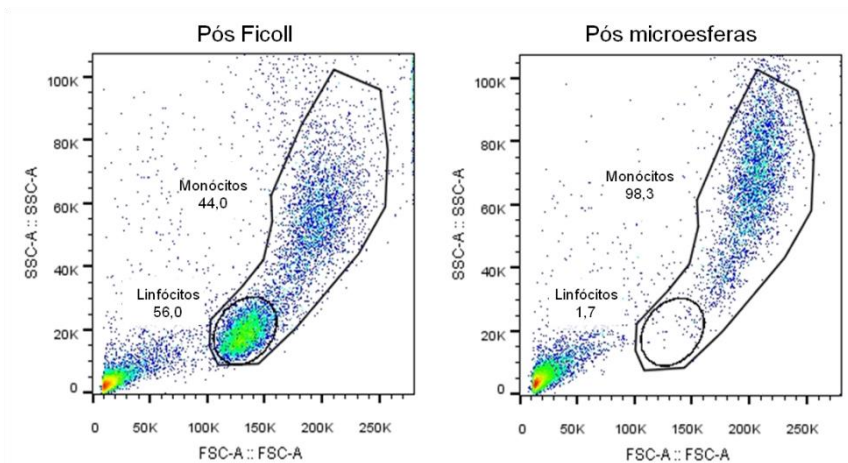


As porcentagens de células marcadas e não marcadas como os anticorpos anti-CD14 humano conjugado a FITC e/ou anti-CD3 humano conjugado a Alexa fluor 647 estão indicadas em cada quadrante, onde R1 representa a região positiva para CD3, R4 positiva para CD14, R2 dupla positiva e R3 dupla negativa.

4.1.3. Separação de monócitos por microesferas magnéticas

A próxima tentativa para padronização da separação de monócitos foi realizada através da técnica de microesferas magnéticas. Nessa, técnica foi possível obter uma amostra mais homogênea contendo predominantemente monócitos. Isso foi demonstrado pela avaliação da purificação onde uma alíquota de PBMC foi adquirida no citometro de fluxo e as populações de monócitos e linfócitos presentes antes e após a purificação foram analisadas (Figura 12). Essa avaliação foi feita como base no gráfico de morfologia, FS vs. SS.

Figura 12: Perfis morfológicos típicos de experimento representativo de purificação de monócitos por microesferas magnéticas



(A) Células após separação do PBMC e antes do isolamento por microesferas, e (B) após purificação de monócitos pelo uso das microesferas. Os indicam o percentual de cada população (monócitos e linfócitos) considerando a região de PBMCs como total (100%)

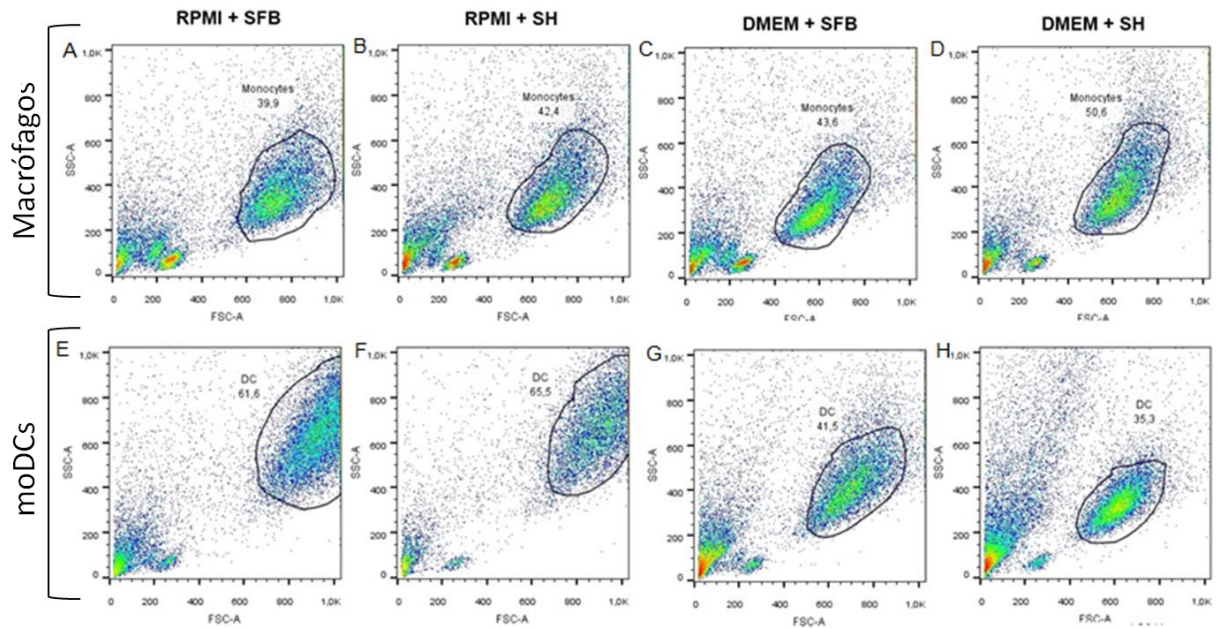
4.2. DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITO EM DC

Após padronizarmos a metodologia para obtenção de monócitos provenientes de buffy-coats, iniciamos a definição e padronização do melhor método para diferenciação e cultivo de células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs).

4.2.1. Avaliação do meio para cultivo (n=3)

A partir de dos monócitos isolados pelas técnicas de gradiente de densidade de Ficoll-Histopaque e aderecia foi feito a avaliação do melhor meio de cultivo e difereciação das células. Baseado no resultado da comparação de morfologia das células não diferenciadas (monócitos) e diferenciadas (moDCs) após o cultivo em diferentes meios de cultura (RPMI e DMEM), citocinas (conceitração de 300 e 500 UI/ml cada - GM-CSF e IL-4) e soro (SFB e SH), , pudemos observar uma clara diferença entre as moDCs e os monócitos, pois as moDCs geralmente se apresentam em forma de células maiores e mais granulosas do que os monócitos (Figura 13). Além disso, também houve uma diferença interindividual marcante entre o mesmo grupo de moDCs, quando comparamos os diferentes tipos meio de cultivo utilizados. Assim, as células diferenciadas em DMEM apresentaram uma morfologia mais semelhante aos monócitos, quando comparadas aquelas diferenciadas em RPMI (Figura 13).

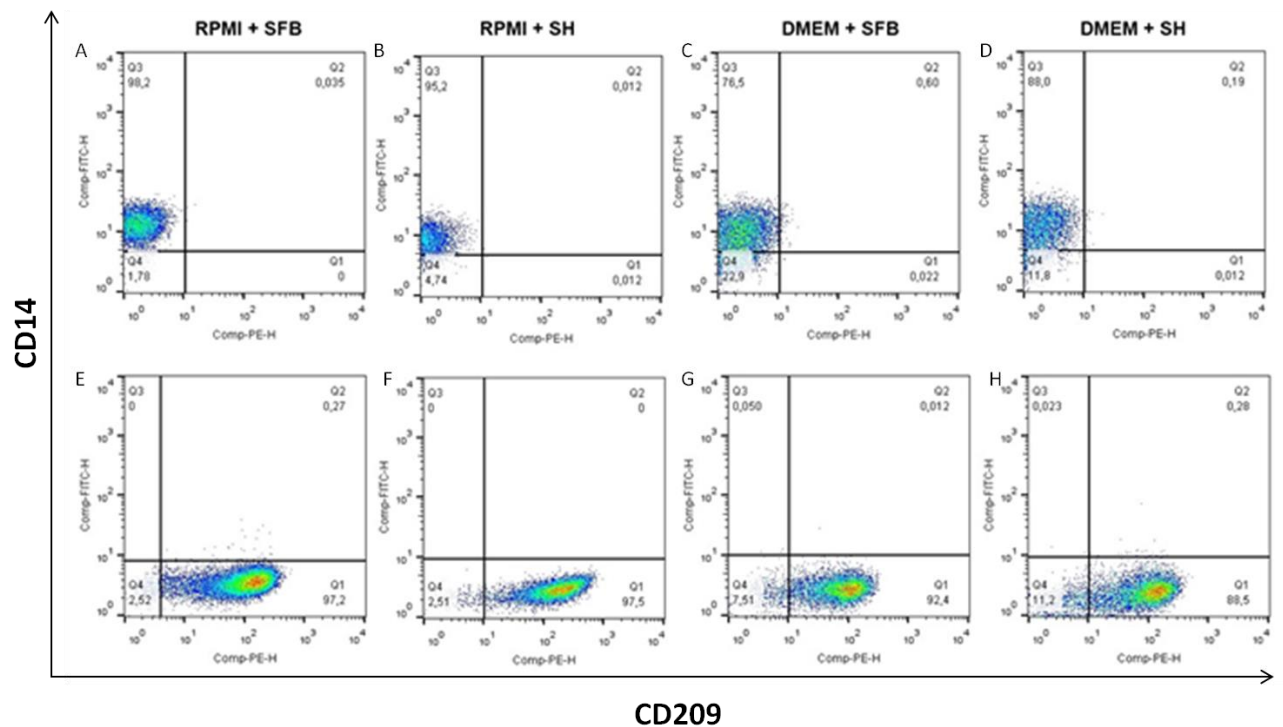
Figura 13: Perfis morfológicos típicos de experimento representativo com monócitos não diferenciados e moDCs



Monócitos não diferenciados (A-D) e monócitos diferenciados em DCs (E-H) em diferentes condições de cultivo: A, B, E, F utilizado meio RPMI, e C, D, G, H utilizado meio DMEM. Em A, C, E, G utilizado SFB, e B, D, F, H utilizado SH. Os monócitos foram cultivados apenas em meio completo (meio + 10% de soro) enquanto as moDCs foram cultivadas em meio completo com adição de citocinas (IL-4 e GM-CSF na concentração de 300 UI/ml cada), sendo o meio de ambas as culturas renovado no terceiro dia, com o tempo total de 5 dias de cultivo (n=3).

Quando analisada a expressão de CD14 (expresso principalmente por monócitos) e CD209 (DC-SIGN expresso principalmente por DCs), a diferença entre os tipos de meio de cultivo utilizados não foi tão evidente quanto a morfologia. Entretanto, pudemos observar que as moDCs cultivadas em RPMI tiveram uma expressão um pouco maior de CD209 do que as células cultivadas em DMEM, conforme visto nos percentuais obtidos (RPMI + SFB 97,2%, RPMI + SH 97,5%, DMEM + SFB 92,4% e DMEM + SH 88,5%) (Figura 14).

Figura 14: Dotplots de CD14 x CD209 de um experimento representativo de monócitos não diferenciados e moDCs – Comparação de meio de cultivo



Monócitos não diferenciados (A-D) e monócitos diferenciados em DCs (E-H) em diferentes condições de cultivo: A, B, E, F utilizado meio RPMI, e C, D, G, H utilizado meio DMEM. Em A, C, E, G utilizado SFB, e B, D, F, H utilizado SH. Eixo Comp-FITC representa marcação com anti-CD14 e eixo Comp-PE a marcação com anti-CD209. Os monócitos foram cultivados apenas em meio completo (meio + 10% de soro) enquanto as moDCs foram cultivadas em meio completo com adição de citocinas (IL-4 e GM-CSF na concentração de 300 UI/ml cada), sendo o meio de ambas as culturas renovado no terceiro dia, com o tempo total de 5 dias de cultivo.

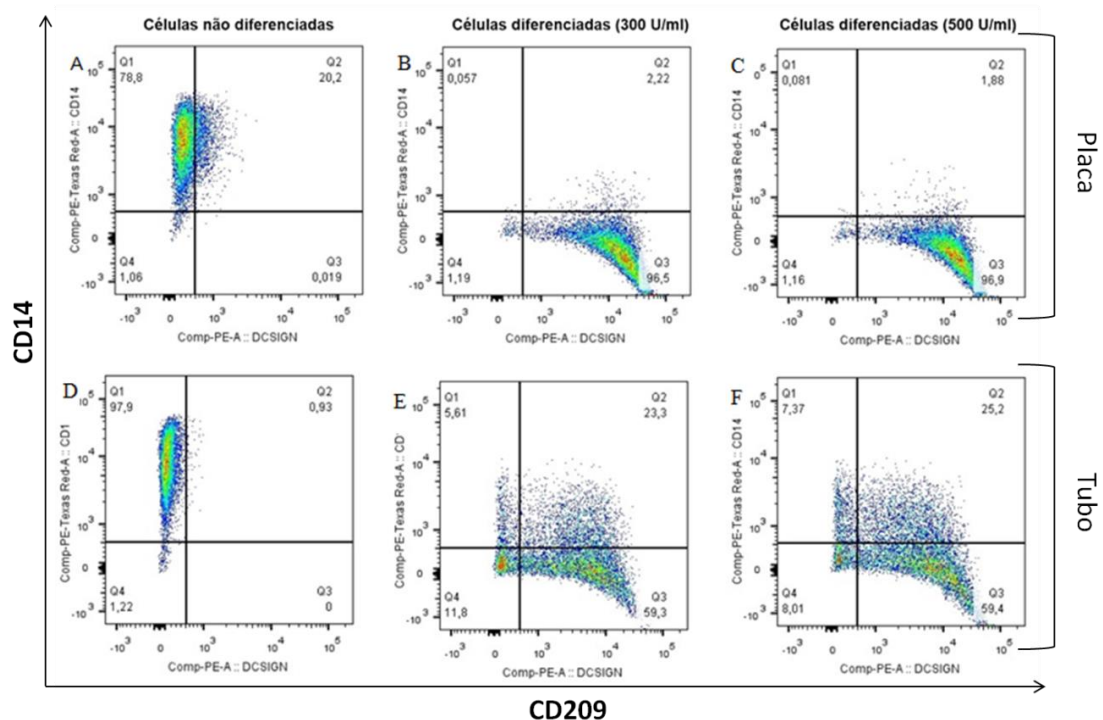
Dentro das nossas condições experimentais, foi eleito o meio RPMI como o melhor para o cultivo das células. Analisou-se em paralelo o tipo de soro utilizado, SFB ou SH, e não observamos grandes diferenças entre eles (Figuras 13 e 14). As células cultivadas em ambos apresentaram a morfologia esperada (Figura 13) e boa diferenciação (Figura 14). Entretanto, optamos pelo uso de SH para evitar possíveis interferências na ativação das DCs pelo SFB.

4.2.2. Avaliação da utilização de tubo ou placa para o cultivo e diferenciação das células (n=3)

Vem se levantado uma hipótese de provável diferença em cultivos primários realizados por métodos clássicos (adesão em placa), com aqueles realizados em suspensão, em trabalhos anteriores de colaboração do laboratório. Dando continuidade a este estudo e utilizando monócitos isolados por microesferas magnéticas e 2 concentrações distintas de citocinas

(próxima seção), observou-se aqui que a diferenciação de DCs em placa se mostrou mais eficiente quando comparada ao tubo, e isso pode ser comprovado principalmente pelo aumento no percentual de células CD209⁺, com uma consequente diminuição da expressão de CD14, independente das concentrações de citocinas utilizadas (Figura 15). Os resultados compilados de 2 experimentos estão mostrados na tabela 4. Devido ao melhor resultado em placa, adotamos a diferenciação em placa para as próximas etapas.

Figura 15: Dotplots de CD14 x CD209 de um experimento representativo de monócitos não diferenciados e moDCs – Comparação tubo e placa



Monócitos não diferenciados (A e D) e monócitos diferenciados em DCs (B e C, E e F) utilizando duas concentrações de GM-CSF e IL-4 distintas: 300 UI/ml (B e E) e 500 UI/ml (C e F). Os cultivos foram realizados em paralelo tanto em placas (A-C) quanto em tubos (D-F). Gráficos obtidos após a seleção da população celular a partir da morfologia característica das mesmas, a fim de se excluir os debrís celulares. O quadrante Q1 representa as células positivas para CD14, Q2 dupla positiva para CD14 e CD209, Q3 positivas para CD209 e Q4 dupla negativa, e o número abaixo do nome do quadrante representa o percentual de células positivas. Gráficos representativos de um doador do total de 3

Tabela 5- Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD209 e CD14 na avaliação de placa e tubo para a diferenciação em moDCs (n=2)

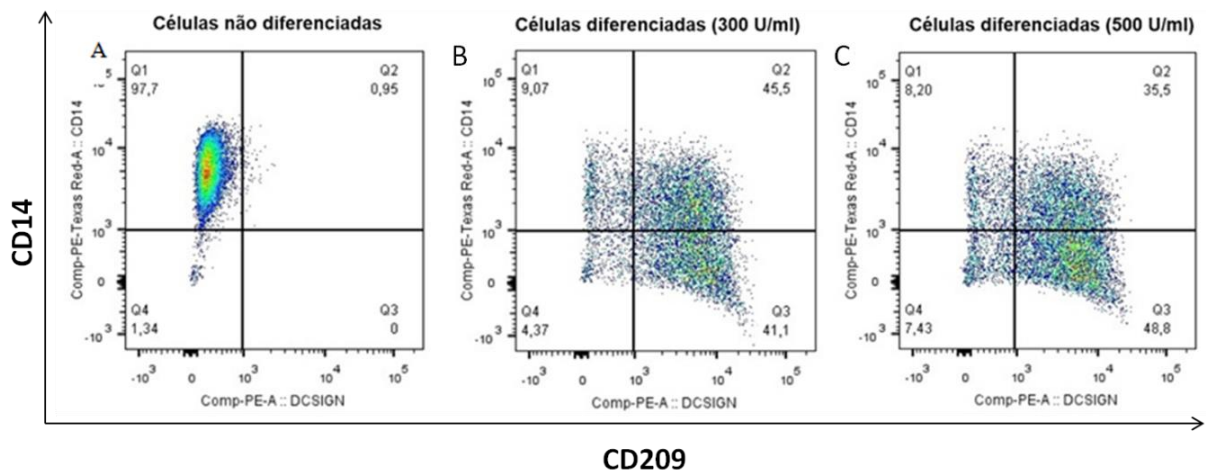
	Sem citocinas		Citocinas 300UI/ml		Citocinas 500UI/ml	
	CD209 ⁺	CD14 ⁺	CD209 ⁺	CD14 ⁺	CD209 ⁺	CD14 ⁺
Placa	3,7 ± 3,6	93,4 ± 7,4	97,1 ± 2,1	2,7 ± 0,6	97,1 ± 1,1	2,3 ± 0,5
Tubo	1,5 ± 0,8	97,6 ± 1,7	81,5 ± 1,6	26,7 ± 3,1	85,9 ± 1,7	30,9 ± 2,3

4.2.3. Avaliação da concentração de citocinas utilizadas para a diferenciação das células

Ao se comparar as duas concentrações de citocinas utilizadas, 300 e 500 UI/ml, ambas se mostraram eficientes para os 3 doadores, pois houve um aumento de expressão de CD209 e uma concomitante diminuição de CD14 em ambas as concentrações empregadas (Figura 16 e tabela 5).

