



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



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**PERFIS TRANSCRICIONAIS ASSOCIADOS À IMUNIZAÇÃO COM A VACINA
BCG E MODULAÇÃO DO GENE *RAB11A* NA TUBERCULOSE**

SCARLET TORRES MORAES MOTA

Salvador - Bahia

2022

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PERFIS TRANSCRICIONAIS ASSOCIADOS À IMUNIZAÇÃO COM A VACINA
BCG E MODULAÇÃO DO GENE *RAB11A* NA TUBERCULOSE**

SCARLET TORRES MORAES MOTA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa

Salvador – Bahia

2022

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

M917p Mota, Scarlet Torres Moraes.

Perfis transcricionais associados à imunização com a vacina BCG e modulação do gene RAB11A na tuberculose/ Scarlet Torres Moraes Mota. _ Salvador, 2022.

96 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa

Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Tuberculose. 2. BCG. 3. Expressão gênica. 4. RAB11. I.
Título.

CDU 616-002.5

PERFIS TRANSCRICIONAIS ASSOCIADOS À IMUNIZAÇÃO COM A VACINA BCG E MODULAÇÃO DO GENE RAB11A NA TUBERCULOSE ".

Scarlet Torres Moraes Mota

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 31 de outubro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



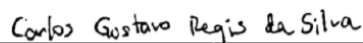
Dr. Ryan dos Santos Costa
Professor
UFBA




Dra. Natália Machado Tavares
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Pablo Ivan Pereira Ramos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Aos meus pais, João Carlos e Ana Maria,
meus grandes exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Theolis, pela dedicação, confiança e ensinamentos.

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

A nossa colaboradora, Dra Juliana Perrone, pelo apoio no silenciamento gênico pela metodologia do RNA de interferência.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz Pernambuco, por fornecer o acesso à estrutura de laboratório NB3, crucial para a realização de parte dos experimentos deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial Paulinha, Mila e Ivan que estiveram comigo em todas as etapas, me dando forças, suporte e trazendo alegrias aos meus dias.

Aos estudantes, Sara Nunes de Oliveira Araújo do LAIPHE e Ivanilson Pimenta Santos do LETI, por terem cedido o RNA de células HACAT e as células HepG2, respectivamente, essenciais para as etapas de padronização do RT-qPCR.

A agência de fomento FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) por proporcionar o auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho a partir da concessão da minha bolsa de estudos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À UFBA/FIOCRUZ e ao Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina - UFBA, instituições associadas e departamento que estão vinculados ao programa de pós-graduação em Patologia.

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

MOTA, Scarlet Torres Moraes. **Perfis transcricionais associados à imunização com a vacina BCG e modulação do gene *RAB11A* na tuberculose**. 2022. 96 f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tuberculose (TB) é uma doença de difícil controle e os mecanismos envolvidos na progressão da doença não são totalmente estabelecidos. Transcriptomas vem sendo estudados com o objetivo de identificar potenciais alvos que auxiliem no entendimento dos processos envolvidos na TB e no desenvolvimento de estratégias para o combate da doença. Não há dados na literatura sobre como a vacinação com a BCG, apontada com a capacidade de modular a resposta do hospedeiro, pode impactar nestes estudos. **OBJETIVO:** Identificar os perfis transcricionais associados à imunização com a vacina BCG e à tuberculose e o possível papel do gene *RAB11A* na doença. **MATERIAL E MÉTODOS:** Duas metanálises utilizando dados de transcriptoma de sangue total obtidos nos repositórios GEO e SRA NCBI foram conduzidos para identificação de genes diferencialmente expressos dentro do grupo de indivíduos vacinados e não vacinados com a BCG que possuíam as formas ativa e latente da TB e controles não infectados. Validação experimental e avaliações in vitro foram conduzidas para avaliação em especial do gene *RAB11A*. **RESULTADOS:** Na metanálise do GEO, ao comparar os grupos dos controles, dos indivíduos com TB ativa e latente que não foram vacinados, observou-se 100 genes (92 modulados negativamente e 8 modulados positivamente), associados principalmente com vias e funções ligadas ao metabolismo. Já entre os indivíduos vacinados, comparando-se os mesmos grupos, foram observados 53 genes, sendo 18 superexpressos e 35 subexpressos, associados principalmente aos processos de imunidade. Para a metanálise pelo SRA, verifica-se também perfis gênicos distintos ligados à vacina, com 5 genes subexpressos identificados para os vacinados e 2 genes (1 super e 1 subexpresso) para os não vacinados. Um dos genes apontados na metanálise como superexpresso em indivíduos com a TB ativa e não vacinados com a BCG, quando comparados àqueles vacinados, o *RAB11A*, também foi apontado com valores médios de expressão maiores em indivíduos com o mesmo perfil, em amostras de sangue total de uma coorte de pacientes da nossa população, corroborando com os dados da metanálise. Valores de expressão deste gene também foram menores em células THP-1 infectadas com a cepa vacinal BCG em comparação com as não infectadas. **CONCLUSÃO:** A imunização prévia com a vacina BCG interfere na modulação de genes específicos do hospedeiro, em especial para o gene *RAB11A*, um alvo que merece ser melhor estudado na tuberculose.