Todavia, um dos doadores (doador 3) se destacou e não apresentou resultado semelhante aos demais, pois exibiu uma menor diminuição de CD14 e um menor aumento de CD209 (tabela 5). Além disso, o mesmo mostrou uma melhor eficiência na diferenciação de DCs quando utilizadas as concentrações de 500UI/ml, comparado a 300UI/ml, onde a maior concentração resultou em uma redução de cerca de 10% a mais de CD14 neste doador quando comparado aos resultados obtidos com a menor concentração (Figura 16 e tabela 5). Devido a esse fato, optou-se pelas concentrações de 500UI/ml por apresentar melhor diferenciação de maneira geral, incluindo as células do doador menos responsivo.

Figura 16: Dotplots de CD14 x CD209 em células não diferenciadas e diferenciadas com 300UI/ml e 500 UI/ml de GM-CSF e IL-4



Monócitos não diferenciados (A) e monócitos diferenciados em DCs de um doador pouco responsivo, utilizando duas concentrações de GM-CSF e IL-4 distintas: 300 UI/ml (B) e 500 UI/ml (C). Gráficos obtidos após a seleção da população celular a partir da morfologia característica das mesmas, a fim de se excluir os debrís celulares, e o cultivo feito em placa. O quadrante Q1 representa as células positivas para CD14, Q2 dupla positiva para CD14 e CD209, Q3 positivas para CD209 e Q4 dupla negativa, e o número abaixo do nome do quadrante representa o percentual de células positivas.

Tabela 6- Expressão de CD209 e CD14 na avaliação da concentração de citocinas utilizadas para a diferenciação das células (n=3)

	Sem citocinas		Citocinas 300UI/ml		Citocinas 500UI/ml	
	CD209 ⁺	CD14 ⁺	CD209 ⁺	CD14 ⁺	CD209 ⁺	CD14 ⁺
Doador 1	1,1	98,6	98,6	2,3	97,8	1,9
Doador 2	6,3	88,1	95,6	3,2	96,3	2,6
Doador 3	0,95	98,6	86,6	54,6	84,3	43,7

4.3. IMUNOFENOTIPAGEM

Após a etapa de padronização para a diferenciação e cultivo das DCs iniciou-se a avaliação da expressão de moléculas de superfície CD14, CD1a, CD209, CD83, CD40, CD80, CD86, TLR4 e 2, CCR7 e HLA-DR (n=8)

4.3.1. Marcadores pan de superfície de moDCs

Foi avaliada a expressão das moléculas CD14, CD209 e CD1a na superfície das células diferenciadas (moDCs) e não diferenciadas (macrófagos) (n=8) (tabela 6). Pode-se observar que houve um aumento significativo da expressão de CD209 nas células diferenciadas em DCs quando comparadas as células não diferenciadas, notando-se que após diferenciação cerca de 90% das células passaram a expressar este receptor nos oito doadores analisados. Simultaneamente, o inverso ocorreu com a expressão de CD14 nessas células, também de forma significativa representando uma perda de cerca de 75% desse receptor pan de monócitos. Já a expressão de CD1a foi baixa em ambos os tipos celulares, não sofrendo alteração significativa em sua expressão após diferenciação em moDCs.

Tabela 7 - Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD1a, CD209 e CD14 (n=8)

	CD1a ⁺	CD209 ⁺	CD14 ⁺
Macrófago	2,0 ± 3,0	2,0 ± 1,5	78,1 ± 10,0
DC	1,9 ± 2,6	90,3 ± 6,8*	2,6 ± 4,8*

*p < 0,05, quando comparado as células não diferenciadas

Com esse resultado podemos concluir que, dentre as moléculas testadas, os melhores marcadores para diferenciar DC de macrófagos foram CD209 e CD14, respectivamente.

4.3.2. Marcadores de ativação e maturação de moDCs

Os marcadores CD83, TLR4 e 2, CCR7 apresentaram percentual de marcação baixa e não apresentaram alterações significativas em suas expressões (tabela 7).

Tabela 8 - Média e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$) da porcentagem de marcação de CD83, TLR4 e 2, CCR7 (n=8)

	CD83⁺	TLR2⁺	TLR4⁺	CCR7⁺
Macrófago	0,24 ± 0,16	0,46 ± 0,57	0,09 ± 0,06	4,09 ± 3,92
Macrófago + LPS	0,22 ± 0,26	1,57 ± 2,28	0,15 ± 0,12	6,18 ± 5,57
moDC imatura	0,07 ± 0,05	0,14 ± 0,15	1,42 ± 2,58	2,35 ± 2,26
moDC + LPS	0,16 ± 0,24	0,10 ± 0,04	2,63 ± 5,47	2,08 ± 2,30

Alterações significativas também não foram vistas nas moDCs infectadas com BCG, mantendo percentuais de marcação semelhantes aos controles negativo (moDC imatura) e positivo (DC + LPS). Devido a esses resultados, a partir deste subcapítulo os dados apresentados não incluíram esses quatro marcadores e sim CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) e HLA-DR (MHC classe II).

Inicialmente analisamos comparativamente macrófagos versus moDCs (comparação de diferenciação) e as células imaturas (macrófago ou moDC) versus células estimuladas com LPS (macrófago + LPS ou moDC + LPS) (comparação de maturação).

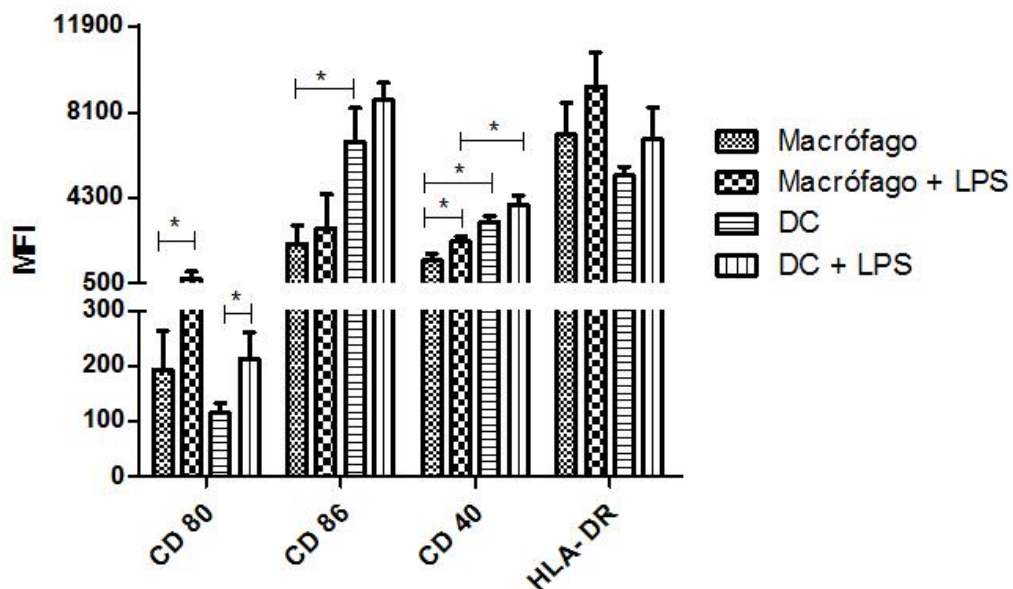
A partir dos resultados obtidos, pode-se observar um aumento significativo da intensidade mediana de fluorescência (MFI) de CD80 nas células estimuladas quando comparadas as não estimuladas, tanto em macrófagos (p= 0,0313) quanto em moDCs (p= 0,0547) (maturação). Entretanto a mesma diferença não foi obtida no processo de diferenciação de monócitos em DCs (macrófagos x DCs), embora tenha sido observada uma tendência de redução da expressão de CD80 quando as células foram diferenciadas. (Figura 16).

Já com relação a MFI de CD86, o oposto pode ser observado, ou seja, houve um aumento significativo apenas na comparação entre os diferentes tipos celulares (macrófago e moDC; p= 0,0469) e não entre células não estimuladas e estimuladas com LPS. (Figura 16).

CD40 apresentou um aumento significativo tanto na comparação entre macrófagos não estimulados e estimulados ($p= 0,0313$), quanto entre macrófagos e moDCs não estimulados ($p= 0,0156$) e estimulados ($p= 0,0313$). Entretanto não houve diferença significativa entre moDC imatura e maturada (Figura 16).

Por fim HLA-DR, não apresentou nenhuma alteração significativa tanto na comparação de diferenciação quanto de maturação, embora tenha sido observada uma tendência de aumento da expressão quando as células (macrófagos ou moDCs) foram estimuladas com LPS (Figura 16).

Figura 17: Intensidade mediana de fluorescência (MFI) de CD 80, CD 86, CD 40 e HLA-DR



Macrófagos (monócitos em cultura por 6 dias), macrófagos + LPS (no 5º dia da cultura adicionado x de LPS por 24 horas), moDC (moDC imaturas geradas a partir de monócitos pela adição de GM-CSF e IL-4), moDC + LPS (no 5º dia da cultura, após diferenciação em DC, adicionado x de LPS por 24 horas) (n=8) * $p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon

4.3.3. Infecção com BCG

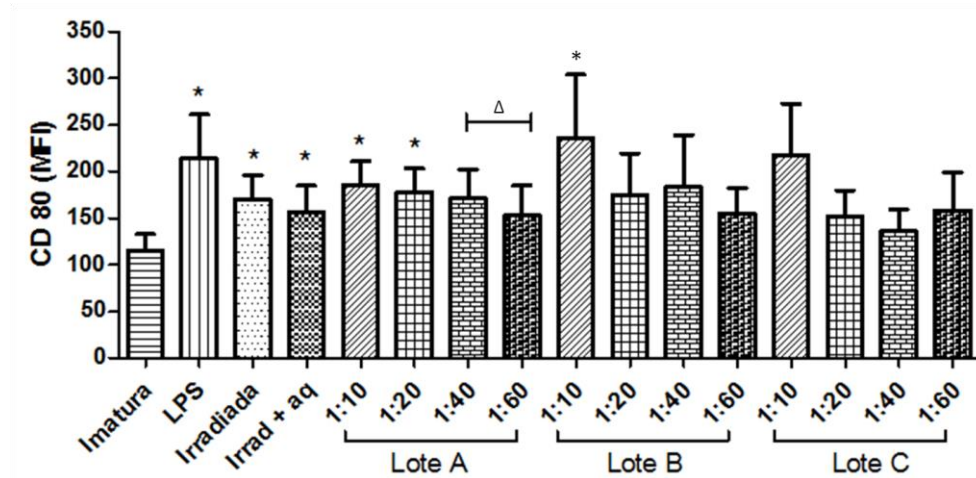
As moDCs imaturas obtidas foram infectadas com BCG irradiada, irradiada e aquecida ou um dos três lotes distintos nas doses descritas na seção 3.5, recuperadas 24 horas pós-infecção e a detecção da expressão dos marcadores de ativação CD80, CD86, CD40 e HLA-DR foi realizada através de citometria de fluxo.

Na figura 18, observamos o perfil de expressão do marcador de ativação CD80. De acordo com a figura, a BCG irradiada ($\bar{X}=170,1$), irradiada e aquecida ($\bar{X}=156,4$), o lote A nas

diluições 1:10 (\bar{X} =186,0) e 1:20 (\bar{X} =177,6) e o lote B na diluição 1:10 (\bar{X} =235,9) induziram um aumento significativo na expressão do marcador CD80 quando comparadas a DCs imaturas (\bar{X} =115,2). Com relação a comparação das células infectadas com BCG e estimuladas com LPS, não foi observado, para os mesmos doadores, uma alteração significativa da expressão dessa molécula. O mesmo foi observado quando comparado os três lotes (A, B e C) com as vacinas irradiada e irradiada e aquecida, com exceção da comparação BCG irradiada (\bar{X} =170,1) e Lote C na diluição 1:40 (\bar{X} =135,9) que apresentou uma diminuição significativa ($p = 0,0156$) (não representado no gráfico – figura 17).

Já a comparação intralote, apenas o Lote A na diluição 1:60 (\bar{X} =152,9) apresentou diminuição quando comparado a diluição 1:40 (\bar{X} =170,7; $p = 0,0547$) (Figura 17). Apesar de não significativo na maioria das variáveis, podemos observar que o lote A apresentou uma diminuição da MFI de CD80 proporcional nas diluições feitas, ou seja, quanto maior a diluição menor foi a expressão de CD80, o que não ocorreu nos lotes B e C. Por fim, a comparação interlote, onde o lote A (considerado aprovado) figurou como padrão em relação aos lotes B (considerado reprovado por baixa UFC) e lote C (considerado reprovado por alta UFC), não demonstrou no caso deste marcador de superfície uma alteração estatisticamente significativa. Entretanto, uma tendência a um aumento na diluição 1:10 em ambos lotes B e C em relação ao lote A pode ser notada.

Figura 18: MFI de CD80



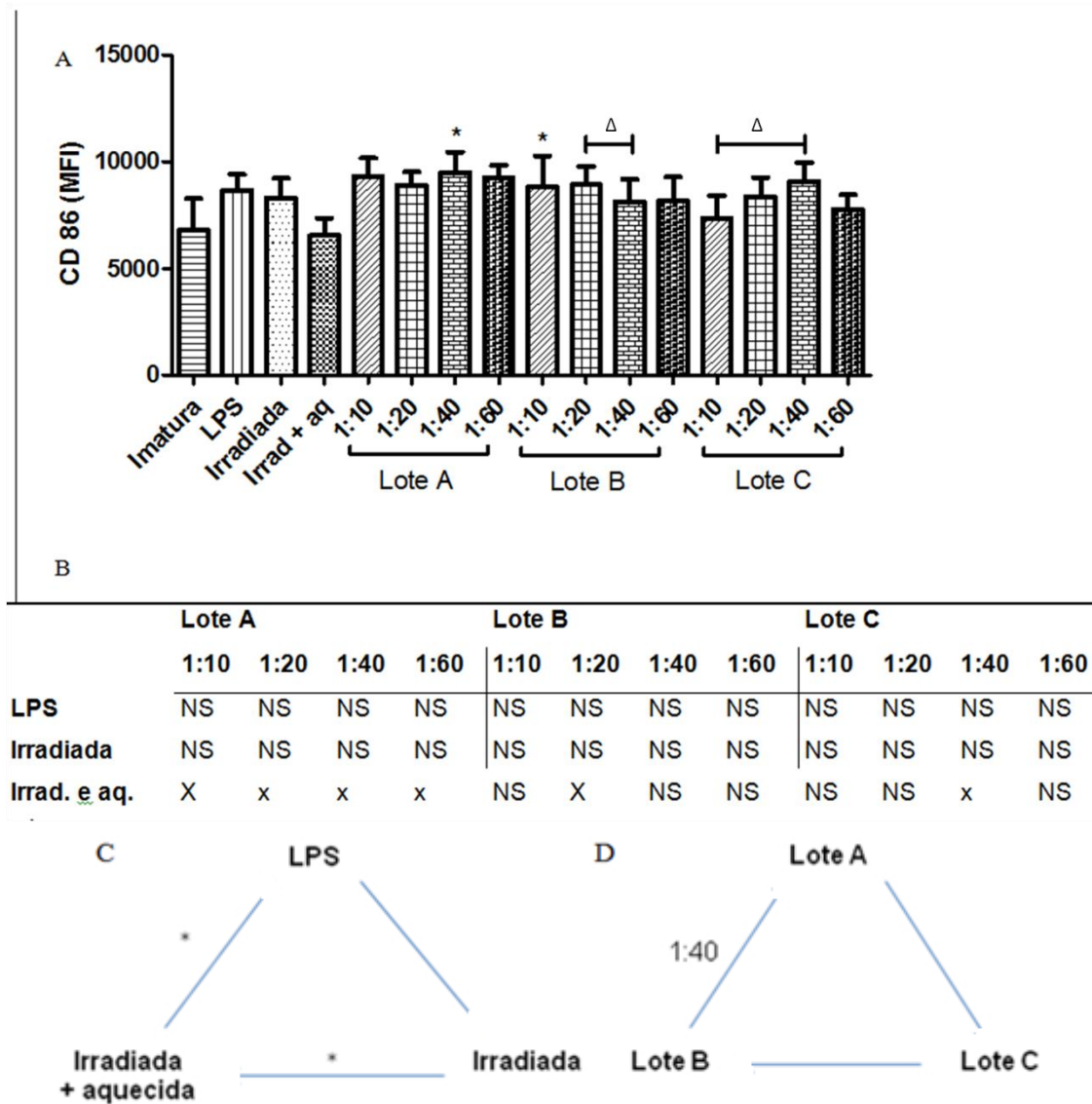
moDCs infectadas por 24 horas com diferentes lotes e concentrações de BCG (n=8), sendo o lote A (lote aprovado) com $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B (lote reprovado com baixa UFC) com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C (lote reprovado com alta UFC) com $19,64 \times 10^6$ UFC. * comparação estatisticamente signigicante ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon), sendo * acima do desvio representando a comparação como grupo DC imatura e Δ acima das barras as comparações intralote.

Com relação a expressão de CD86, como mostra a figura 19 A, observou-se que as moDCs infectadas com o Lote A na diluição 1:40 ($\bar{X}=9240,7$, $p=0,0469$) e o Lote B na diluição 1:10 ($\bar{X}=8793,1$; $p=0,0469$) apresentaram um aumento significativo da MFI quando comparadas as moDCs imaturas ($\bar{X}=6779,6$). Além disso, não houve proporcionalidade entre a expressão dessa molécula e as diluições utilizadas em nenhum dos três lotes.

Apesar de poucas variáveis apresentarem diferença quando comparadas as moDC imaturas, algumas apresentaram diferença significativa frente as células infectadas com BCG irradiada e aquecida ($\bar{X}=6534,1$) (Figura 19B), são elas: LPS ($\bar{X}=8638,1$; $p=0,0313$), irradiada ($\bar{X}=8307,1$; $p=0,0547$), lote A 1:10 ($\bar{X}=9309,1$; $p=0,0313$), lote A 1:20 ($\bar{X}=8897,5$; $p=0,0156$), lote A 1:40 ($\bar{X}=9240,7$; $p=0,0078$), lote A 1:60 ($\bar{X}=9493,9$; $p=0,0156$), lote B 1:20 ($\bar{X}=8905,0$; $p=0,0391$), lote C 1:40 ($\bar{X}=9052,0$; $p=0,0234$) (Figura 19C). Embora a média do grupo de moDCs infectadas com BCG irradiada e aquecida tenha sido semelhante ao grupo de moDCs imaturas, o ultimo apresentou uma alta variação inter-grupo.

Quando comparados os 3 lotes de BCG (A, B e C), comparação interlote, apenas lote B na diluição 1:40 ($\bar{X}=8116,6$) apresentou uma redução significativa quando comparado ao lote A na mesma diluição ($\bar{X}=9240,7$; $p=0,0391$) (Figura 19D). E por fim as comparações intralotes apenas apresentaram significancia estatística o lote B 1:20 ($\bar{X}=8905,0$) com 1:40 ($\bar{X}=8116,6$; $p=0,0156$) e lote C 1:10 ($\bar{X}=7338,0$) com 1:40 ($\bar{X}=9052,0$; $p=0,0469$) (Figura 19A).

Figura 19: MFI de CD86



moDCs infectadas por 24 horas com diferentes lotes e concentrações de BCG (n=8); A) Gráfico representando média e desvio padrão das MFIs dos grupos estudados, sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. * comparação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon), sendo * acima do desvio representando a comparação como grupo moDC imatura Δ acima das barras as comparações intralote. B) Tabela de Comparação estatística entre colunas (LPS, Irradiada, Irradiada e aquecida) versus linha (Lotes A, B e C nas 4 diluições), onde x é estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon) e NS é não significativo ($p > 0,05$, pelo teste de Wilcoxon). C) Representação da comparação entre os grupos de DC estimuladas com LPS, infectadas com BCG irradiada e BCG irradiada e aquecida, onde * representa diferença significativa ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon). D) Representação das comparações interlotes, onde apenas as diluições que apresentaram diferença significativa entre os lotes estão descritas.

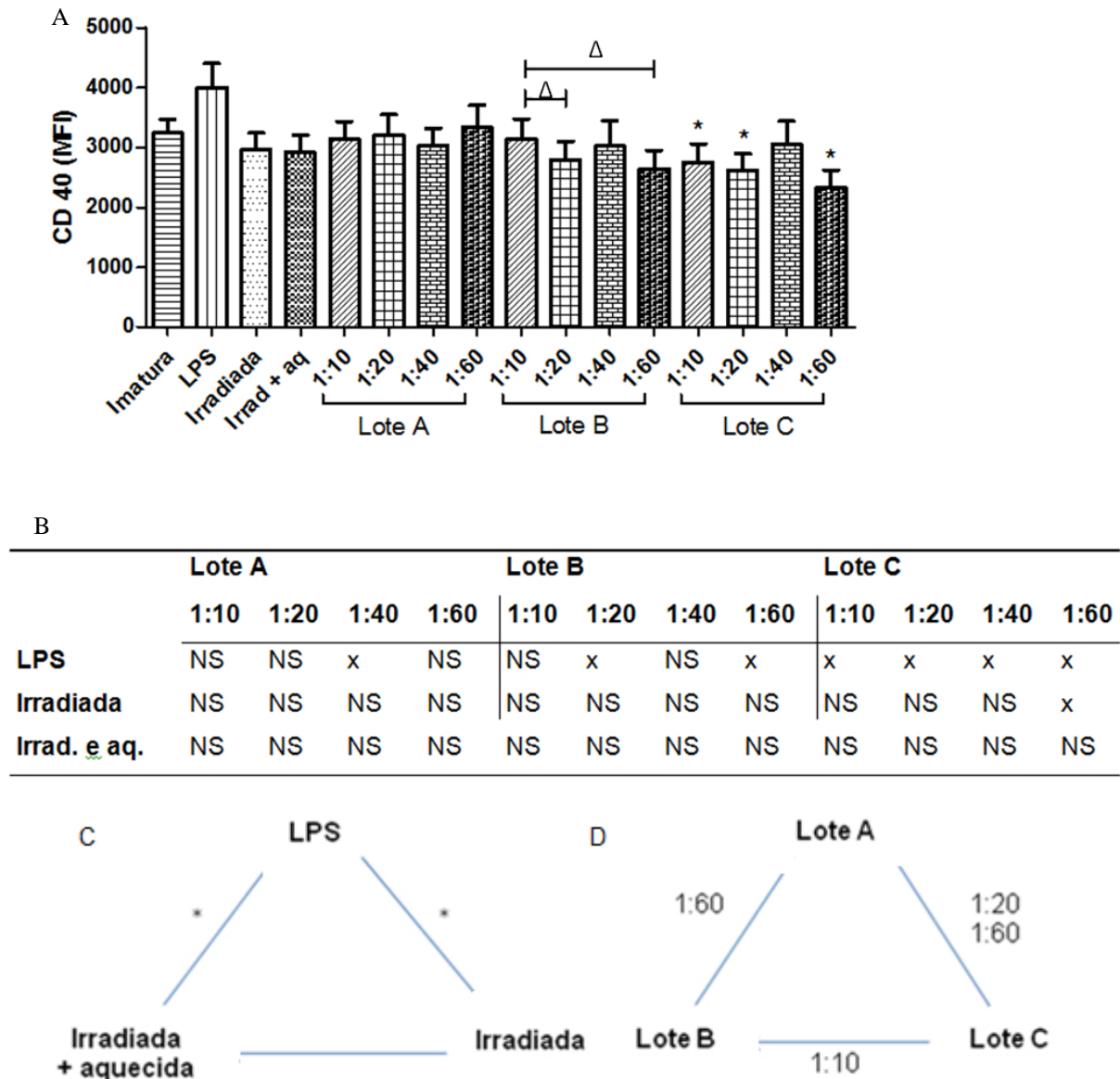
A expressão de CD40 também diferiu dos resultados de CD80 e 86, como mostra a figura 20. Nenhuma variável apresentou aumento significativo da expressão de CD40 quando comparada as moDCs não estimuladas (imaturas) ($\bar{X}=3240,7$), apesar das células estimuladas com LPS ($\bar{X}=4001,8$) mostrarem uma tendência a aumentar a expressão deste receptor, essa elevação ainda não foi significativa estatisticamente ($p = 0,1094$). Entretanto, as variáveis 1:10

(\bar{X} =2754,4), 1:20 (\bar{X} =2623,9) e 1:60 (\bar{X} =2321,6) do lote C mostram uma redução significativa quando comparadas as moDCs imaturas (Figura 20A).

Quando comparamos as moDCs infectadas com BCG com as estimuladas com LPS (\bar{X} =4001,8) observamos uma redução significativa de MFI de CD40 nas seguintes variáveis: irradiada (\bar{X} =2959,6; $p = 0,0313$), irradiada e aquecida (\bar{X} =2917,4; $p = 0,0156$), lote A 1:40 (\bar{X} =3028,6), lote B 1:20 (\bar{X} =2796,9; $p = 0,0469$) e 1:60 (\bar{X} =2642,6 $p = 0,0313$), lote C nas diluições 1:10 (\bar{X} =2754,4; $p = 0,0313$), 1:20 (\bar{X} =2623,9; $p = 0,0156$) e 1:60 (\bar{X} =2321,6; $p = 0,0156$, Figura 20B). A comparação entre os 3 lotes de BCG e a BCG irradiada e a irradiada e aquecida, apenas a comparação entre irradiada (\bar{X} =2959,6) e o lote C na diluição 1:60 (\bar{X} =2321,6; $p = 0,0469$) apresentou uma diminuição significativa.

Já as comparações intralote, foram estatisticamente significativas com relação a expressão de CD40: o lote B na diluição 1:10 (\bar{X} =3149,6) com a diluição 1:20 (\bar{X} =2796,9; $p = 0,0391$) e com a diluição 1:60 (\bar{X} =2642,6 ; $p = 0,0156$) (Figura 20A). E por fim a comparação interlote, o lote A (\bar{X} =3204,9) com lote C (\bar{X} =2623,9; $p = 0,0156$) na diluição 1:20, lote A na diluição 1:60 (\bar{X} =3341,4) com lote B (\bar{X} =2642,6; $p = 0,0313$) e C (\bar{X} =2321,6; $p = 0,0469$) (Figura 20C). Com esses resultados observa-se que a diluição que apresentou diferença entre o lote aprovado A e os lotes reprovados B e C foi 1:60 e em uma comparação intralote o lote B apresentou diferença em algumas variáveis, mas novamente não houve proporcionalidade entre o número de UFC/ diluições e o MFI da molécula testada.

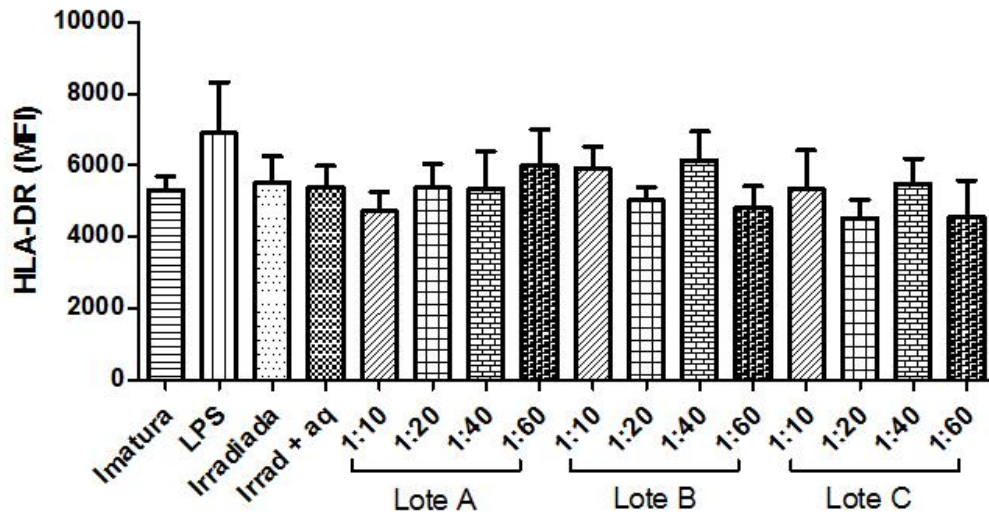
Figura 20: MFI de CD40



moDCs infectadas por 24 horas com diferentes lotes e concentrações de BCG (n=8). A) Gráfico representando média \pm desvio padrão das MFIs dos grupos estudados, sendo o lote A com $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto o lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. * comparação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon), sendo * = a comparação como grupo moDC imatura e Δ com barras as comparações intralote. B) Tabela de Comparação estatística entre colunas (LPS, irradiada, irradiada e aquecida) versus linha (lotes A, B e C nas 4 diluições), onde x = estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon) e NS é não significativo ($p > 0,05$, pelo teste de Wilcoxon). C) Representação da comparação entre os grupos de moDCs estimuladas com LPS, infectadas com BCG irradiada e BCG irradiada e aquecida, onde * representa diferença significativa ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon). D) Representação das comparações interlotes, onde apenas as diluições que apresentaram diferença significativa entre os lotes estão descritas.

Por fim, a MFI obtida para a molécula de HLA-DR não apresentou diferença significativa na comparação de suas variáveis, tanto na comparação com os controles (Imatura e LPS), quanto nas comparações com as BCGs irradiadas e bem como nas comparações intra e interlotes (Figura 21).

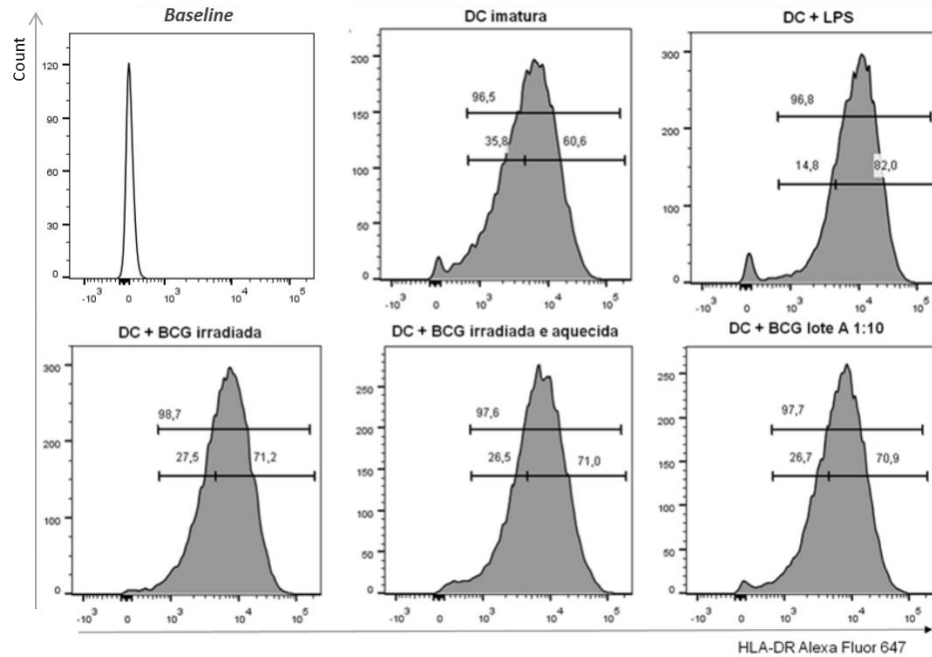
Figura 21: MFI de HLA-DR



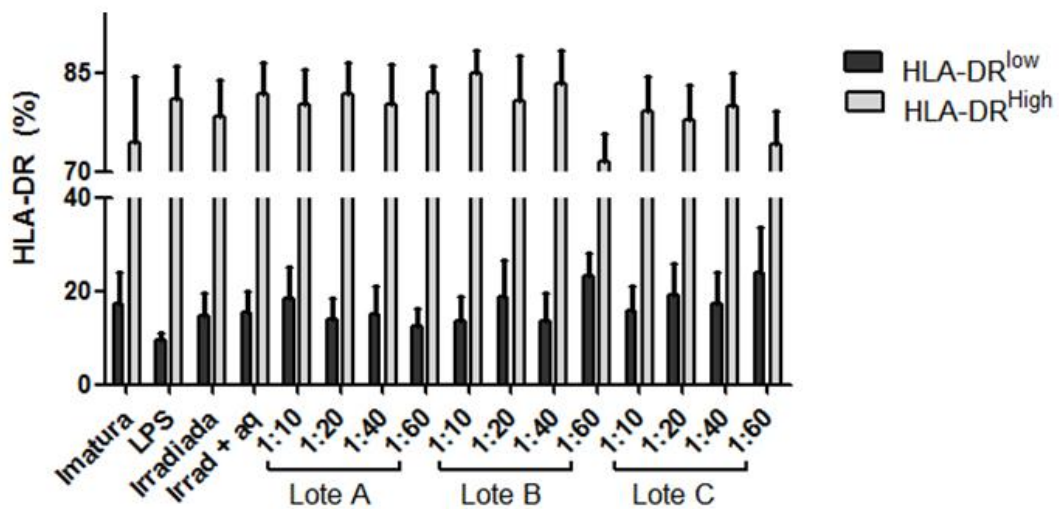
moDCs infectadas por 24 horas com diferentes lotes e concentrações de BCG (n=8), sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. * = comparação estatisticamente signigicante ($p \leq 0,05$, pelo teste de Wilcoxon), sendo * = a comparação como grupo moDC imatura e * as barras as comparações intralote.

Em alguns doadores (n= 5 do total de 8), observou-se a formação de um pequeno arraste no pico do histograma de HLA-DR que apareceu mais nitidamente quando as DCs eram estimuladas com LPS ou infectadas com BCG (Figura 22). Então a partir do controle positivo dividimos a população positiva para HLA-DR em duas subpopulações, HLA-DR^{low} e HLA-DR^{high} (Figura 22A). Observarmos uma tendência a um aumento da população de HLA-DR^{high} e uma diminuição de HLA-DR^{low} na maioria dos grupos infectados com BCG quando comparado ao grupo de moDCs imaturas, apesar de nenhum deles apresentar diferença significativa (Figura 22B). Esse fato poderia estar relacionado como uma variação da expressão dessa molécula entre os doadores, conferindo assim um desvio padrão elevado, principalmente no grupo de células imaturas.