Palavras-chave: Tuberculose. BCG. Expressão gênica. RAB11.

MOTA, Scarlet Torres Moraes. **Transcriptional profiles associated with immunization BCG and *RAB11A* modulation in tuberculosis**. 2022. 96 f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis (TB) is a disease difficult to manage and the mechanisms involved in disease progression are not fully established. Transcriptomes have been studied with the objective of identifying potential targets that help in the understanding of the processes involved in TB and in the development of strategies against disease. There is no data in the literature on how BCG vaccination, which has been shown to have the ability to modulate the host response, may impact these studies. **AIM:** To identify the transcriptional profiles associated with immunization BCG and tuberculosis and the possible role of the *RAB11A* gene in the disease. **MATERIAL AND METHODS:** Two meta-analyses using whole blood transcriptome data obtained from the GEO and SRA NCBI repositories were conducted to identify differentially expressed genes within the group of BCG vaccinated and unvaccinated individuals who had active and latent forms of TB and non-infected controls. Experimental validation and in vitro evaluations were conducted to evaluate of the *RAB11A* gene. **RESULTS:** In the GEO meta-analyses, when comparing the groups of controls, individuals with active and latent TB that were unvaccinated, 100 genes were observed (92 down-regulated and 8 up-regulated), mainly associated with pathways and functions linked to metabolism. Among vaccinated individuals, comparing the same groups, 53 genes were observed, being 18 overexpressed and 35 underexpressed, mainly linked to immunity processes. For the SRA meta-analysis, distinct vaccine-linked gene profiles were also verified, with 5 underexpressed genes identified for the vaccinated and 2 genes (1 over and 1 underexpressed) for the unvaccinated. One of the genes identified in the meta-analysis as overexpressed in individuals with active TB and unvaccinated with BCG, when compared to those vaccinated, *RAB11A*, was also identified with higher mean expression values in individuals with the same profile, in whole blood samples from a cohort of patients in our population, corroborating the meta-analysis data. Expression values of this gene were also lower in THP-1 cells infected with the BCG vaccine strain compared to non-infected ones. **CONCLUSION:** Prior immunization with the BCG vaccine interferes with the modulation of specific host genes, especially for the *RAB11A* gene, a target that deserves to be better studied in tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis. BCG. Gene expression. RAB11.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Risco de adoecimento por tuberculose em populações vulneráveis em comparação ao risco da população geral	19
Figura 2	Dez principais causas de morte nos países de renda baixa (gráfico à esquerda) e renda média baixa (gráfico à direita), em 2019	21
Figura 3	Patogênese da TB	23
Figura 4	Classificação da resistência às drogas do tratamento para TB	27
Figura 5	Cobertura vacinal para a BCG no Brasil nos anos de 2015 até 2022	28
Figura 6	Aplicações da BCG na imunoterapia do câncer e doenças auto-imunes	29
Figura 7	Representação esquemática do desenho de estudo	38
Figura 8	Seleção dos conjuntos de dados do GEO	39
Figura 9	Triagem realizada no repositório SRA	41
Figura 10	Representação da Análise de Componente Principal realizada com as amostras pertencentes aos grupos CNI, ITBL e TBA dos conjuntos de dados do GEO	44
Figura 11	Definição dos grupos de comparação utilizados para definição dos GDEs nas análises do GEO	45
Figura 12	Definição dos grupos de comparação utilizados para definição dos GDEs nas análises do SRA	46
Figura 13	Expressão dos genes <i>RAB25</i> e <i>RAB11B</i> em PBMC's	57
Figura 14	Expressão do gene <i>RAB25</i> no pool das amostras de indivíduos com tuberculose ativa vacinados ou não com a BCG	57
Figura 15	GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados na metanálise do GEO	61
Figura 16	Diagrama de Venn com os GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados na metanálise do GEO	62
Figura 17	GDEs encontrados no Grupo 3 – Não vacinados vs Vacinados, Comparação C: TBA BCG- vs TBA BCG+, na metanálise do GEO	63
Figura 18	Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos não vacinados e no grupo dos vacinados - metanálise GEO	66
Figura 19	Diagrama de Venn com os GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados nas metanálises do GEO e do SRA	67

Figura 20	GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados na metanálise do SRA	69
Figura 21	Diagrama de Venn com os GDEs encontrados no grupo 3 - não vacinados vs vacinados, na metanálise do SRA	70
Figura 22	GDEs encontrados no grupo 3 - não vacinados vs vacinados, na metanálise do SRA	70
Figura 23	Expressão diferencial do gene <i>RAB11A</i> em indivíduos com TBA BCG- vs TBA BCG+, normalizados pelo gene endógeno ACTB	75
Figura 24	Nível de virulência das cepas de micobactérias	76
Figura 25	Expressão diferencial do gene <i>RAB11A</i> em células THP-1 infectadas ou não com diferentes cepas de micobactérias nos tempos de 24h e 48h	77
Figura 26	Expressão diferencial do gene <i>RAB11A</i> após silenciamento gênico em células THP-1 infectadas ou não com a BCG. NI: Não infectado	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes biomarcadores candidatos para distinção entre os estados da tuberculose	32
Tabela 2	Características dos conjuntos de dados do GEO	40
Tabela 3	Descrição das bibliotecas encontradas no repositório SRA	42
Tabela 4	Sequências de primers desenhados para os genes-alvo e endógenos. F=Foward e R=Reverse	47
Tabela 5	Características dos indivíduos com tuberculose ativa não vacinados e vacinados com a BCG	48
Tabela 6	Quantificação das amostras de RNA obtidas de sangue total dos indivíduos com tuberculose ativa	52
Tabela 7	Quantificação das amostras de RNA obtidas das células THP-1 infectadas ou não com as cepas de micobactérias	53
Tabela 8	Quantificação das amostras de RNA obtidas das células THP-1 infectadas ou não a cepa vacinal BCG para uso nos ensaios de silenciamento gênico	54
Tabela 9	Padronização dos primers para os genes-alvo previamente selecionados	56
Tabela 10	Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 3 - Não Vacinados vs Vacinados, Comparação TBA BCG- vs TBA BCG+	63
Tabela 11	Gene comum nas metanálises do GEO e SRA, na comparação entre ITBL vs CNI no grupo dos Não Vacinados	68
Tabela 12	Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos não vacinados pelas metanálises do GEO e do SRA	72
Tabela 13	Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos vacinados pelas metanálises do GEO e do SRA	73
Tabela 14	Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos não vacinados vs vacinados pela metanálise do SRA	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de Componente Principal
ACTB	do inglês, actin beta
ADC	do inglês, albumin dextrose concentrate
Ala-DH	do inglês, alanine dehydrogenase
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCG-	Não vacinado com a vacina BCG
BCG+	Vacinado com a vacina BCG
CDC	do inglês, centers for disease control
cDNA	DNA complementar
CEP-ISC	Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde Coletiva
CFP-10	do inglês, culture filtrate protein 10
CNI	Controles não infectados
COVID-19	Coronavírus
DCs	Células dendríticas
EGFR	do inglês, epidermal growth factor receptor
ESAT-6	do inglês, 6-kDa early secretory antigenic target
ESX	do inglês, Esat-6 secretion system 1
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
GAPDH	do inglês, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDEs	Genes diferencialmente expressos
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
HDT	do inglês, host directed therapies
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN tipo I	Interferon do tipo I
IFN-γ	Interferon-gama
IGRA	do inglês, interferon-gamma release assay
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6

IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
ITBL	Infecção tuberculosa latente
LACEN	Laboratório Central do Estado da Bahia
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MNT	Micobactérias não tuberculosas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAC	N-acetilcisteína
NB3	Nível de Biossegurança 3
Net	do inglês neutrophil extracellular traps
NO	Óxido nítrico
NK	<i>Natural Killer</i>
NMI	Não-muscular invasiva
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PE	do inglês, Proline-Glutamic Acid
PGRS	Sequências polimórficas ricas em GC
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PPE	do inglês, Proline-Proline-Glutamic Acid
PT	Prova tuberculínica
QFT	QuantiFERON-TB
RNA	Ácido ribonucleico;
RNAi	RNA de interferência
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SBF	Soro Bovino Fetal
SNC	Sistema nervoso central
SRA	do inglês, Sequence Read Archive
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TBA	Tuberculose ativa

TBP	do inglês, TATA-box binding protein
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
Th	T <i>helper</i> , subgrupo do linfócito
TLR2	do inglês, toll-like receptor 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TRH	do inglês, Thyrotropin releasing hormone
TSH	do inglês, thyroid-stimulating hormone
tRNA	RNA transportador
TST	Teste tuberculínico
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

LISTA DE URLS

Ingenuity Pathways Analysis	http://ingenuity.com
Enrichr	https://maayanlab.cloud/Enrichr/
University of California Santa Cruz	https://genome.ucsc.edu/
GEO	http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Sequence Read Archive	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra
Plataforma E-CRISPR	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html
Dissertação Scarlet Mota Arca Fiocruz	https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25930

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS	19
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	20
1.3 IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO NA TUBERCULOSE	21
1.4 MECANISMOS DE EVASÃO DO BACILO	24
1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	26
1.6 BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG)	27
1.7 TERAPIAS DIRECIONADAS AO HOSPEDEIRO E BIOMARCADORES	30
1.8 SUBFAMÍLIA RAB11	33
2 JUSTIFICATIVA	35
3 HIPÓTESE	37
3.1 OBJETIVOS	37
3.1.1 Objetivo geral	37
3.1.2 Objetivos específicos	37
4 DESENHO EXPERIMENTAL	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 SELEÇÃO DOS CONJUNTOS DE DADOS DO GEO	39
5.2 SELEÇÃO DOS CONJUNTOS DE DADOS DO SRA	41
5.3 TRATAMENTO DOS DADOS	43
5.4 SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	45
5.5 ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO	46
5.6 DESENHO DE PRIMERS	46
5.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS COM TB ATIVA	47
5.8 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1	48
5.9 CULTIVO DE MICOBACTÉRIAS	49
5.10 INFECÇÃO DE CÉLULAS THP-1 COM MICOBACTÉRIAS	50
5.11 EXTRAÇÃO DE RNA E CONVERSÃO PARA CDNA	51
5.12 PCR EM TEMPO REAL	54
5.13 SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA	58
5.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58