Figura 22: MFI de HLA-DR



1 B



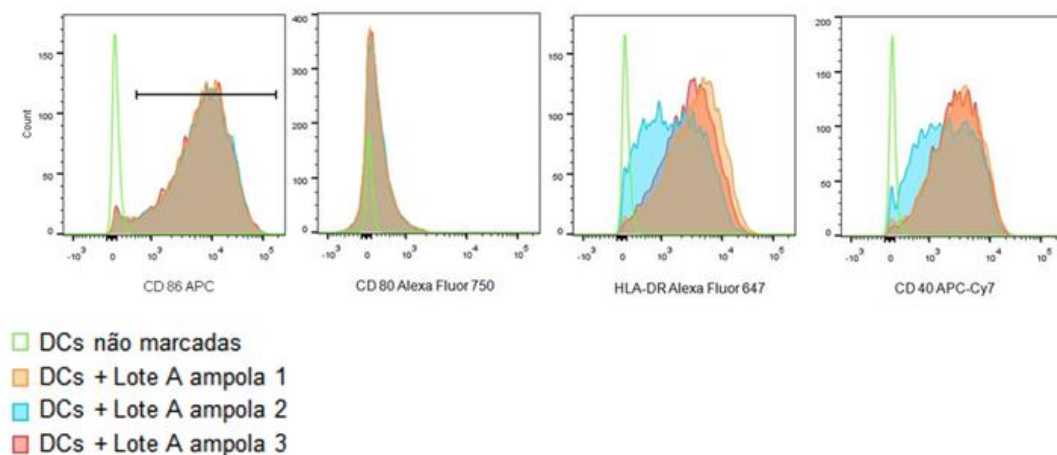
MoDCs infectadas por 24 horas com diferentes lotes e concentrações de BCG separadas em duas subpopulações HLA-DR^{low} e HLA-DR^{high} (A) Histogramas representativos de 1 doador mostrando a expressão de HLA-DR total (região representada pela barra superior) e a mesma região dividida em HLA-DR^{low} (representada pela barra inferior esquerda) e HLA-DR^{high} (representada pela barra inferior direita), os valores acima das barras representam o percentual de marcação daquela determinada região. A divisão em low e high foi feita a partir do controle positivo (moDCs +LPS) (B) Gráfico mostrando o percentual de HLA-DR^{low} e HLA-DR^{high} dos 8 doadores em todas as variáveis testadas; * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo DC imatura (teste de Wilcoxon).

4.3.3.1. Comparação entre ampolas do mesmo lote

Para avaliar se a resposta é semelhante em diferentes ampolas de um mesmo lote, utilizou-se 3 ampolas do lote A, como descrito na seção 3.5., para os mesmos doadores e

marcadores. Para as quatro moléculas, CD80, CD86, CD40 e HLA-DR, não houve nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) na expressão dos mesmos, como exemplificado no histograma abaixo (Figura 23). Entretanto as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 apresentaram uma expressão muito semelhante nas três ampolas testadas, enquanto as moléculas de HLA-DR e CD 40 apresentaram uma maior variação da MFI (representada pela linha azul na Figura 23). Apesar da visual diferença, essa ainda não foi suficiente para gerar uma diferença significativa.

Figura 23: Overlay dos histogramas de CD86, CD80, HLA-DR e CD40



moDCs infectadas com 3 ampolas distintas do lote A por 24 horas, cada cor indicando uma ampola diferente e a linha verde indicando moDCs não marcadas. Figura representativa de 1 doador de um total de 8.

4.4. DETECÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes das culturas foram submetidos ao ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção das citocinas liberadas pelas células, conforme descrito na seção 3.7. As citocinas dosadas foram TNF- α , IL-1 α , IL-18, IL-10 e IL-12.

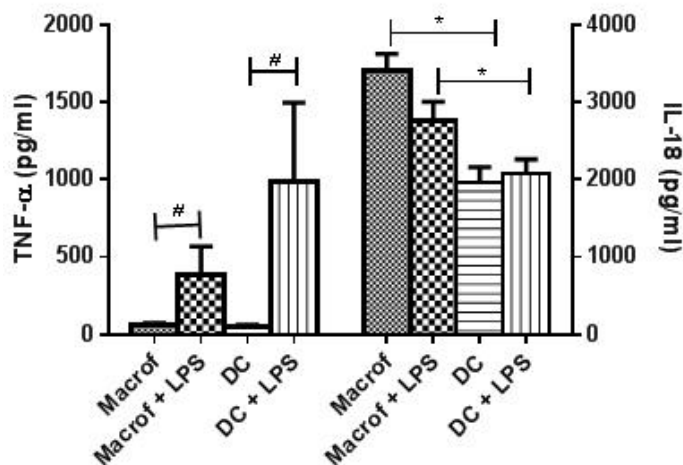
4.4.1. Comparação entre células não diferenciadas e diferenciadas

Foram dosadas as citocinas do sobrenadante das células diferenciadas (moDCs) e não diferenciadas (macrófagos). A figura 24, mostra um aumento de TNF- α nas células estimuladas com LPS quando comparadas as células células imaturas, tanto em moDCs quanto em macrófagos. A comparação de ambas as células não estimuladas com suas respectivas

estimuladas com LPS apresentaram um p valor igual a 0,0625, sendo um valor próximo da significância. Além disso, os níveis de TNF- α no sobrenadante das moDCs estimuladas com LPS foi maior do que os no sobrenadante dos macrófagos que receberam o mesmo estímulo. A quantificação dessa citocina no sobrenadante das culturas apresentou uma alta variação entre os doadores, conforme constatado pelo desvio padrão (Figura 24).

Em relação aos resultados obtidos com a citocina IL-18, um valor maior foi observado, tanto em moDCs e macrófagos não estimulados quanto estimulados, diferente de TNF- α que apresentou valores mais próximos a zero em células não estimuladas. A comparação entre moDCs e macrófagos não estimulados mostrou um maior nível desta citocina no sobrenadante das culturas de macrófagos ($p= 0,0156$). O mesmo foi observado no sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados quando comparado ao sobrenadante das moDCs estimuladas ($p= 0,0078$). Nos macrófagos parece que a liberação de IL-18 foi maior nas células não estimuladas enquanto nas moDCs a diferença na liberação da mesma foi muito pequena, apesar das moDCs não estimuladas apresentarem uma concentração menor.

Figura 24: Média e desvio padrão de TNF-alfa e IL-18 em sobrenadante de cultura de células (moDCs ou macrófagos)



moDCs ou macrófagos sem estímulo ou estimuladas com LPS (0,5 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas, dosados por ELISA. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) simbolizadas por * e $p= 0,0625$ simbolizadas por # (teste de Wilcoxon) ($n=8$)

Simultaneamente, as citocinas IL-1 α , IL-10 e IL-12 apresentaram níveis baixos de detecção. E a liberação das mesmas não foi alterada, tanto nas culturas de células diferenciadas quanto no sobrenadante das células estimuladas com LPS.

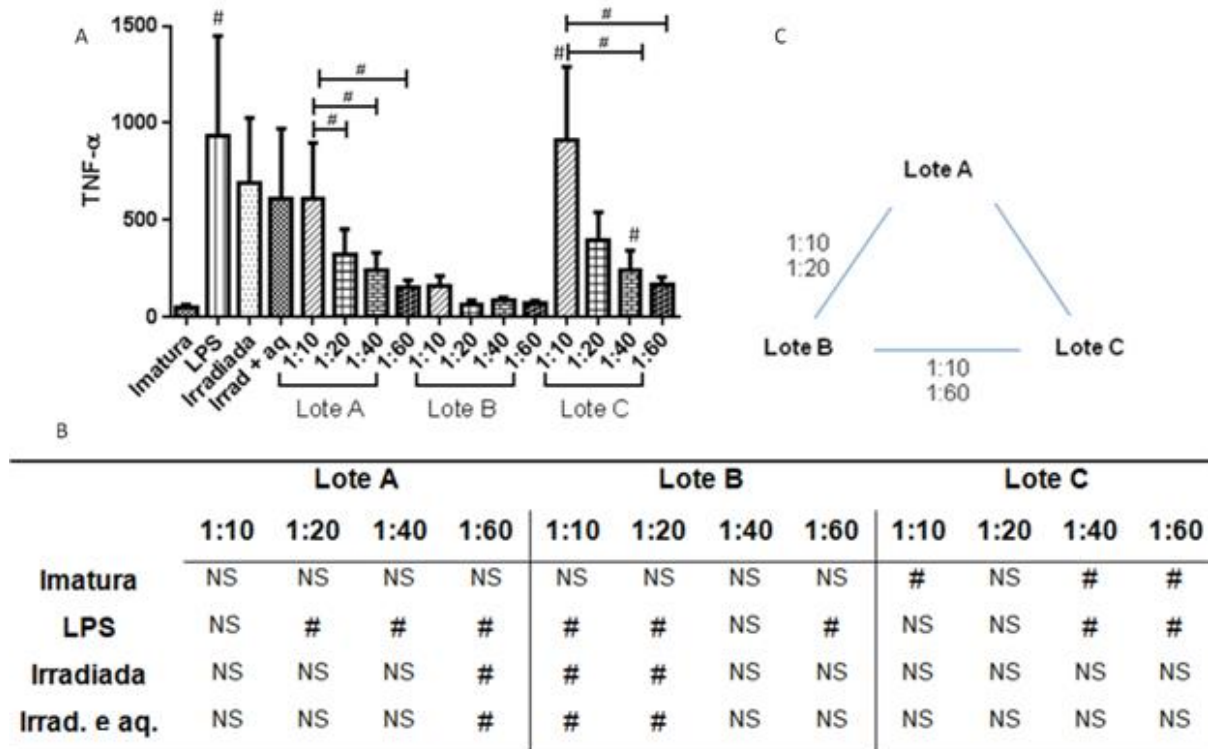
4.4.2. Citocinas na infecção com BCG

Em relação as células imaturas, TNF- α mostrou um aumento em seu nível quando as moDCs foram estimuladas com LPS ou infectadas com BCG (Figura 25).

Um aumento na liberação dessa citocina foi visto quando as moDCs foram estimuladas com LPS, BCG irradiada, BCG irradiada e aquecida e BCG dos lotes A e C quando comparadas as moDCs imaturas. Contudo, o lote B, o que apresentava menor UFC, não mostrou o mesmo aumento que os lotes A e C.

Observou-se uma tendência a um decréscimo de nível de TNF- α dependente da diluição nos sobrenadantes obtidos das culturas do lote A e C; (Figura 25A, $p=0,06$).

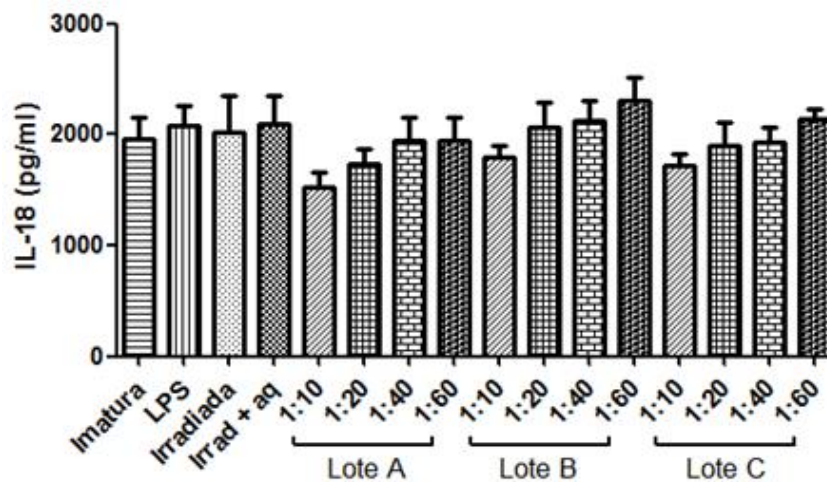
Figura 25: Dosagem de TNF- α no sobrenadante de cultura de moDCs



(A) Gráfico de média e desvio padrão de TNF- α em sobrenadante de cultura de moDCs, sem estímulo (imatura), estimuladas com LPS (0,5 μ g/ml) ou infectadas com diferentes lotes e diluições de BCG por 24 horas, dosados por ELISA. Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) simbolizadas por * (teste de Wilcoxon) ($n=8$) (B) Tabela de Comparação estatística entre colunas (Imatura, LPS, Irradiada, Irradiada e aquecida) versus linha (Lotes A, B e C nas 4 diluições), onde # é $p = 0,06$, pelo teste de Wilcoxon e NS $p > 0,06$ pelo teste de Wilcoxon. (C) Representação das comparações interlotes, onde apenas as diluições que apresentaram $p = 0,06$ entre os lotes estão descritas.

Já IL-18, diferentemente de TNF- α apresentou níveis mais altos mesmo nas células imaturas. E a liberação dessa citocina não demonstrou grandes alterações quando as células foram infectadas com BCG. Também não foi observada nenhuma grande diferença na comparação interlotes, uma vez que algumas variáveis mostraram um pequeno aumento, outras uma pequena redução e outras tiveram a liberação semelhante as moDC imaturas. Com relação a comparação intralotes foi notada uma tendência a proporcionalidade, entretanto, neste caso, quanto mais concentrada a vacina menor a liberação de IL-18 (Figura 26).

Figura 26: Média e desvio padrão de IL-18 em sobrenadante de cultura de moDCs

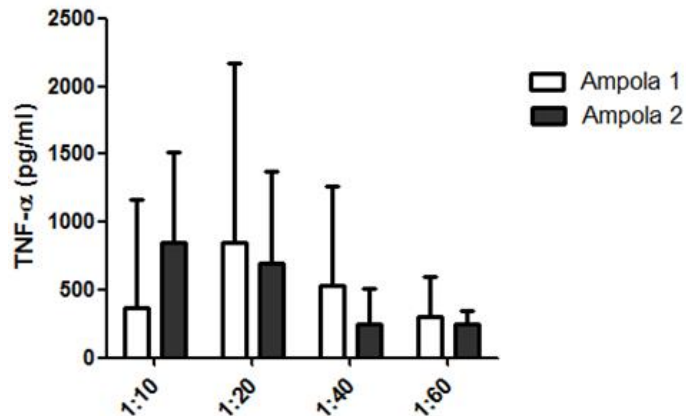


moDCs sem estímulo (imatura), estimuladas com LPS (0,5 mg/ml) ou infectadas com diferentes lotes e diluições de BCG por 24 horas, dosados por ELISA. Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) simbolizadas por * (teste de Wilcoxon) (n=8)

4.4.2.1. Comparação intra-lote

Foi feita a comparação de 2 ampolas do lote A da vacina. Entretanto, o n para essa comparação foi menor, de apenas 4 dos 8 doadores. Apenas TNF- α apresentou uma diferença maior entre as ampolas (Figura 27). Não foi possível concluir se realmente a liberação dessa citocina é diferente quando vacinas do mesmo lote infectam moDCs pois uma alta variação associada ao número menor de doadores impossibilitou a aplicação de um teste estatístico.

Figura 27: Comparação intra-lote (Lote A).



Média e desvio padrão de TNF- α em sobrenadante de cultura de moDCs infectadas com 2 ampolas distintas de lote A ($6,86 \times 10^6$ UFC) de BCG em 4 diluições distintas por 24 horas, dosados por ELISA. (n=4)

4.5. UFC NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS

No intuito de verificar se os bacilos foram interiorizados pelas moDCs e a quantidade relativa de bacilos que permaneceram no meio extracelular foi feita a contagem de UFC dos sobrenadantes conforme descrito no item 3.8. Para isso, foi utilizado o sobrenadante de 7 doadores, 4 deles foi feita seleção negativa de monócitos e 3 deles seleção positiva. Uma das 4 amostras de monócitos que foram isolados por seleção negativa o sobrenadante não foi utilizado fresco, o mesmo foi congelado por 24 horas antes de ser inoculado. O congelamento foi feito no intuito de testar se a viabilidade dos bacilos era mantida após o congelamento.

Para essa técnica apenas a diluição 1:10 dos 3 lotes foi utilizada e também não foi feita a comparação intra-lote (Tabelas 8 e 9). As moDC imaturas, não infectadas serviram com controle negativo do ensaio, já os sobrenadantes das culturas contendo bacilos irradiados e aquecidos não apresentaram crescimento de colônias, enquanto os lotes A, B e C mostraram crescimento bacteriano, esse resultado mostrou que o processo de irradiação parece ter matado os bacilos presentes na BCG.

Os sobrenadantes provenientes de DCs derivadas de monócitos isolados por seleção positiva mostraram uma menor contagem de colônias do que o das células provenientes de seleção negativa nos três lotes de BCG testados (Tabela 8).

O sobrenadante do grupo seleção negativa parece ter mantido a proporcionalidade de colônias, ou seja, lote A e C, lote com quantidade intermediária e maior de UFC respectivamente, apresentaram maior contagem de colônias no sobrenadante que o lote B, lote com menor UFC.

Entretanto, não foi possível avaliar com precisão a diferença entre os lotes A e C, pois os mesmos apresentaram uma quantidade superior a 100 colônias. Já nos sobrenadantes do grupo seleção positiva, o lote C apresentou uma contagem mais baixa que o lote A, enquanto o lote B, apresentou uma menor quantidade de colônias que os demais lotes conforme esperado.

Tabela 9: Média de desvio padrão da contagem de UFC nos sobrenadantes frescos de cultura de moDCs infectadas com BCG.

	Seleção negativa	Seleção positiva
Imatura	0 ± 0	0 ± 0
Irradiada	0 ± 0	0 ± 0
Irrad e aq.	0 ± 0	0 ± 0
Lote A	acima de 100	29,1 ± 8,7
Lote B	25,1 ± 4,9	1,3 ± 1,7
Lote C	acima de 100	6,1 ± 5,6

Para cada grupo (seleção positiva e negativa) foi utilizado um n de 3 doadores, e cada variável (linhas) foi feita em triplicata, sobrenadante das culturas de DCs infectados por 24 horas com os lotes A, B e C, lote D irradiado e lote D irradiado e aquecido. Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. Quando a cultura apresentou mais de 100 colônias e devido a quande quantidade de colonias houve formação de um "tapete" o que impossibilitou a contagem de colonias individualmente.

Com relação ao sobrenadante congelado, parece ter havido uma redução da viabilidade de bacilos quando a amostra é congelada, pois a contagem de bacilos reduziu consideravelmente quando comparamos aos sobrenadantes frescos das células provenientes de monócitos isolados pelo mesmo método de seleção (negativa). Apesar de a redução ter ocorrido nos três lotes, parece que quanto maior o número de colônias maior foi a redução no sobrenadante congelado, enquanto o lote C passou de mais de 100 colônias para 4,3 o lote a A passou de mais de 100 para 23,7 e o lote B de cerca de 25 colônias para cerca de 3 colônias (Tabela 9).