6 RESULTADOS	60
6.1 GENES OBTIDOS DA METANÁLISE A PARTIR DO GEO	60
6.2 VIAS E FUNÇÕES ASSOCIADAS AOS GENES IDENTIFICADOS	63
6.3 METANÁLISE SECUNDÁRIA PELO SRA	67
6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>RAB11A</i> EM INDIVÍDUOS COM A TUBERCULOSE ATIVA VACINADOS OU NÃO COM A BCG	75
6.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>RAB11A</i> APÓS INFECÇÃO DE CÉLULAS THP-1 COM MICOBACTÉRIAS	76
6.6 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DO <i>RAB11A</i> POR RNA DE INTERFERÊNCIA	77
7 DISCUSSÃO	79
8 CONCLUSÕES/PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, transmissível pelo ar e causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (WHO, 2021). Constitui uma das infecções mais comuns no mundo e tem afetado a humanidade por séculos (CDC, 2021).

A transmissão da TB se dá, em geral, por meio de aerossóis contendo as micobactérias, que são liberados por meio da tosse, espirro ou fala de indivíduos doentes com tuberculose pulmonar ou laríngea, principalmente aqueles que se encontram em quadro bacilífero (BRASIL, 2019). Porém, nem todas as pessoas expostas a indivíduos com a forma ativa da doença serão infectadas. Existem fatores cruciais que determinam a transmissão do bacilo, a exemplo da susceptibilidade do indivíduo exposto, da infectividade do doente, da virulência do patógeno, além de fatores ambientais ligados diretamente à exposição (CDC, 2021).

A maioria dos indivíduos infectados permanecerá em um estado latente de infecção, onde nenhum sintoma clínico está presente. Apenas uma pequena porcentagem dessas pessoas irá eventualmente progredir e desenvolver a doença ativa, e todo esse processo é dependente de uma variedade de fatores ambientais, sociais, demográficos e econômicos, além de fatores do próprio hospedeiro e patógeno (YOUNG et al., 2008; COMAS; GAGNEUX, 2009; NARASIMHAN et al., 2013; NUNES-ALVES et al., 2014; BRASIL, 2019).

Determinados grupos populacionais se encontram mais vulneráveis a certas condições de saúde e de vida que os levam a um maior risco de adoecimento por TB em comparação com o risco da população geral (Figura 1) (BRASIL, 2019).

Populações vulneráveis	Risco de adoecimento por tuberculose
Indígenas ^a	3 vezes maior
Privados de liberdade ^a	28 vezes maior
Pessoas que vivem com o HIV/aids (PVHA) ^a	28 vezes maior
Pessoas em situação de rua ^b	56 vezes maior

^aSinan/MS e IBGE.

^bTbweb, SP, 2015 e Pessoa em Situação de Rua: Censo São Paulo, capital (2015)

Figura 1 - Risco de adoecimento por tuberculose em populações vulneráveis em comparação ao risco da população geral

Fonte: (BRASIL, 2019).

Nos últimos anos, o desfecho da infecção pelo *Mtb* vem deixando de ser representado com uma distribuição bimodal, atribuída apenas pelas formas latente e ativa, e com base na ausência ou presença de sintomas clínicos. Toda a diversidade de elementos envolvidos na transmissão, infecção e progressão para a doença ativa tem sido reconhecida como um espectro representado por diferentes estágios, e não como uma doença de distribuição simples, onde os indivíduos podem avançar e reverter os quadros, dependendo de fatores como as mudanças na imunidade do hospedeiro e a ocorrência de comorbidades. A transição entre esses estados é atribuída a flutuações na carga bacteriana, e também no equilíbrio entre fatores pró- e anti-inflamatórios e outros mecanismos imunológicos (BARRY et al., 2009; LIN; FLYNN., 2010; ERNST, 2012; PAI et al., 2016; PETRUCCIOLI et al., 2016).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

Apesar de ser uma doença tratável, a tuberculose ainda persiste como um grave problema de saúde pública, sendo a causa de morbidade e mortalidade no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; BRASIL, 2021) e no mundo (WHO, 2021). Permanece no grupo das doenças que mais matam mundialmente, e, até a pandemia do coronavírus (COVID-19), constituía a principal causa de morte por um único agente infeccioso (WHO, 2021). Em 2019, ocupou a posição de oitavo e nono lugar, respectivamente, entre todas as doenças que mais mataram nos países de renda baixa e renda média baixa em todo o mundo (Figura 2) (WHO, 2021). Atualmente, o Brasil é considerado como um país de renda média-alta (THE WORLD BANK, 2022).