Tabela 10: Média de desvio padrão da contagem de UFC nos sobrenadantes congelados

	Congelado
Imatura	0 ± 0
Irradiada	0 ± 0
Irrad e aq.	0 ± 0
Lote A	23,7 ± 3,2
Lote B	3,3 ± 0,5
Lote C	4,3 ± 5,1

Contagem de colônias do sobrenadante das culturas de DCs infectadas por 24 horas e congeladas por mais 24 horas com os lotes A, B e C, lote D irradiado e lote D irradiado e aquecido. Foi utilizado um n de 1 doador e cada variável (linhas) foi feita em triplicata, Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC.

4.6.COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE SELEÇÃO

Como no processo de padronização da técnica de isolamento de monócitos utilizamos seleção negativa, mas no decorrer do trabalho utilizamos também a seleção positiva decidimos verificar se este fato poderia influenciar nas moDCs. Para tal fim, comparamos os dois métodos de separação utilizados nesse estudo, microesferas de seleção negativa (n=5) e seleção positiva (n=3).

Dentre as comparações, a liberação de TNF- α e IL-12 parecem ter se mostrado diferentes, todavia o n utilizado foi pequeno para confirmarmos estatisticamente essas diferenças. Com relação a TNF- α , a maioria das variáveis das moDCs derivadas de seleção positiva mostraram uma média do nível de TNF- α maior que a média obtida para esta citocina no sobrenadante das células derivadas de seleção negativa. As excessões foram as moDCs infectadas com o lote com menor quantidade de bacilos nas diluições 1:20 e 1:40 e 1:60 e infectadas com a BCG irradiada e aquecida (Figura 28A).

Com relação a IL-12, quando os resultados foram analisados somando todos os doadores, independentemente do tipo de seleção, os mesmos não apresentaram grandes alterações em sua liberação quando as células imaturas foram estimulas ou infectadas. Todavia, quando a comparação foi feita entre o grupo proveniente de seleção negativa e o grupo proveniente de seleção positiva o resultado da liberação desta citocina nos sobrenadantes demonstrou que as DCs derivadas de monócitos isolados por seleção negativa liberaram maior

quantidade de IL-12 do que as derivadas de monócitos isolados por seleção positiva (Figura 28B), ao contrário do que acontece com TNF- α .

Figura 28: Comparação nos níveis de TNF- α e IL-12 de moDCs diferenciadas a partir de monócitos isolados por microesferas magnéticas de seleção negativa e positiva

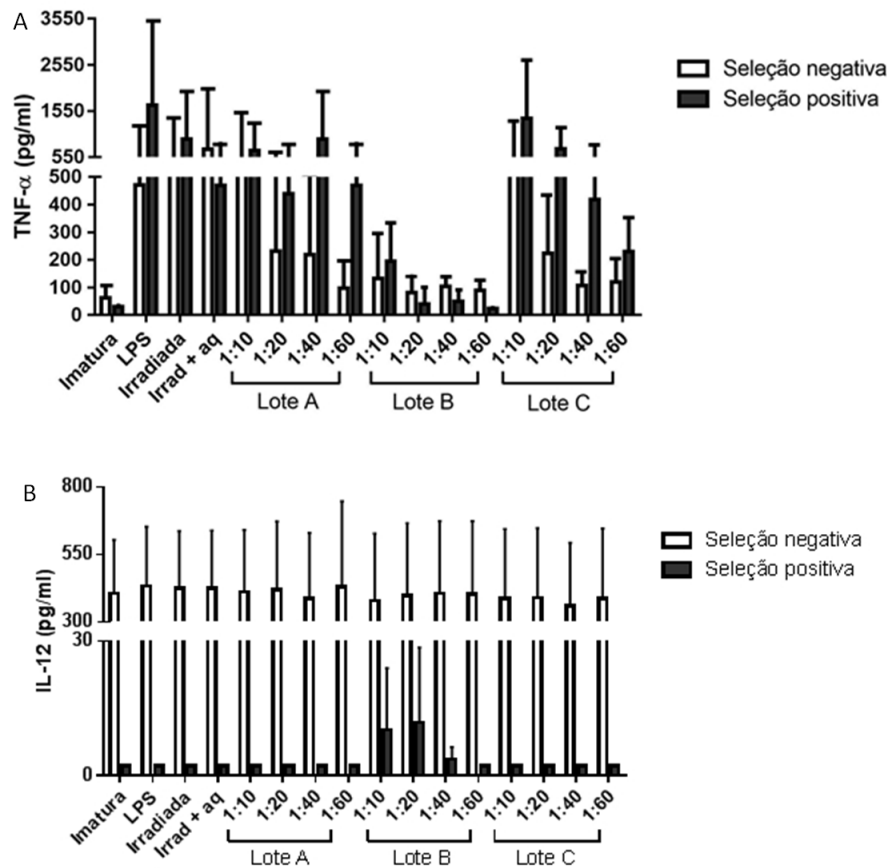


Gráfico de média e desvio padrão de TNF- α (A) e IL-12 (B) em sobrenadante de cultura de moDCs infectadas por 24 horas. Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. Grupo de seleção negativa $n=5$ e grupo seleção positiva $n=3$

Essa mesma comparação foi feita para os marcadores de superfície. Os receptores que mostraram alguma diferença em suas expressões foram CD80, CD86 e CD40. CD80 mostrou-se aumentado, em todas as variáveis estudadas, em moDCs provenientes de seleção positiva quando comparado com as provenientes de seleção negativa (Figura 29A), com o que ocorreu com a liberação de TNF- α . O oposto ocorreu com relação a expressão de CD86 e CD40 (Figuras 29B e C), que apresentaram um aumento em DCs provenientes de seleção negativa, como ocorreu com a liberação de IL-12. Com relação a CD86 essa diferença foi observada em todas as variáveis (Figura 29B). Já com relação a CD40, essa diferença não foi tão homogênea, pois algumas variáveis apresentaram resultado inverso como as moDC estimuladas com LPS. Outras variáveis apresentaram valores de expressão mais semelhantes na comparação entre as

diferentes seleções, como foi o caso das células infectadas com BCG do lote A na diluição 1:60 e infectadas com as BCGs irradiada e irradiada e aquecida (Figura 29C).

Figura 29: Comparação entre moDCs diferenciadas a partir de monócitos isolados por microesferas magnéticas de seleção negativa e positiva do MFI de CD80, CD86 e CD40

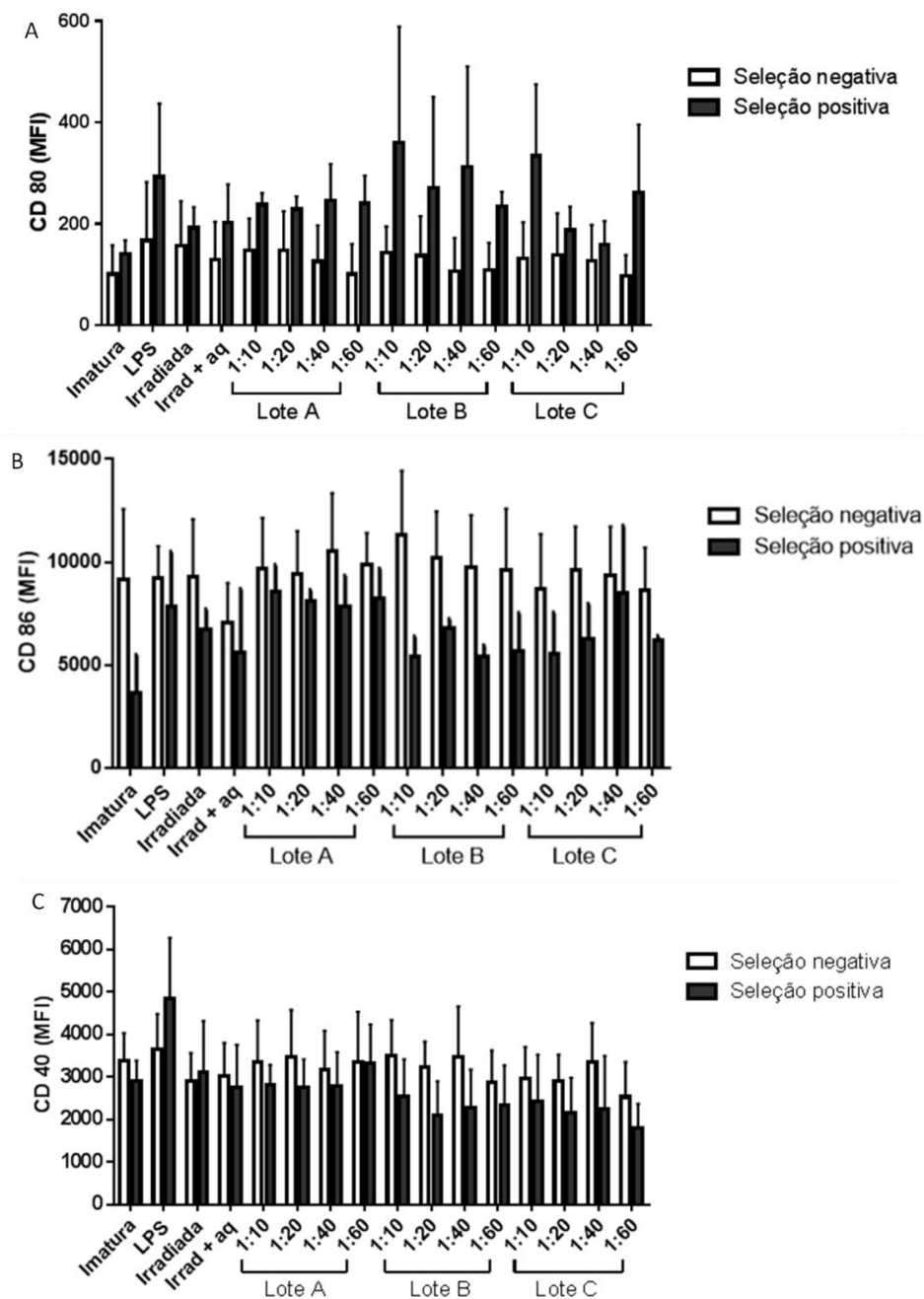


Gráfico de média e desvio padrão de CD80 (A), CD86 (B) e CD40 (C) em moDCs infectadas por 24 horas e marcadas com anticorpos monoclonais, amostras lidas em um citometro de fluxo. Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. Grupo de seleção negativa n=5 e grupo seleção positiva n=3

Resumindo os principais resultados obtidos na imunofenotipagem dos receptores de superfície, da detecção de citocinas do sobrenadante e da contagem de UFC do sobrenadante montou-se as tabelas a seguir (Tabela 10 e 11).

A tabela 10 refere-se aos resultados de todos os doadores (n=8), quando comparados as moDCs imaturas. Enquanto a tabela 11 refere-se aos resultados das comparações entre seleção negativa versus seleção positiva.

Tabela 11: Resumo dos principais resultados de imunofenotipagem e da detecção de citocinas do sobrenadante (n=8)

	LPS	Lote A				Lote B				Lote C			
		1:10	1:20	1:40	1:60	1:10	1:20	1:40	1:60	1:10	1:20	1:40	1:60
CD80	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
CD86	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
CD40	↑	=	=	↓	↑	=	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓
HLA-DR	↑	↑	=	=	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
HLA-DR ^{high}	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	=
HLA-DR ^{low}	↓	=	↓	↓	↓	↓	=	↓	↑	↓	↑	↓	↑
TNF-α	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

moDCs estimuladas com LPS (0,5 µg/ml) e infectadas com diferentes lotes de BCG comparadas as moDCs imaturas. Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC ↑ representando um aumento do MFI, no caso dos receptores de superfície ou do nível de TNF-α em relação as moDCs imaturas; ↓ representando uma diminuição do MFI, no caso dos receptores de superfície ou do nível de TNF-α em relação as moDCs imaturas; ↑ representando um discreto aumento do nível de TNF-α em relação as moDCs imaturas; = representando um(a) expressão/nível semelhante dos receptores de superfície ou de TNF-α em relação as moDCs imaturas; □ representando os lotes que apresentaram proporcionalidade entre a diluição de BCG e a expressão/ nível de determinado marcador/receptor.

Tabela 12: Resumo dos principais resultados de comparação seleção negativa (n=5) em relação a seleção positiva (n=3) de imunofenotipagem, de detecção de citocinas no sobrenadante e contagem de UFC no sobrenadante.

	Irrad				Lote A				Lote B				Lote C			
	Imat	LPS	Irrad	e aq	1:10	1:20	1:40	1:60	1:10	1:20	1:40	1:60	1:10	1:20	1:40	1:60
TNF-α	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓
IL-12	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
CD80	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
CD86	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
CD40	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
UFC	0	0	0	0	↑	NA	NA	NA	↑	NA	NA	NA	↑	NA	NA	NA

moDCs imaturas, estimuladas com LPS (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e infectadas com diferentes lotes de BCG. Sendo o lote A com de $6,86 \times 10^6$ UFC, o lote B com $1,24 \times 10^6$ UFC, enquanto um lote C com $19,64 \times 10^6$ UFC. ↑ representando um aumento do MFI, no caso dos receptores de superfície ou do nível de citocinas ou da contagem de UFC em DCs derivadas de monócitos isolados por seleção negativa quando comparadas as DCs derivadas de monócitos isolados por seleção positiva; ↓ representando uma diminuição do MFI, no caso dos receptores de superfície, do nível de citocinas ou da contagem de UFC em DCs derivadas de monócitos isolados por seleção negativa quando comparadas as DCs derivadas de monócitos isolados por seleção positiva; = representando um(a) expressão/nível semelhante dos receptores de superfície ou de citocinas em relação em DCs derivadas de monócitos isolados por seleção negativa quando comparadas as DCs derivadas de monócitos isolados por seleção positiva; NA representando variável não analisada.

5. DISCUSSÃO

Na elaboração deste projeto, teve-se como visão o desenvolvimento de um ensaio de potência da vacina contra tuberculose, utilizando células dendríticas humanas na tentativa de uma compreensão melhor da resposta imune inicial *in vitro* para se identificar os mecanismos específicos que podem conferir proteção contra esta doença. Além disso, a vacina BCG vem sendo utilizada como um maturador de células dendríticas humanas em testes que visam a utilização destas células como imunoterapia ou vacina em alguns tipos de câncer (Thurnher *et al.*, 1997; Shankar *et al.*, 2004).

Os resultados iniciais deste estudo mostraram que apesar da diminuição significativa de linfócitos após a submissão das células de sangue periférico as técnicas de separação por gradiente de densidade por Ficoll-Histopaque, agregação ao frio e separação por gradiente de densidade por Percoll, houve também uma redução da viabilidade celular. Isso provavelmente se deve ao fato do longo processamento de purificação ao qual as células foram submetidas. Esses fatores impossibilitaram a continuidade para a fase de diferenciação dos monócitos em DCs utilizando aquela abordagem. Além disso, estudo prévio já havia demonstrado que métodos de isolamento empregando Ficoll originava uma população de células com baixa viabilidade (Coquery *et al.*, 2012)

Com o intuito de melhorar a viabilidade celular, as PBMCs foram submetidas a duas etapas de agregação ao frio. Entretanto, a purificação final de monócitos ainda não foi eficiente. Uma possível explicação para isso pode ser resultante do número reduzido de células inicialmente submetidas ao processo, o qual ficou abaixo de 50 milhões totais recomendada para a realização desta técnica (Santos *et al.*, 2001).

Já a técnica de separação de monócitos por citometria de fluxo, dentro das condições experimentais aqui realizadas, também não foi eficiente para o isolamento da população de interesse. Entretanto, essa é uma técnica amplamente utilizada, permitindo a obtenção de células com alta pureza (95-100%) (Basu *et al.*, 2010). Tendo em vista a alta complexidade da técnica acima e o fato da mesma requerer tanto um equipamento especializado de alto custo, quanto o treinamento técnico para manuseá-lo (Basu *et al.*, 2010), considerou-se que esta não seria vantajosa dada a proposta deste trabalho. Sendo assim, tal abordagem poderia em tese gerar uma purificação mais fidedigna aprimorando o processo de separação de monócitos a partir de PBMCs, mas não de sangue total, por seleção negativa, e assim excluindo os linfócitos e células NK, Com isso, a técnica de separação por microesferas se mostrou mais eficiente e de

fácil execução por se tratar de um kit comercial no isolamento de monócitos quando comparada as demais metodologias testadas, sendo já amplamente utilizada em diversos estudos empregando monócitos e moDCs (*Jefford et al., 2003; Berger et al., 2010; Morel et al., 2011; Daigneault et al., 2012*). Desta forma, essa metodologia foi eleita para a obtenção das células utilizadas no presente estudo. Tendo assim padronizado o isolamento de monócitos, partiu-se para a etapa seguinte de diferenciação em moDCs.

As moDCs são amplamente utilizadas para estudos como uma alternativa para o isolamento de mDCs diretamente do sangue, já que a última representa menos de 1% dos leucócitos do sangue periférico, dificultando seu isolamento direto (*Figdor et al., 2004*).

Com relação aos resultados obtidos nesse estudo para a padronização da diferenciação de DCs, notou-se que o meio de cultivo utilizado interferiu significativamente na diferenciação dos monócitos em DCs. Observamos que as células cultivadas em RPMI apresentaram melhor diferenciação quando comparadas as cultivadas em DMEM, mostrando uma morfologia, segundo a avaliação por citometria de fluxo, semelhante a esperada em células diferenciadas, ou seja, maiores. Os meios utilizados nesse estudo, DMEM e RPMI, são amplamente empregados para cultivo de diferentes tipos de células (*Wu et al., 2009*). No entanto, existem algumas diferenças na sua composição e estas poderiam potencialmente afetar a proliferação celular, a viabilidade celular e a diferenciação celular. O meio RPMI 1640, foi primeiramente utilizado para cultivo de linfócitos, sendo ele um meio simples em ingredientes e rico em aminoácidos. Já o DMEM, modificado a partir de *Eagle*, é rico em nutrientes e apresenta características diferentes (*Wu et al., 2009*). Para a diferenciação e cultivo de moDCs, diversos estudos têm com meio de escolha o RPMI (*Svajger e Jeras, 2011*). A mesma diferença não foi observada quando comparamos SFB e SH, já que as culturas apresentaram morfologias semelhantes. No entanto, optamos pelo SH, visto que a utilização de soro não-humano poderia gerar uma apresentação antigênica não desejada e assim criar um artefato (*Figdor et al., 2004*). Além disso, com relação a expressão de CD209 e CD14, não houve uma diferença acentuada entre os meios de cultivo utilizados.