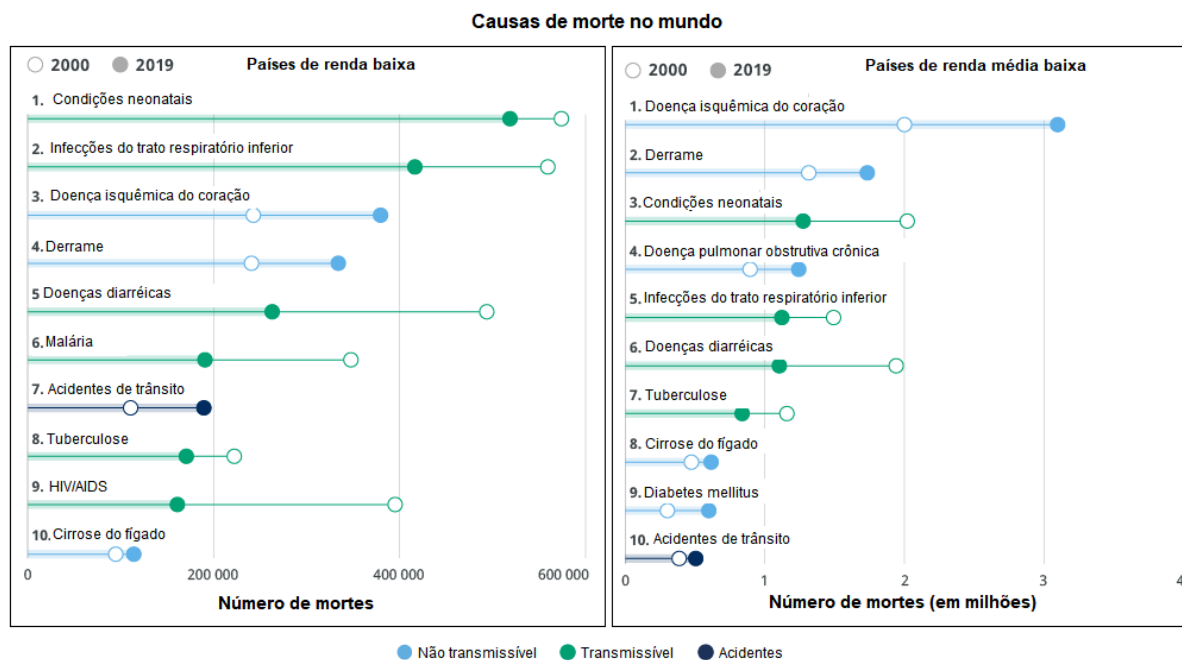


Figura 2 - Dez principais causas de morte nos países de renda baixa (gráfico à esquerda) e renda média baixa (gráfico à direita), em 2019. Os países são classificados pelo Banco Mundial, com base na renda nacional bruta, em quatro grupos de renda – baixa, média baixa, média alta e alta
Fonte: (Adaptado da WHO, 2021).

Cerca de $\frac{1}{4}$ da população mundial está infectada com o patógeno e, para estas pessoas, o risco de desenvolver a doença ativa ao longo da sua vida é de cerca de 5-10% (WHO, 2020). Em 2019, foram estimados 10 milhões de novos casos e 1,2 milhões de mortes pela doença no mundo. No Brasil, foram diagnosticados 73,864 novos casos de tuberculose e registrados 4,532 óbitos decorrentes da doença, no ano de 2019. Apesar de se observar uma constante queda dos números ao longo dos anos, essa diminuição tem ocorrido muito lentamente, comprometendo o objetivo de erradicação da doença (BRASIL, 2020; WHO, 2020; BRASIL, 2021).

1.3 IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO NA TUBERCULOSE

Após a inalação dos aerossóis contendo os bacilos, macrófagos residentes no pulmão interagem diretamente com o *Mtb*, compondo uma das primeiras barreiras de defesa contra o patógeno (NUNES-ALVES et al., 2014; SIA et al., 2015). Os bacilos são fagocitados, permanecendo no interior do fagossomo e interações desencadeadas neste processo irão ditar se ocorrerá a destruição do bacilo ou a sua permanência e multiplicação nas células (BUSSI; GUTIERREZ, 2019).

Desfechos diferentes podem ser desencadeados de acordo com a resposta imune deflagrada. A erradicação total do *Mtb* intracelular ocorre raramente, após reconhecimento do bacilo. Há indícios de que isso seja facilitado pela ligação ao receptor toll-like 2 (TLR2). Nesse processo há a ativação da fagocitose e desencadeamento da resposta imune inata, bem como de outros processos celulares envolvidos na eliminação do bacilo, como a apresentação de antígenos, ativação do inflamassoma, autofagia e apoptose. Na grande maioria dos casos há a falha em erradicar completamente o patógeno. Este pode então estabelecer-se no hospedeiro em estágio latente, ou mais raramente (em indivíduos imunossuprimidos ou com sistema imune imaturo) desencadear a forma ativa da TB. Na fase latente, o bacilo pode permanecer dormente por anos, podendo ser detectado em estruturas denominadas granulomas. O bacilo reativado (por exemplo, em consequência de um sistema imunológico debilitado) ou que não foi contido na fase inicial da infecção pode se disseminar no pulmão ou mesmo para outros órgãos, ocasionando a doença ativa (MAPHASA; MEYER; DUBE, 2021).

Os macrófagos são as células do hospedeiro que estão predominantemente envolvidas na entrada, crescimento e contenção dos bacilos dentro do indivíduo infectado. Essas células são indutoras e efetoras da inflamação, mediando a destruição e reparo tecidual, além de agir na imunidade inata e adaptativa. O *Mtb* e os macrófagos possuem diferenças em suas atividades metabólicas, e suas interações são importantes para determinar o resultado da infecção (MARAKALALA et al., 2018).