Com relação a utilização de tubo ou placa para a diferenciação das células, o cultivo em placa mostrou-se mais eficiente, devido a maior redução de CD14 (cerca de 25% quando comparado ao cultivo em tubo) e aumento de CD209 em placa (cerca de 15% comparado ao cultivo em tubo). Contudo, estudos anteriores de nosso grupo não evidenciaram diferenças significativas entre estes 2 métodos de cultivo para os mesmos marcadores, após maturação

com o BCG Moreau (Santos *et al.*, *in press*). No entanto, naquele estudo foi utilizado apenas a vacina BCG Moreau provenientes de um único lote aprovado.

Por fim, no intuito de escolher a melhor concentração das citocinas GM-CSF e IL-4, a serem utilizadas, partiu-se de duas concentrações iniciais. Assim avaliando qual delas seria a mais adequada para o presente estudo, já que na literatura estão descritas concentrações distintas para diferenciação. Desta forma, as concentrações escolhidas foram 300 e 500 UI/ml para ambas citocinas. Apesar de 300 UI/ml ter gerado uma boa diferenciação para a maioria dos doadores, em um deles a perda de CD14 foi menos acentuada. Concomitantemente, houve uma diferença de cerca de 10% na expressão de CD14 quando comparadas as duas concentrações. Devido a este fato, padronizou-se 500 UI/ml para esse estudo.

Após a padronização da diferenciação dos monócitos em DCs, foi feita uma avaliação do melhor conjunto de marcadores para confirmar a geração das mesmas, para isso utilizou-se os marcadores CD14, CD209 e CD1a. As moDCs mostraram que a perda de CD14 e o concomitante aumento CD209 foram fenótipos sugestivos deste fenômeno. Como já amplamente discutido na literatura, as moDCs perdem a expressão de CD14 (CD14^{low/-}) e aumentam a expressão de CD209 (CD209⁺) (Cella *et al.*, 1997; Nonaka *et al.*, 2011). No entanto, CD1a, que também é descrito como um marcador de diferenciação de moDC (Cella *et al.*, 1997), não apresentou o aumento esperado. Uma possível explicação para esse fato poderia ser a condição experimental utilizada. Estudos têm mostrado que sua expressão pode variar de acordo com o meio de cultivo utilizado (Dalgaard, Beckstrøm e Brinchmann, 2003; Jakobsen, Møller e Lillevang, 2004). Além disso, um estudo demonstrou que monócitos cultivados com GM-CSF e IL-4 em um meio sintético (AIMV) apresentam uma fase intermediária dando origem primeiramente a DCs CD14^{low} CD1a⁻, e posteriormente gerando DCs CD14⁻ CD1a⁺ (Gogolak *et al.*, 2007).

Os resultados da padronização do processo de diferenciação, confirmam que a geração de DCs *in vitro* a partir de monócitos de sangue periférico é uma metodologia que possui variabilidade inerente ao fato de se tratar de voluntários representativos de uma população heterogênea. Além disso, dependendo do meio de cultivo utilizado, o método de separação de monócitos e a concentração de citocinas utilizadas, gerou DCs com diferentes fenótipos conforme descrito anteriormente (Dalgaard *et al.*, 2003; Figdor *et al.*, 2004; Jakobsen *et al.*, 2004; Elkord *et al.*, 2005; Gogolak *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2010). Além dessas variações, é importante uma boa padronização dessa diferenciação, pois o cultivo por longos períodos e um excesso de citocinas pode afetar negativamente a função das DCs, gerando células com

menor potencial imunogênico (Schreibelt *et al.*, 2010). Por um lado, apesar das moDCs serem consideradas semelhantes fenotipicamente e funcionalmente as mDC (Schreibelt *et al.*, 2010), ainda há divergências sobre sua utilização (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2015). As moDCs representam um conjunto heterogêneo de células, não possuem a mesma origem que as mDCs tradicionais, e só estão presentes in vivo em condições inflamatórias, diferentemente das mDCs, que estão presentes em condições normais no estado imaturo também (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2015). Por outro lado, ambas, geração e utilização das moDCs, vêm sendo bastante descritas, tanto em trabalhos de pesquisa básica, quanto de pesquisa aplicada, como é o caso da imunoterapia para indivíduos com câncer, sendo considerada como padrão-ouro para essa última (Figdor *et al.*, 2004).

O processo de diferenciação por adição de GM-CSF e IL-4 gera DCs imaturas, ou seja, células com grande atividade fagocítica e processamento antigênico (Grassi *et al.*, 1998). Estudos vêm demonstrando que a interação de DCs com a vacina BCG resulta na maturação e ativação celular (Henderson *et al.*, 1997; Demangel *et al.*, 1999). Esses parâmetros são mensurados por alterações fenotípicas das DCs, incluindo liberação de citocinas, e pela redução de sua atividade endocítica após a infecção (Thurnher *et al.*, 1997). De modo semelhante a outros produtos bacterianos, tais como LPS, o estímulo gerado pela micobactéria regula positivamente a expressão de moléculas tanto co-estimulatórias, como CD80, CD86 e CD40, bem como TNF- α e IL-1 β , que por sua vez induzem a expressão de CD83 e a maturação das moDCs (Tsuji *et al.*, 2000). Outras moléculas, como MHC classes I e II, também têm sua expressão elevada quando DCs são infectadas com BCG (Demangel e Britton, 2000). Estes estudos sugerem que as DCs infectadas têm uma capacidade aumentada para estimular as células T (Demangel e Britton, 2000). Entretanto, a maturação das moDCs é complexa e considerada um processo flexível e dependente do estímulo e do tipo de sinalização desencadeada (Schreibelt *et al.*, 2010)

Devido a eficiência com que a vacina BCG induz a maturação de DCs, essas células maturadas são consideradas como adjuvantes para a ativação de linfócitos T, sendo utilizadas em estudos de imunoterapia para o câncer (Bol *et al.*, 2016). Por outro lado, a literatura se demonstra um tanto controversa, visto que alguns artigos indicam a vacina BCG tanto como fraco quanto como forte agente maturador de DCs. Marongiu e colaboradores (2013) relataram que esta vacina sozinha não induziria um aumento significativo de CD83 e CD86, e diminuiria a expressão de HLA-DR. Já em um estudo publicado em 2007 por Murray e colaboradores foi descrito um aumento de CD197, HLA-DR, CD40, CD83, CD86 e CD80

após infecção de DCs com BCG, mas também relatou uma considerável variação entre doadores, o que prejudicou, segundo os autores, uma análise estatística acurada (Murray *et al.*, 2007). No presente estudo, não foi encontrado um aumento importante na expressão de CD83 quando as moDCs foram tanto infectadas com BCG, quanto estimuladas por LPS. Entretanto, são necessários estudos adicionais para melhor compreender a expressão e função desse marcador.

Considerando os marcadores CD80, CD86 e MHC-II demonstramos que tanto LPS quanto a infecção por BCG induziram a maturação de moDCs, constatado pelo aumento de expressão de CD80 e menos evidente para CD86 e MHC-II, demonstrando que a vacina BCG foi capaz de induzir a maturação das moDCs. Entretanto, foi observada uma alta variabilidade interindividual, também relatada em outro estudo (Murray *et al.*, 2007). Concomitantemente, observamos um aumento nos níveis de TNF- α no sobrenadante dessas culturas quando comparados as células não estimuladas ou não infectadas. Esses resultados estão de acordo com a literatura que apontam CD80 e produção de TNF- α entre os marcadores de maturação de DCs (Elkord *et al.*, 2005).

Destarte, um aumento, ainda que não significativo, de CD40 foi observado quando as células foram estimuladas com LPS. Já a infecção por BCG nas moDCs, dentro de nossas condições experimentais, gerou resultados de CD40 semelhantes as células não infectadas. A expressão de CD40 apresentou uma diminuição significativa nas moDCs infectadas com BCG na maioria das diluições do lote C (alta carga bacilar). Sendo este receptor uma molécula que após ativação pode ser secretada na forma de sCD40 (Giunta *et al.*, 2010), resta ser verificado se a infecção pela BCG ou um fator secundário, tal como aumento de TNF- α (Tsuji *et al.*, 2000), poderia gerar formas solúveis de CD40 (Melendreras *et al.*, 2014). Como um todo, nossos resultados sugerem que a maturação de moDCs via a vacina BCG estaria mais associada a um aumento das moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), porém não envolveria CD40.

Com relação a expressão de HLA-DR, também não houve aumento significativo de sua expressão quando as moDCs foram infectadas ou estimuladas. Este fato pode ter como uma plausível explicação a mesma heterogeneidade na expressão dessa molécula entre os doadores, conforme já abordado. Essa característica é inerente a molécula de HLA, fato que a mesma é altamente polimórfica (Abbas, Lichtman e Pilai, 2007).

Utilizando uma abordagem rotineira e eficiente, foi possível observar uma tendência no deslocamento da MFI durante a expressão de HLA-DR quando as moDCs foram estimuladas

e infectadas com BCG, demonstrando em alguns doadores uma população HLA-DR^{high} e HLA-DR^{low}. Na maioria dos casos, houve um aumento da população HLA-DR^{high} e uma consequente diminuição da HLA-DR^{low}, principalmente nas moDCs estimuladas com LPS. Entranto, pode-se observar que o lote C (alta carga bacilar) apresentou níveis semelhantes as moDC imaturas do que os lotes A (lote aprovado) e B (baixa carga bacilar). Estes dois últimos apresentaram níveis de HLA-DR^{high} maiores e HLA-DR^{low} menores, quando comparados as células imaturas. Essa expressão de HLA-DR^{low} HLA-DR^{high} encontrada no lote C coaduna com a expressão de CD40 do mesmo lote. Em tese, esse fato pode representar uma indução para um perfil tolerogênico ou anérgico nas DCs, devido ao maior número de bacilos presentes. Sato e colaboradores (2002) descreveram que diversos fatores, incluindo, a exposição a produtos microbianos ou excesso de estímulo poderiam modular a função e favorecer a diferenciação de DCs tolerogênicas (Sato *et al.*, 2002). Essas DCs são caracterizadas por baixa expressão de moléculas co-estimulatórias, bem a habilidade de suprimir a resposta de células T efetoras e levando ao desenvolvimento de células T regulatórias (Torres-Aguilar *et al.*, 2010).

Como um todo, as expressões referidas acima apresentaram um fator dose-dependente no lote A para CD80 e em menor escala HLA-DR. Quanto aos outros receptores de superfície de membrana avaliados nas quatro diluições dentro do mesmo lote da vacina BCG não apresentaram proporcionalidade.

Outros receptores investigados no decorrer do estudo descrito nessa dissertação foram os TLR 2 e 4, bem como CCR7 (CD197). Esses receptores foram marcados na superfície de membrana com ou sem estímulo/infecção. Não observamos diferenças na expressão em nenhuma das variáveis testadas. Com relação a expressão na família TLRs também varia de acordo com a espécie e grau de maturação da célula. Como já intruduzido, TLR 2 e 4 são importantes receptores de reconhecimento de componentes bacterianos, como o LPS (Janeway e Medzhitov, 2002). Estudos relacionando a expressão de receptores na membrana de DCs após infecção por BCG são escassos. Um estudo onde um coquetel de vacinas, incluindo a BCG-SSI, foi utilizado como ligantes de TLRs demonstrar que as moDCs aumentaram a expressão tanto de TLRs quanto de CD80, CD86, CD83 e CD197 (Schreibelt *et al.*, 2010). Entretanto, a maior parte dos estudos que descrevem a expressão desses TLRs utilizaram técnicas moleculares de detecção de RNA mensageiro, o que nem sempre correlaciona ao mesmo nível de expressão da proteína e nem a localização da mesma. Como isso, estudos utilizando citometria de fluxo e microscopia confocal demonstraram que em moDCs imaturas, as expressões de TLR2 e TLR4 são muito maiores em nível intracelular do que extracelular,

diferente do que acontece em outros tipos celulares, como monócitos, macrófagos e granulócitos (Uronen-Hansson *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2010). Apesar dessa diferença de localização, a participação desses receptores na resposta imunológica não pode ser excluída; entretanto, necessita de mais estudos.

Com relação a expressão de CD197, o aumento da expressão de CD197 já está bem caracterizada em mDCs (Jarrossay *et al.* 2001), entretanto, ainda é motivo de estudo em moDCs. Em um artigo onde moDCs foram estimuladas com CD40L, IFN-gama, PGE2 entre outros observou-se um aumento desse receptor de quimiocina quando todos estímulos foram adicionados a cultura (Dauer *et al.*, 2003). Outro trabalho, onde os autores compararam células imaturas com moDCs infectadas com BCG viva ou morta, demonstraram um aumento na expressão de CD197 em ambos os casos (Murray *et al.* 2007). Entretanto, alguns autores relataram que células dendríticas expressam altos níveis de receptores de quimiocinas quando em microambiente específico e caracterizam a funcionalidade migratória dessas células (Jarrossay *et al.*, 2001). Em suma, embora os estudos relatados apontem para um aumento da expressão de CCR7 (CD197) em células dendríticas e nesse manuscrito não obtivemos sucesso na marcação deste receptor, faz-se necessário relatar algumas diferenças que possam explicar este fato. Em primeira linha, os trabalhos citados utilizaram estímulos diferentes ou outra cepa de BCG. Além disso, a forte variação detectada por esses autores impossibilitou o estudo estatístico sendo os resultados por vezes apresentados como média de dois indivíduos apenas (Jarrossay *et al.*, 2001, Murray *et al.* 2007). Apesar desse fato, a participação desse receptor na infecção com BCG não pode ser excluída, sendo necessário mais estudo para avaliação da expressão dessa molécula utilizando diferentes condições de cultivo.

Neste estudo, ainda empregamos a vacina BCG Moreau irradiada, bem como irradiada e aquecida, no intuito de se gerar variáveis comparativas (controles negativos). No entanto, e ao contrário do esperado, as mesmas se mostraram eficazes na indução de maturação de moDCs quanto as vacinas com bacilos viáveis. O fato de irradiar e aquecer a vacina BCG nos pareceu não ter sido suficiente para desnaturar antígenos da bactéria e assim inibir a maturação das moDCs. De fato, a expressão da maioria dos marcadores testados se mostrou semelhante aquela com a vacina BCG irradiada (resíduos antigênicos preservados), com exceção de CD86. O fato de bacilos mortos gerarem expressão de marcadores de ativação semelhante a bacilos vivos está de acordo com outros estudos que mostraram bactérias mortas por calor sendo reconhecidas e internalizadas pelas DCs (Demangel e Britton, 2000, Murray *et al.* 2007).

Tem sido amplamente estipulado que a inflamação é uma resposta fundamental para a defesa do organismo, e a mesma está diretamente associada a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Zhang *et al.*, 2013). Os sinais emitidos por essas moléculas solúveis são complexos e dependem de combinações com ações antagonistas e sinérgicas sutis, de forma que a “mensagem” transmitida poderá ser proporcional ao número de células e à densidade do receptor na superfície celular, assim como à combinação de citocinas (Henry, 2008). DCs infectadas com micobacterias demonstraram um aumento da capacidade de liberar citocinas pró-inflamatórias, tornando-se um potente indutor de células produtoras de IFN- γ (Demangel e Britton, 2000). Ao mesmo tempo, quando o balanço da liberação dessas moléculas está desajustado, elas tornam-se um importante co-fator na patogênese de doenças crônicas, como a tuberculose (Zhang *et al.*, 2013).

No presente estudo, demonstramos que moDCs infectadas com BCG não induziram a liberação de IL-1 α . Entretanto, não se pode descartar o papel de IL-1 neste contexto. A família IL-1 é extensa, sendo IL-1 α e IL-1 β seus principais membros (Nakae *et al.*, 2001). A diferença funcional entre estas duas citocinas ainda necessita ser completamente elucidada. De relevância, estudos vêm demonstrando o aumento de IL-1 β em moDCs murinas infectadas com BCG (Zhang *et al.*, 2013; Bollampalli *et al.*, 2015).

Nosso estudo também mostrou que quando moDCs foram infectadas com BCG Moreau, ocorreu um aumento da liberação de TNF- α . Esse aumento vai de acordo com outros estudos (Zhang *et al.*, 2013, Elkord *et al.*, 2005, Demangel e Britton, 2000). Além disso, essa citocina induz a liberação de mediadores para a maturação, de uma maneira autócrina, de DCs quando infectadas com micobactérias (Demangel e Britton, 2000). Esta pode ser uma característica especial de micobactérias, uma vez que a maturação de DCs induzida pela vacina BCG é bloqueada por anticorpos anti-TNF- α (Thurnher *et al.*, 1997). Este fato não ocorre quando a ativação de DCs é resultante de estímulo com LPS ou infectadas com outras bactérias, como *Streptococcus gordinii* (Corinti *et al.*, 1999). Além disso, nossos resultados demonstram que a liberação dessa citocina nos pareceu ser proporcional a quantidade de bacilos presentes, haja vista os resultados obtidos com as diferentes diluições da vacina dentro do mesmo lote. Vale ressaltar, que a mesma não parece ter relação com a viabilidade do bacilo, pois a irradiação da vacina ainda demonstrou um aumento na liberação desta citocina.

A IL-18 tem um papel importante na indução de IFN- γ por células T, juntamente com IL-12 (Szpakowski *et al.*, 2015). Entretanto, a maior parte dos estudos que demonstram o envolvimento dessa citocina foram feitos utilizando células murinas ou PBMC (Vankayalapati

et al., 2000; Biet *et al.*, 2002; Szpakowski *et al.*, 2015). Infelizmente, ainda existem poucos estudos que correlacionem a liberação de IL-18 e DCs humanas. Por outro lado, nossos resultados mostram não ter ocorrido diferença na liberação de IL-18 quando as moDCs foram infectadas com BCG. Além disso, os macrófagos apresentaram uma maior liberação dessa citocina, seja espontânea ou quando estimulados com LPS, comparados as moDCs, inferindo que as últimas não sejam as principais responsáveis pela liberação de IL-18.