No estágio inicial da infecção, macrófagos incapazes de conter a infecção irão atuar produzindo citocinas que estimulam a migração de células imunes. As células inflamatórias recrutadas acumulam-se no local formando o granuloma, uma estrutura constituída principalmente por macrófagos, incluindo aqueles diferenciados em células epitelióides e espumosas, além de células gigantes multinucleadas, granulócitos e linfócitos. Essa estrutura surge como uma reação inflamatória do hospedeiro frente ao bacilo (NUNES-ALVES et al., 2014). O granuloma é uma lesão complexa composta por várias células do sistema imune, que ao mesmo tempo em que visa isolar efetivamente o patógeno contendo o seu crescimento e disseminação, acaba também agindo como um local para o bacilo persistir como infecção latente. A manutenção do granuloma é crítica no controle da tuberculose (GUPTA et al., 2012, JAGATIA; TSOLAKI, 2021).

Além dos macrófagos, o *Mtb* é capaz de infectar outros tipos celulares, como neutrófilos, células endoteliais e células-tronco mesenquimais. Após ser internalizado, o bacilo pode residir em diferentes compartimentos, como endossomas, fagossomos e

autofagossomos, e ter acesso ao citosol. Vários mecanismos celulares e imunológicos do hospedeiro são iniciados como forma de tentar eliminar o bacilo e controlar a infecção; concomitantemente, uma gama de estratégias de evasão e virulência do *Mtb* é ativada, de forma a competir com os mecanismos do hospedeiro e permitir a sobrevivência e replicação bacteriana (Figura 3) (BUSSI; GUTIERREZ, 2019)

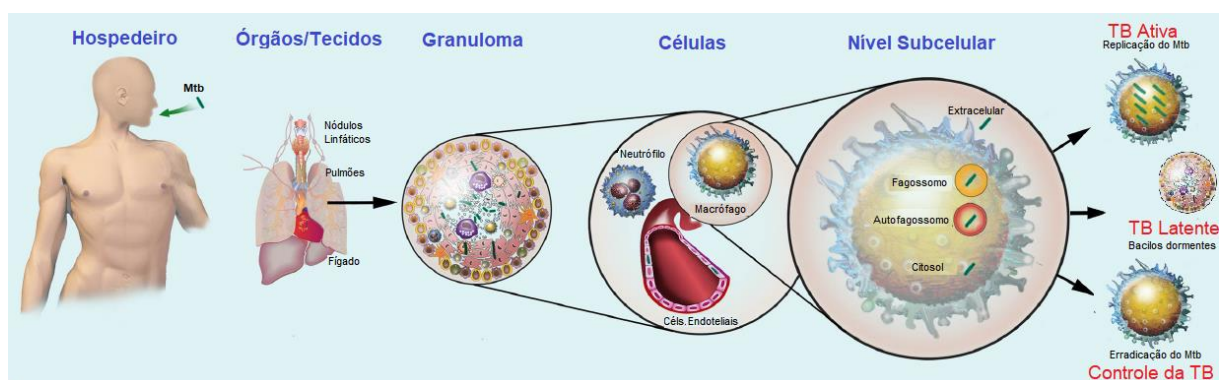


Figura 3 - Patogênese da TB. Após a inalação das partículas contendo o *Mtb*, uma resposta inflamatória inicia-se no pulmão, caracterizada pelo recrutamento de diferentes tipos celulares e contenção do bacilo em estruturas denominadas granulomas. Nesse contexto, o *Mtb* consegue infectar diferentes tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, e a nível subcelular pode se encontrar em diferentes compartimentos, como o fagossomo, autofagossomo e citosol. As interações desencadeadas nesse processo podem ditar três cenários diferentes, que irão favorecer o controle da infecção pelo hospedeiro, o estágio de latência ou favorecer o estabelecimento da infecção pelo *Mtb*.

Fonte: (Adaptado de BUSSI; GUTIERREZ, 2019).

Do ponto de vista funcional, os macrófagos podem liberar um elevado número de citocinas: anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β); pró-inflamatórias, como os interferons do tipo I (IFN tipo I), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-6 (IL-6); e quimiocinas. Eles podem também expressar receptores de citocinas, produzir fatores de crescimento (a exemplo do fator estimulador de colônias de macrófagos, M-CSF, do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos, GM-CSF, além de fatores de crescimento de fibroblastos e do endotélio vascular), eritropoietina, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e óxido nítrico (NO). Compreendem a maior fonte de metabólitos do araquidonato, eicosanóides, já demonstrados como reguladores importantes da inflamação, moduladores da morte celular de macrófagos, da formação do granuloma e do desfecho da doença (GUPTA et al., 2012; MARAKALALA et al., 2018). A polarização de macrófagos em M1 e M2 é equilibrada pelo hospedeiro como forma de lidar com a infecção crônica, onde os macrófagos M1 são responsáveis por uma resposta pró-inflamatória, enquanto os M2 promovem uma resposta anti-inflamatória. A

produção dessas diferentes moléculas regula a promoção e formação do granuloma, determinando conseqüentemente a evolução da doença (JAGATIA; TSOLAKI, 2021).

Os neutrófilos agem produzindo e secretando enzimas, além de intermediários reativos de oxigênio, de forma a conter o crescimento bacteriano e promover a morte de macrófagos infectados. Já as células naturais killer (NK) produzem mediadores que restringem a replicação bacteriana nos macrófagos, como a IL-12, TNF e interferon-gama (IFN- γ), além de atuarem na citólise de células infectadas e bactérias intracelulares, bem como na ativação de macrófagos através do IFN- γ (GUPTA et al., 2012; SIA et al., 2015). As células dendríticas (DCs) possuem papel na ativação e diferenciação de células T. Por sua vez, essas últimas englobam subtipos que potencializam a atividade antibacteriana dos macrófagos através da liberação de citocinas, como o IFN- γ e o TNF, ou têm papel citotóxico, ou regulador da resposta.

As células T CD4+ têm papel na regulação imune através da expressão de diferentes fenótipos, como o Th1, o Th2 e o Th17 (COFFMAN, 2006; YOUNG et al., 2008; ARAÚJO-PIRES et al., 2014). Linfócitos com diferentes perfis podem proliferar e ditar o caminho da resposta imune frente à infecção. Alguns autores sugerem que o perfil Th1 propicia o controle e contenção dos bacilos dormentes pelos macrófagos espumosos até que seja controlado pelo próprio encapsulamento da lesão, enquanto o perfil Th17 contribui para o aumento das lesões devido ao recrutamento de células polimorfonucleares e crescimento de bacilos extracelulares em armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, do inglês neutrophil extracellular traps) (CARDONA, 2018). Finalmente, as células T, principalmente CD8+, induzem a morte de células infectadas, e dessa forma contribuem para a eliminação de bactérias intracelulares (GUPTA et al., 2012).

1.4 MECANISMOS DE EVASÃO DO BACILO

O *Mtb* é um patógeno altamente adaptado que desenvolveu estratégias para resistir à resposta imune do hospedeiro, sendo capaz de modular tanto a resposta imune inata como a adaptativa, bem como de escapar do macrófago através da evasão ou subversão das funções efetoras imunes (SHARMA et al., 2022). É capaz de interferir e modificar a ação dos macrófagos por meio da sinalização de vias importantes ao seu favor. Genes identificados em seu genoma, como os genes das famílias Pro-Glu (*PE*)/Pro-Pro-Glu (*PPE*) e *ESX* (do inglês, 6-kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) secretion system 1), vêm sendo associados com a sobrevivência e crescimento, assim como virulência do bacilo, através da modulação de

mecanismos que conferem ao bacilo a habilidade de adaptar o seu metabolismo frente a modificações no ambiente, possibilitando assim a sua persistência no organismo do hospedeiro (COLE et al., 1998; DUBNAU et al., 2002; CAMPOS, 2006; FORRELLAD et al, 2013; SIA et al., 2015).

O gênero *Mycobacterium* constitui um alvo difícil para o desenvolvimento de terapias eficazes devido à complexidade da sua fisiologia, morfologia e dos seus mecanismos de virulência. Os fatores de virulência micobacterianos compreendem genes e componentes celulares que permitem sua persistência no hospedeiro, atuando na colonização, replicação e sobrevivência. Os fatores de virulência de *Mtb* bem estabelecidos na literatura incluem lipídios expostos à superfície na membrana externa da micobactéria, proteínas das famílias Esx e PE/PPE, essas últimas secretadas pelos sistemas de secreção do tipo VII (T7SS) (LY; LIU, 2020). Proteínas PE_PGRS (sequências polimórficas ricas em GC) também vêm sendo apontadas como importantes na virulência do *Mtb*. A expressão de proteínas PE/PPE/PE_PGRS confere um nível mais alto de virulência às diferentes cepas de *Mtb*, e tem a capacidade de atuar mascarando o efeito de moléculas efetoras do hospedeiro, modulando assim a vigilância imunológica. Proteínas PE/PPE/PE_PGRS influenciam na atividade do macrófago por modular ou modificar a dinâmica celular. Podem controlar a resposta imune do hospedeiro através da regulação positiva da produção de citocinas dirigidas a uma resposta pró-inflamatória ou anti-inflamatória, modificando assim o balanço das respostas imunes em favor da sobrevivência do bacilo e progressão da doença. Além disso, estão implicadas também em outras cascatas de sinalização, a exemplo da ativação ou inibição de vias de morte celular (QIAN et al., 2020; SHARMA et al., 2022).

Outras estratégias desenvolvidas pelo *Mtb* incluem a capacidade de inibir a maturação e acidificação de fagolisossomos, inibir o estresse oxidativo e a função dos intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, como também inibir a apoptose e autofagia (ZHAI et al., 2019). O *Mtb* é capaz de impedir a fusão do fagossomo com o lisossomo, causar dano no fagossomo permitindo a sua fuga para o citosol, inibir o reparo da membrana plasmática das células do hospedeiro, assim como favorecer tipos de morte celular que possibilitem a replicação do bacilo, como a necroptose e a ferroptose, em contraposição a formas de morte celular que facilitem uma resposta imune anti-*Mtb*, como através do apoptose e piroptose (CHAI et al., 2020).