O presente estudo demonstrou não haver alteração na secreção de IL-12 quando as moDCs foram infectadas com BCG. Entretanto, essa citocina vem sendo descrita como crucial para a diferenciação de células T virgens, em células Th1 e indutoras de IFN-gama (Zhang *et al.*, 2013). Apesar da importância de IL-12 na interação de APCs e linfócitos, sua liberação por DCs geradas *in vitro* ainda é controversa. Alguns estudos já mostraram que mDCs, moDCs ou DCs derivadas de medula-óssea murina aumentam a liberação de IL-12 (Zhang *et al.*, 2013, Demangel e Britton, 2000, Elkord *et al.*, 2005, Tsuji *et al.*, 2000). Entretanto, este aumento de secreção está associado ao estímulo via CD40 na infecção por micobactérias (Demangel e Britton, 2000). Paralelamente, o presente estudo falhou em demonstrar um aumento expressivo de CD40 durante a infecção por BCG das moDCs. Fol e colaboradores (2016) sugerem que a síntese de IL-12 por moDCs necessite de um estímulo adicional para iniciar o processo de produção. Além disso, outros estudos demonstraram que *M. bovis* induziu preferencialmente a produção de IL-23, citocina que compartilha a subunidade p40 com IL-12, em moDCs murinas (Zhang *et al.*, 2013, Fol *et al.*, 2016) e moDCs humanas (Fol *et al.*, 2016). Infelizmente, este fato não pode ser verificado no presente estudo.

Com relação a IL-10, os resultados obtidos demonstraram não ter havido diferença na liberação dessa citocina, quando moDCs foram estimuladas com LPS ou quando infectadas com BCG. Entretanto assim como IL-12, a liberação de IL-10 ainda é controversa quando se trata de moDCs. Por um lado, estudos mostram um aumento de IL-10 em moDCs infectadas com BCG ou estimuladas com LPS (Fol *et al.*, 2016). Outros estudos mostram que moDCs estimuladas com LPS e geradas a partir de monócitos separados por microesferas de seleção positiva tem a liberação de IL-10 inibida quando comparadas a moDCs provenientes de monócitos isolados por aderência (Elkord *et al.*, 2005). Além disso, Sanarico e colaboradores (2011) mostraram que a liberação de IL-10 depende da cepa de BCG empregada, o qual a BCG japonesa falhou nesse contexto quando comparada a cepa Aventis Pasteur (Sanarico *et al.*, 2011). Sendo a cepa japonesa próxima a cepa Moreau na genealogia, é possível que haja uma semelhança imunogênica maior.

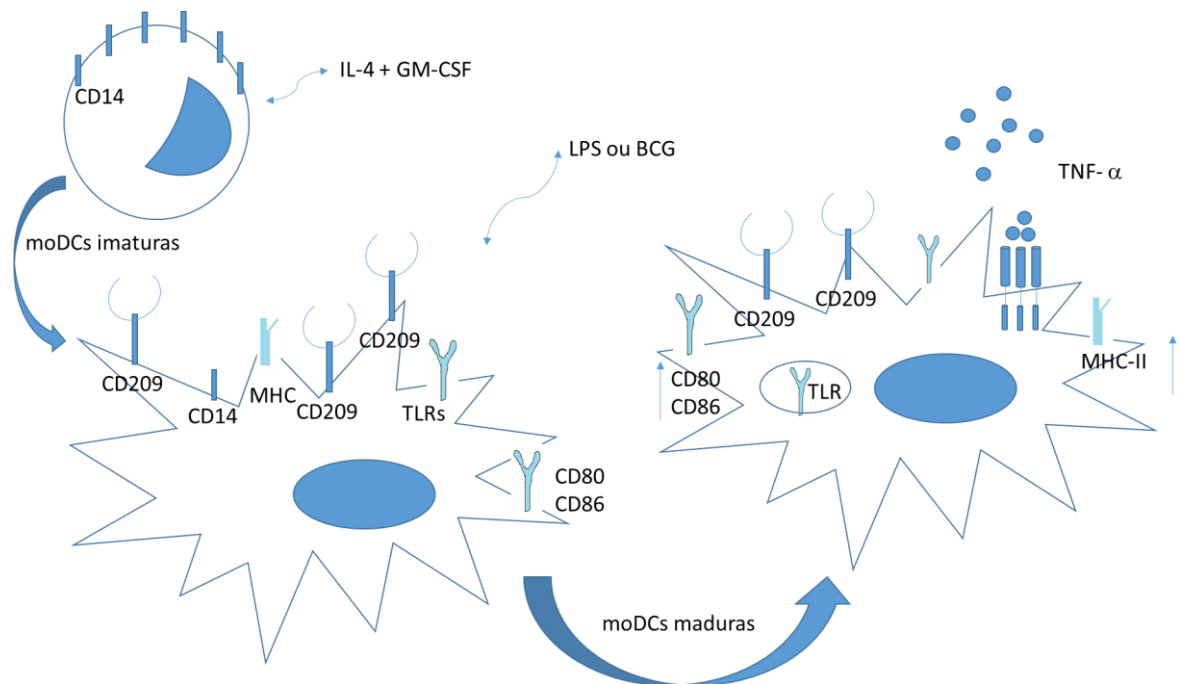
As DCs são utilizadas no desenvolvimento de imunoterapias contra o câncer, bem como o tratamento de doenças auto-imunes. Devido ao papel essencial das DCs na infecção por vários patógenos, elas vêm sendo investigadas como um possível alvo terapêutico.

Estudos para a padronização de um protocolo de diferenciação, focando no método de isolamento de monócitos, vêm comparando algumas das principais técnicas utilizadas como separação por aderência, microesferas magnéticas e separação por cell sorting (Elkord *et al.*, 2005; Delirez *et al.*, 2013; El-Sahrigy *et al.*, 2015). Entretanto, os estudos envolvendo separação por microesferas geralmente utilizam a seleção positiva em comparação a aderência em plástico. Há poucos estudos que comparem os métodos de seleção positiva e negativa por microesferas magnéticas (Fol *et al.*, 2016).

O presente trabalho sugere uma diferença na capacidade de internalizar a BCG, no perfil fenotípico e na liberação de citocinas quando moDCs são provenientes de monócitos isolados por seleção positiva e negativa. A partir dos resultados obtidos, observou-se que as moDCs via seleção negativa e infectadas com BCG, em sua maioria, tendem a ter uma maior expressão de CD86, CD40, liberação de IL-12 e contagem de colônias quando comparadas àquelas provenientes da seleção positiva. Por sua vez, as moDCs via seleção positiva tendem a ter maior expressão de CD80 e liberação de TNF- α , porém baixa contagem de colônias. Uma plausível explicação recai na ativação do monócito ao se ligar nas microesferas de seleção positiva, e assim revestidas de anti-CD14, já que o mesmo auxilia na resposta via TLR e sua ativação (Kelley *et al.*, 2013). Entretanto, estudos comparativos utilizando um único indivíduo devem ser feitos para a confirmação desse resultado pois a amostragem aqui realizada dificultou análises adicionais. Mesmo assim, estudos mostraram que o método de isolamento não resultou em diferença na expressão de CD40, CD80, CD86, HLA-DR, CD83 e CD209, porém quando se comparou a liberação de citocinas observou-se níveis distintos da mesma citocina de acordo com o método empregado (Elkord *et al.*, 2005; El-Sahrigy *et al.*, 2015; Fol *et al.*, 2016). Apesar disso, tendências foram evidentes para CD86, CD80, CD40, TNF-a e IL-12 no presente estudo. Comparações adicionais são dificultadas devido a diferenças inerentes a cada abordagem, visto que o emprego de distintos MOI (*Multiplicity of infection*), cepas de BCG, voluntários vacinados ou não, tempo de infecção, entre outros.

Os principais resultados obtidos no presente estudo foram sintetizados no esquema a baixo (Figura 30).

Figura 30: Esquema dos resultados obtidos



Esquema representando a diferenciação de monócitos em moDCs imaturas pela adição de IL-4 + GM-CSF (500UI/ml cada) por 5 dias. Como a diferenciação as células diminuem a expressão de CD14 e passam a expressar CD209 em sua membrana. Além disso as moDCs imaturas expressam em sua membrana TLRs, MHC Classe I e II, CD86 e em menor nível CD80. Quando essas células imaturas foram estimuladas com LPS (0,5µg/ml) ou BCG elas sofreram um processo de maturação, pelo qual ocorreu um aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, moléculas de MHC classe II, além da liberação de TNF- α , que poderia agir de maneira autócrina participando do processo de maturação da moDC. Além disso, as moléculas de TLR poderiam estar localizadas no interior das células.

6. CONCLUSÃO

- O isolamento de monócitos por microesferas magnéticas se mostrou mais eficiente do que as demais técnicas utilizadas. Apresentando uma fácil execução e uma melhor pureza final de monócitos.
- Com a padronização da geração de moDCs, conclui-se que as células cultivadas em RPMI apresentaram melhor diferenciação quando comparadas as cultivadas em DMEM. Já a comparação entre os cultivos com SFB e SH não apresentaram diferenças tanto morfológica quanto fenotípica, entretanto o SH foi eleito. Com relação a concentração de citocinas utilizadas ambas as concentrações testadas se mostraram eficientes, na maioria dos doadores testados. Todavia a maior concentração foi escolhida devido ao doador menos responsivo. A comparação entre tubo e placa mostrou melhor resultado no cultivo em placa. Por fim, a escolha do método de isolamento de monócitos por microesferas em seleção positiva e negativa demonstraram diferenças quanto características fenotípicas das moDCs e na liberação de citocinas.
- TNF- α e CD80 apresentaram melhores resultados de proporcionalidade entre as diluições de BCG utilizadas, sendo eleitos como candidatos para marcadores em um teste de potência. Entretanto, as diluições mais espessadas entre si devem ser testadas para a confirmação desses resultados. A maturação das moDCs gerada pela BCG, em nossas condições experimentais, quando analisada por outros marcadores aqui utilizados, não demonstraram dose-dependência.

7. PERSPECTIVAS

Com os resultados descritos nesse manuscrito, ficam como perspectivas: 1) definir o isolamento de monócitos por seleção negativa ou positiva utilizando o mesmo doador para cada processo e analisar a expressão de CD80 e TNF a 2) testar diluições mais espessadas (1:10; 1:60; 1:120 e 1:180) 3) Avaliar a liberação de outras citocinas e de sCD40 4) Comparar o ensaio de UFC com o ensaio então proposto 5) Avaliar a reprodutibilidade em lotes distintos com mesmo laudo técnico 6) Testar a viabilidade do ensaio em células THP-1.

REFERÊNCIAS

AACHOUI, Y. et al. **Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection.** *Curr Opin Microbiol*, v. 16, n. 3, p. 319-26, Jun 2013. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707339> >.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. **Imunologia Celular e Molecular.** 6ª edição. 2007. p 113-122.

ALBERTS, B.; JOHNSON A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell.** 5.ed. ARTMED EDITORA S.A., 2007.p.1115-1121

ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. **T-cell regulation by CD28 and CTLA-4.** *Nat Rev Immunol*, v. 1, n. 3, p. 220-8, Dec 2001. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905831> >.

AMERICAN THORACIC SOCIETY AND CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (4 pt 1): 1376–139

ANTAS, P.R.Z. **Novel Recombinant BCG Vaccines: Do the Ordinary Platforms Matter?** *J Anc Dis Prev Rem* v. 2 :108, Dec 2013. Disponível em: <<http://esciencecentral.org/journals/novel-recombinant-bcg-vaccines-do-the-ordinary-platforms-matter-2329-8731.1000108.php?aid=24995>>

BANCHEREAU, J. et al. **Immunobiology of dendritic cells.** *Annu Rev Immunol*, v. 18, p. 767-811, 2000. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837075>>.

BASU, S. et al. **Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS).** *J Vis Exp*, n. 41, 2010. ISSN 1940-087X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644514>>.

BEHR, M. A.; SMALL, P. M. **A historical and molecular phylogeny of BCG strains.** *Vaccine*, v. 17, n. 7-8, p. 915-22, Feb 1999. ISSN 0264-410X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10067698>>.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T. C. et al. **BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis-review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 5, p. 459-65, Aug 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16184220>>.

BERGER, C. et al. **Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy.** *Blood*, v. 116, n. 23, p. 4838-47, Dec 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720185>>.

BIET, F. et al. **Mycobacterium bovis BCG producing interleukin-18 increases antigen-specific gamma interferon production in mice.** *Infect Immun*, v. 70, n. 12, p. 6549-57, Dec 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438324> >.

BLAIR, P. J. et al. **CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis.** *J Exp Med*, v. 191, n. 4, p. 651-60, Feb 2000. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684857>>.

BOL, K. F. et al. **Prophylactic vaccines are potent activators of monocyte-derived dendritic cells and drive effective anti-tumor responses in melanoma patients at the cost of toxicity.** *Cancer Immunol Immunother*, v. 65, n. 3, p. 327-39, Mar 2016. ISSN 1432-0851. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26861670>>.

BOLLAMPALLI, V. P. et al. **BCG Skin Infection Triggers IL-1R-MyD88-Dependent Migration of EpCAMlow CD11bhigh Skin Dendritic cells to Draining Lymph Node During CD4+ T-Cell Priming.** *PLoS Pathog*, v. 11, n. 10, p. e1005206, Oct 2015. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26440518>>.

BOURGEOIS, C.; ROCHA, B.; TANCHOT, C. **A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory.** *Science*, v. 297, n. 5589, p. 2060-3, Sep 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242444>>.

CAUX, C. et al. **CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha.** *Adv Exp Med Biol*, v. 417, p. 21-5, 1997. ISSN 0065-2598. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286332>>.

CAUX, C. et al. **CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha.** *J Exp Med*, v. 184, n. 2, p. 695-706, Aug 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760823>>.

CELLA, M.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. **Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells.** *Curr Opin Immunol*, v. 9, n. 1, p. 10-6, Feb 1997. ISSN 0952-7915. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039784>>.

CERNADAS, M. et al. **CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells.** *Clin Exp Immunol*, v. 155, n. 3, p. 523-33, Mar 2009. ISSN 1365-2249. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220838>>.

CHEADLE, E. J.; SELBY, P. J.; JACKSON, A. M. **Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin-infected dendritic cells potently activate autologous T cells via a B7 and interleukin-12-dependent mechanism.** *Immunology*, v. 108, n. 1, p. 79-88, Jan 2003. ISSN 0019-2805. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519306>>.

CHEE, C. B. et al. **Diagnosis and treatment of latent infection with Mycobacterium tuberculosis.** *Respirology*, v. 18, n. 2, p. 205-16, Feb 2013. ISSN 1440-1843. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23107218>>.

COLLIN, M. et al. **Human dendritic cell deficiency: the missing ID?** *Nat Rev Immunol*, v. 11, n. 9, p. 575-83, Sep 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21852794>>.

COMAS, I.; GAGNEUX, S. **The past and future of tuberculosis research.** PLoS Pathog, v. 5, n. 10, p. e1000600, Oct 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855821>>.

COMSTOCK, G. W. **Epidemiology of tuberculosis.** Am Rev Respir Dis, v. 125, n. 3 Pt 2, p. 8-15, Mar 1982. ISSN 0003-0805. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7073104>>.

COOPER, A. M. **T cells in mycobacterial infection and disease.** Curr Opin Immunol, v. 21, n. 4, p. 378-84, Aug 2009. ISSN 1879-0372. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646851>>.

COQUERY, C. M. et al. **Optimized protocol for the isolation of spleen-resident murine neutrophils.** Cytometry A, v. 81, n. 9, p. 806-14, Sep 2012. ISSN 1552-4930. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760952>>

CORINTI, S. et al. **Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions.** J Immunol, v. 166, n. 7, p. 4312-8, Apr 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254683>>.

CORINTI, S. et al. **Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4+ T lymphocytes.** J Immunol, v. 163, n. 6, p. 3029-36, Sep 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477566>>.

DAIGNEAULT, M. et al. **Monocytes regulate the mechanism of T-cell death by inducing Fas-mediated apoptosis during bacterial infection.** PLoS Pathog, v. 8, n. 7, p. e1002814, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829769>>.

DALGAARD, J.; BECKSTRØM, K. J.; BRINCHMANN, J. E. **Uptake of Apoptotic K562 Leukaemia Cells by Immature Dendritic Cells is Greatly Facilitated by Serum.** Scand J Immunol, v. 58, n. 5, p. 541-9, Nov 2003. ISSN 0300-9475. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14629626>>.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. **The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease.** Gut, v. 53, n. 7, p. 1035-43, Jul 2004. ISSN 0017-5749. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194658>>.

DARTOIS, V. **The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells.** Nat Rev Microbiol, v. 12, n. 3, p. 159-67, Mar 2014. ISSN 1740-1534. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487820>>.

DAUER, M. et al. **Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors.** J Immunol, v. 170, n. 8, p. 4069-76, Apr 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682236>>

DELIREZH, N. et al. **Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells.** Cell J, v. 15, n. 3, p. 218-23, 2013. ISSN 2228-5806. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24027662>>.

DEMANGEL, C. et al. **Protection against aerosol Mycobacterium tuberculosis infection using Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin-infected dendritic cells.** Eur J Immunol, v. 29, n. 6, p. 1972-9, Jun 1999. ISSN 0014-2980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10382760>>.

DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. **Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts.** Immunol Cell Biol, v. 78, n. 4, p. 318-24, Aug 2000. ISSN 0818-9641. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10947855>>.

DORHOI, A.; REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. **For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection.** Immunol Rev, v. 240, n. 1, p. 235-51, Mar 2011. ISSN 1600-065X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349097>>.

DUCATI, R. G. et al. **The resumption of consumption - a review on tuberculosis.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 101, n. 7, p. 697-714, Nov 2006. ISSN 0074-0276. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160276>>.

ELKORD, E. et al. **Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells.** Immunology, v. 114, n. 2, p. 204-12, Feb 2005. ISSN 0019-2805. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15667565>>.

EL-SAHRIGY, S. A. et al. **Comparison between magnetic activated cell sorted monocytes and monocyte adherence techniques for in vitro generation of immature dendritic cells: an Egyptian trial.** Cent Eur J Immunol, v. 40, n. 1, p. 18-24, 2015. ISSN 1426-3912. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26155179>>.

FERGUSON, J. S.; SCHLESINGER, L. S. **Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis.** Tuber Lung Dis, v. 80, n. 4-5, p. 173-84, 2000. ISSN 0962-8479. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11052906>>.

FIGDOR, C. G. et al. **Dendritic cell immunotherapy: mapping the way.** Nat Med, v. 10, n. 5, p. 475-80, May 2004. ISSN 1078-8956. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122249>>.

FOL, M. N. B.; et al. **Evaluation of two different dendritic cell preparations with BCG reactivity.** Arch Biol Sci. v. 68(2), p263 - 271., 2016.

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; LIN, P. L. **Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis.** Mucosal Immunol, v. 4, n. 3, p. 271-8, May 2011. ISSN 1935-3456. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430653>>.

GAGLIARDI, M. C. et al. **Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production.** J Leukoc Biol, v. 78, n. 1, p. 106-13, Jul 2005. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845642>>.

GEIJTENBEEK, T. B. et al. **Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function.** J Exp Med, v. 197, n. 1, p. 7-17, Jan 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12515809>>.

GIUNTA, B.; REZAI-ZADEH, K.; TAN, J. **Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease.** CNS Neurol Disord Drug Targets, v. 9, n. 2, p. 149-55, Apr 2010. ISSN 1996-3181. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205645>>.

GOGOLAK, P. et al. **Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma.** Blood, v. 109, n. 2, p. 643-52, Jan 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968896>>.

GRANELLI-PIPERNO, A. et al. **Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction.** J Immunol, v. 175, n. 7, p. 4265-73, Oct 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177066>>.

GRASSI, F. et al. **Monocyte-derived dendritic cells have a phenotype comparable to that of dermal dendritic cells and display ultrastructural granules distinct from Birbeck granules.** J Leukoc Biol, v. 64, n. 4, p. 484-93, Oct 1998. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766629>>.

GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, E. et al. **Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets.** Front Immunol, v. 6, p. 363, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26236315>>.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. **Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis.** J Immunol, v. 159, n. 2, p. 635-43, Jul 1997. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218578>>.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais.** 20 edição. Barueri-SP: Manole, 2008.

HO, M. M. et al. **Report of an International collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains.** Vaccine, v. 29, n. 3, p. 512-8, Jan 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21055496>>.

JAKOBSEN, M. A.; MØLLER, B. K.; LILLEVANG, S. T. **Serum concentration of the growth medium markedly affects monocyte-derived dendritic cells' phenotype, cytokine production profile and capacities to stimulate in MLR.** Scand J Immunol, v. 60, n. 6, p. 584-91, Dec 2004. ISSN 0300-9475. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15584969>>.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. **Innate immune recognition**. *Annu Rev Immunol*, v. 20, p. 197-216, 2002. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861602>>.

JARROSSAY, D. et al. **Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells**. *Eur J Immunol*, v. 31, n. 11, p. 3388-93, Nov 2001. ISSN 0014-2980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745357>>.

JEFFORD, M. et al. **Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli**. *Blood*, v. 102, n. 5, p. 1753-63, Sep 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738673>>.

JENSEN, S. E. et al. **Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine**. *Biologicals*, v. 36, n. 5, p. 308-14, Sep 2008. ISSN 1045-1056. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614376>>.

KAPINA, M. A. et al. **CD27^{low} CD4 T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27^{high} precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection**. *J Immunol*, v. 178, n. 2, p. 976-85, Jan 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202360>>.

KARIMI, M. H.; POURFATHOLLAH, A. A. **CD40 and tolerance induction**. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, v. 11, n. 1, p. 1-13, Mar 2012. ISSN 1735-1502. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427471>>

KAUFMANN, S. H. **Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity**. *Trends Immunol*, v. 33, n. 7, p. 373-9, Jul 2012. ISSN 1471-4981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560865>>.

KAUFMANN, S. H.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P. H. **New vaccines for tuberculosis**. *Lancet*, v. 375, n. 9731, p. 2110-9, Jun 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488515>>.

KAUFMANN, S. H. **Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages**. *Ann Rheum Dis*, v. 61 Suppl 2, p. ii54-8, Nov 2002. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379623>>.

KELSALL, B. L. et al. **Dendritic cells at the host-pathogen interface**. *Nat Immunol*, v. 3, n. 8, p. 699-702, Aug 2002. ISSN 1529-2908. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145651>>.

KELLEY, S. L. et al. **The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket**. *J Immunol*, v. 190, n. 3, p. 1304-11, Feb 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264655>>.

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. **IL-23 and IL-17 in tuberculosis**. *Cytokine*, v. 41, n. 2, p. 79-83, Feb 2008. ISSN 1096-0023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218322>>.

KISHIMOTO, T. **Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology**. *Annu Rev Immunol*, v. 23, p. 1-21, 2005. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771564>>.

KNEZEVIC, I.; CORBEL M. J. **WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines**. *Vaccine*. v. 24. Paris (France): Pasteur Institute; 2006.; p. 3874–3877. Maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16755681>>

KOHLER, S. et al. **The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination**. *Eur J Immunol*, v. 42, n. 9, p. 2363-73, Sep 2012. ISSN 1521-4141. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733156>>.

LECHMANN, M. et al. **The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells**. *J Exp Med*, v. 194, n. 12, p. 1813-21, Dec 2001. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748282>>.

LINSLEY, P. S. et al. **Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors**. *Immunity*, v. 1, n. 9, p. 793-801, Dec 1994. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534620>>.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. **Dendritic cells: immune regulators in health and disease**. *Physiol Rev*, v. 82, n. 1, p. 97-130, Jan 2002. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773610>>.

LIU, F. et al. **Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation**. *Blood*, v. 90, n. 7, p. 2583-90, Oct 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326224>>.

LIU, J. et al. **BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy**. *Hum Vaccin*, v. 5, n. 2, p. 70-8, Feb 2009. ISSN 1554-8619. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164935>>.

LOZZA, L. et al. **Crosstalk between human DC subsets promotes antibacterial activity and CD8+ T-cell stimulation in response to bacille Calmette-Guérin**. *Eur J Immunol*, v. 44, n. 1, p. 80-92, Jan 2014. ISSN 1521-4141. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114554>>.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. **History of BCG Vaccine**. *Maedica (Buchar)*, v. 8, n. 1, p. 53-8, Mar 2013. ISSN 1841-9038. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24023600>>.

MA, D. Y.; CLARK, E. A. **The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells.** *Semin Immunol*, v. 21, n. 5, p. 265-72, Oct 2009. ISSN 1096-3618. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524453>>.

MARONGIU, L. et al. **ESAT-6 and HspX Improve the Effectiveness of BCG to Induce Human Dendritic Cells-Dependent Th1 and NK Cells Activation.** *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e75684, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130733>>.

MATHAN, T. S.; FIGDOR, C. G.; BUSCHOW, S.I. **Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network.** *Front Immunol.*, v. 12 p. Nov 2013 ISSN 2428-2405. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24282405>>

MARTIN, L. H. et al. **Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 24, p. 9189-93, Dec 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2447586>>.

MARTINO, A. et al. **Dendritic cells derived from BCG-infected precursors induce Th2-like immune response.** *J Leukoc Biol*, v. 76, n. 4, p. 827-34, Oct 2004. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240755>>.

MCSHANE, H. **Prime-boost immunization strategies for infectious diseases.** *Curr Opin Mol Ther*, v. 4, n. 1, p. 23-7, Feb 2002. ISSN 1464-8431. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883691>>.

MELENDRERAS, S. G. et al. **Soluble co-signaling molecules predict long-term graft outcome in kidney-transplanted patients.** *PLoS One*, v. 9, n. 12, p. e113396, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25478957>>

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. M. D. **Boletim Epidemiológico - Detectar, tratar e curar: Desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose.** Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 46 2015.

MOOTOO, A. et al. **TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality.** *Inflamm Allergy Drug Targets*, v. 8, n. 1, p. 53-62, Mar 2009. ISSN 2212-4055. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275693>>.

MOREL, C. et al. **Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice.** *Eur J Immunol*, v. 38, n. 2, p. 437-47, Feb 2008. ISSN 0014-2980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203135>>.

MOREL, S. et al. **Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity.** *Vaccine*, v. 29, n. 13, p. 2461-73, Mar 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256188>>.

MURRAY, P. R.; ROSENTTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6ª. 2009.

MURRAY, R. A. et al. **Mycobacterium leprae inhibits dendritic cell activation and maturation**. J Immunol, v. 178, n. 1, p. 338-44, Jan 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182571>>.

NAKAE, S. et al. **Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production**. Immunology, v. 104, n. 4, p. 402-9, Dec 2001. ISSN 0019-2805. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899425>>.

NONAKA, M. et al. **Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizes a novel ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal carcinomas**. J Biol Chem, v. 286, n. 25, p. 22403-13, Jun 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515679>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Meeting Report. WHO consultation on the characterization of BCG strains**, Imperial College, London, p. 15-16, Dec 2003

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Meeting Report. WHO consultation on the characterization of BCG vaccines**, Geneva, Switzerland, p. 8-9, Dec 2004

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Tuberculosis Report 2015** Ago.2015 Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Expert committee on Biological Standardization. Requirements for dried BCG vaccine**. Annex 2. WHO Technical Report Series No. 745, 1987; 60-92.

ORME, I. M.; COOPER, A. M. **Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis**. Immunol Today, v. 20, n. 7, p. 307-12, Jul 1999. ISSN 0167-5699. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10379048>>.

OTTENHOFF, T. H. **The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis**. Int J Tuberc Lung Dis, v. 16, n. 11, p. 1424-32, Nov 2012. ISSN 1815-7920. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23044443>>.

PAI, M. **Spectrum of latent tuberculosis - existing tests cannot resolve the underlying phenotypes**. Nat Rev Microbiol, v. 8, n. 3, p. 242; author reply 242, Mar 2010. ISSN 1740-1534. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084059>>.

PARRA, M. et al. **Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against Mycobacterium tuberculosis**. Clin Vaccine Immunol, v. 16, n. 7, p. 1025-32, Jul 2009. ISSN 1556-679X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458207>>.

PRÓCÓPIO, M. **Controle da Tuberculose uma proposta de integração ensino-serviço**. 7. Editora Fiocruz, 2014.

RAMAKRISHNAN, L. **Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis.** Nat Rev Immunol, v. 12, n. 5, p. 352-66, May 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517424>>.

REPNIK, U.; KNEZEVIC, M.; JERAS, M. **Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats.** Journal of Immunological Methods, 278: 283-292, Jul 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957415> >

ROACH, D. R. et al. **TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection.** J Immunol, v. 168, n. 9, p. 4620-7, May 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11971010>>.

RUSSELL, D. G. **Who puts the tubercle in tuberculosis?** Nat Rev Microbiol, v. 5, n. 1, p. 39-47, Jan 2007. ISSN 1740-1534. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160001>>.

SABATTÉ, J. et al. **Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function.** Cytokine Growth Factor Rev, v. 18, n. 1-2, p. 5-17, 2007 Feb-Apr 2007. ISSN 1359-6101. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17321783>>.

SANARICO, N. et al. **Different transcriptional profiles of human monocyte-derived dendritic cells infected with distinct strains of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin.** Clin Dev Immunol, v. 2011, p. 741051, 2011. ISSN 1740-2530. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21436989>>

SÁNCHEZ, D. et al. **Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage death.** Cell Immunol, v. 260, n. 2, p. 128-36, 2010. ISSN 1090-2163. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919859>>.

SANTOS, D. O. et al. **Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy.** Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi, v. 70, n. 1, p. 15-24, Feb 2001. ISSN 1342-3681. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244783>>.

SANTOS, D. O. et al. **The differential in vitro presentation of Mycobacterium leprae antigens by human dendritic cells is determined by the mechanism of host cell adhesion.** J of Clinical and Cellular Immunology, in press.

SASINDRAN, S. J.; TORRELLES, J. B. **Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium?** Front Microbiol, v. 2, p. 2, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21687401>>.

SATO, K.; YAMASHITA, N.; MATSUYAMA, T. **Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation**

of the phagocytosed necrotic cellular fragments. Cell Immunol, v. 215, n. 2, p. 186-94, Feb 2002. ISSN 0008-8749. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202155>>

SCHLUGER, N. W.; ROM, W. N. **The host immune response to tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med, v. 157, n. 3 Pt 1, p. 679-91, Mar 1998. ISSN 1073-449X. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9517576>>.

SCHOLLER, N. et al. **Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity.** J Immunol, v. 168, n. 6, p. 2599-602, Mar 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884422>>.

SCHÖNBECK, U.; LIBBY, P. **The CD40/CD154 receptor/ligand dyad.** Cell Mol Life Sci, v. 58, n. 1, p. 4-43, Jan 2001. ISSN 1420-682X. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229815>>.

SCHREIBELT, G. et al. **Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy.** Cancer Immunol Immunother, v. 59, n. 10, p. 1573-82, Oct 2010. ISSN 1432-0851. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204387>>.

SHANKAR, G. et al. **Validation of the COSTIM bioassay for dendritic cell potency.** J Pharm Biomed Anal, v. 36, n. 2, p. 285-94, Oct 2004. ISSN 0731-7085. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496321>>.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. **The B7-CD28 superfamily.** Nat Rev Immunol, v. 2, n. 2, p. 116-26, Feb 2002. ISSN 1474-1733. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910893>>.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. **Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.** Nat Rev Immunol, v. 7, n. 1, p. 19-30, Jan 2007. ISSN 1474-1733. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170756>>.

SIA, J. K.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J. **Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between Mycobacterium tuberculosis and Innate Immune Cells.** J Immunol Res, v. 2015, p. 747543, 2015. ISSN 2314-7156. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26258152>>.

SIDDIQUI, S.; VISVABHARATHY, L.; WANG, C. R. **Role of Group 1 CD1-Restricted T Cells in Infectious Disease.** Front Immunol, v. 6, p. 337, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26175733>>.

SILVA, W. S. **Aplicação de Novos Métodos de Controle de Qualidade na Fabricação da Vacina BCG Moreau RDJ do Programa Nacional de Imunizações.** 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013

SILVA MIRANDA, M. et al. **The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?** Clin Dev Immunol, v. 2012, p. 139127, 2012. ISSN 1740-2530. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811737>>.

SIMAS, C. J. 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. 6446-50, Sep 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745518>>.

STEINMAN, R. M. **The dendritic cell system and its role in immunogenicity.** Annu Rev Immunol, v. 9, p. 271-96, 1991. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1910679>>.

STEINMAN, R. M. **DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells.** Cell, v. 100, n. 5, p. 491-4, Mar 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721985>>.

SUGAWARA, I. et al. **Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection.** Microbiol Immunol, v. 45, n. 11, p. 743-50, 2001. ISSN 0385-5600. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11791667>>.

SVAJGER, U.; JERAS M. **Optimal dendritic cell differentiation in rpmi media requires the absence of HEPES buffer.** Immunol Invest., v. 40(4), p. 413-426, 2011

SZPAKOWSKI, P. et al. **Dendritic Cell Activity Driven by Recombinant Mycobacterium bovis BCG Producing Human IL-18, in Healthy BCG Vaccinated Adults.** J Immunol Res, v. 2015, p. 359153, 2015. ISSN 2314-7156. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339658>>.

THURNHER, M. et al. **In vitro generation of CD83+ human blood dendritic cells for active tumor immunotherapy.** Exp Hematol, v. 25, n. 3, p. 232-7, Mar 1997. ISSN 0301-472X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9091299>>.

TONUS, M. E. D. M. M. **Controle do ensaio de viabilidade da vacina BCG: da otimização à validação.** 2005. (Monografia (especialização)). INCQS/FIOCRUZ

TORRES-AGUILAR, H. et al. **Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells.** J Immunol, v. 184, n. 4, p. 1765-75, Feb 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083662>>.

TSUJI, S. et al. **Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors.** Infect Immun, v. 68, n. 12, p. 6883-90, Dec 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083809>>.

UEDA, Y. et al. **IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia.** *J Immunol*, v. 182, n. 10, p. 6477-84, May 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414802>>.

URONEN-HANSSON, H. et al. **Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria.** *Immunology*, v. 111, n. 2, p. 173-8, Feb 2004. ISSN 0019-2805. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15027902>>.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H.; VAN DER MEER, J. W. **Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis.** *Clin Microbiol Rev*, v. 15, n. 2, p. 294-309, Apr 2002. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932234>>.

VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. **DC-SIGN: escape mechanism for pathogens.** *Nat Rev Immunol*, v. 3, n. 9, p. 697-709, Sep 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949494>>.

VANKAYALAPATI, R. et al. **Production of interleukin-18 in human tuberculosis.** *J Infect Dis*, v. 182, n. 1, p. 234-9, Jul 2000. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882602>>.

VERVER, S. et al. **Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis.** *Am J Respir Crit Care Med*, v. 171, n. 12, p. 1430-5, Jun 2005. ISSN 1073-449X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831840>>.

WALLET, M. A.; SEN, P.; TISCH, R. **Immunoregulation of dendritic cells.** *Clin Med Res*, v. 3, n. 3, p. 166-75, Aug 2005. ISSN 1539-4182. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160071>>.

WU, X.; LIN, M.; LI, Y.; ZHAO, X.; YAN F. **Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells.** *Cytotechnology*, v. 59, n. 2, p. 103-111, Mar 2009.

ZHANG, X. et al. **Mycobacterium bovis and BCG induce different patterns of cytokine and chemokine production in dendritic cells and differentiation patterns in CD4+ T cells.** *Microbiology*, v. 159, n. Pt 2, p.366-79, Feb 2013. ISSN 1465-2080. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23223441>>.

ZHOU, T. et al. **DC-SIGN and immunoregulation.** *Cell Mol Immunol*, v. 3, n. 4, p. 279-83, Aug 2006. ISSN 1672-7681. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978536>>.