1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da tuberculose ativa baseia-se em critérios epidemiológicos e clínicos, e em exames laboratoriais bacteriológicos (principalmente a baciloscopia, teste rápido molecular e cultura) e complementares (de imagem, histológico, escore clínico) (PALOMINO, 2005; RYU, 2015; CUDAHY; SHENOI, 2016; BRASIL, 2019; WHO, 2021). Para a detecção da infecção latente, utiliza-se a prova tuberculínica (PT), também denominada teste cutâneo tuberculínico (*tuberculin skin test*, TST), e os ensaios de liberação de IFN- γ (*interferon-gamma release assay*, IGRA), baseados na medição da resposta imune do indivíduo frente a antígenos da micobactéria (CUDAHY; SHENOI, 2016; BRASIL, 2019). Ensaio de IGRA como o QuantiFERON-TB[®] (QFT) e o T SPOT-TB[®] utilizam antígenos específicos para o *Mtb*, como o ESAT-6, CFP-10 (do inglês, culture filtrate protein 10), e TB7.7 (Rv2654c). O uso desses antígenos torna esses testes mais específicos do que o TST, por não serem compartilhados com o *Mycobacterium bovis* nem com a maior parte das micobactérias não tuberculosas (MNT). São exceções o *M. marinum*, o *M. szulgai* e o *M. kansasii* (PALOMINO, 2005; GONG; WU, 2021). Ensaio mais recentes vêm sendo desenvolvidos, a exemplo do LIOFeron, que além dos antígenos listados acima, utiliza também o Ala-DH (do inglês, alanine dehydrogenase) (GONG; WU, 2021).

A tuberculose é uma doença curável, especialmente tratando-se de indivíduos infectados com bacilos suscetíveis às principais drogas anti-tuberculose (TB sensível), desde que sejam seguidos todos os critérios do regime de tratamento (doses corretas, tempo completo de tratamento previamente estabelecido, esquema de drogas adequado) (BRASIL, 2019). Sem o tratamento, a taxa de mortalidade da doença é alta (WHO, 2021). O esquema padronizado para TB sensível envolve quatro fármacos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol), e dura 6 meses. A adesão ao tratamento é um gargalo nesse processo, pois o tempo longo de tratamento e os efeitos adversos contribuem para que o abandono seja um desfecho frequente (BRASIL, 2011; BRASIL, 2019; WHO, 2021). Nos casos de resistência às drogas envolvidas no tratamento da TB, que pode ser classificada como monorresistência, polirresistência, multirresistência, resistência extensiva e resistência a rifampicina (Figura 4), o regime de tratamento é alterado (BRASIL, 2011; BRASIL, 2019).

Classificação	Descrição
Monorresistência	Resistência a 1 fármaco antituberculose
Polirresistência	Resistência a 2 ou mais fármacos antituberculose, exceto à associação rifampicina e isoniazida
Multirresistência	Resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida
Resistência extensiva	Resistência a rifampicina e isoniazida, associada à fluoroquinolona e a um injetável de segunda linha (amicacina e capreomicina)
Resistência à rifampicina	Resistência à rifampicina diagnosticada por meio do Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB), independente de resultados futuros utilizando teste de sensibilidade

Figura 4 - Classificação da resistência às drogas do tratamento para TB.

Fonte: (BRASIL, 2019).

1.6 BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG)

A única vacina licenciada e disponível contra a tuberculose é produzida com micobactérias vivas e atenuadas da espécie *M. bovis* (Bacilo de Calmette-Guérin, BCG). Foi desenvolvida há quase 100 anos e é amplamente utilizada em todo o mundo (WHO, 2021). Tem eficácia limitada em evitar o adoecimento pela forma pulmonar da doença, especialmente com o aumento da idade e da exposição ao *Mtb*, mas protege substancialmente contra as formas mais graves (miliar e meníngea) em crianças (MANGTANI et al., 2014; VERRALL et al., 2020; TRAUER et al., 2021). No Brasil, as cepas utilizadas são a BCG Moreau-RJ e, mais recentemente, BCG Rússia (BITENCOURT et al., 2021). A vacina é disponibilizada gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e recomenda-se a aplicação até 3 dias após o nascimento, apresentando ampla cobertura vacinal com cerca de 99% até o ano de 2018 (WHO, 2017; BRASIL, 2019). Nos últimos anos, a cobertura de vacinação no Brasil tem sofrido uma drástica mudança, com diminuição significativa nas diferentes regiões do país (CÉSARE et al., 2020). Em relação a cobertura vacinal da BCG, observa-se que esta vem sofrendo um declínio acentuado a partir do ano de 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022) (Figura 5).

Imunizações - Cobertura - Brasil

Coberturas Vacinais por Ano segundo Imuno

Imuno: BCG

Ano: 2015-2022

Imuno	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	Total
Total	105,08	95,55	97,98	99,72	86,67	75,61	70,70	61,90	87,66
BCG	105,08	95,55	97,98	99,72	86,67	75,61	70,70	61,90	87,66

Fonte: [Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações \(SI-PNI/CGPNI/DEIDT/SVS/MS\)](#)

Notas: • Dados sujeitos a revisão • Data de atualização dos dados: 20/09/2022

Figura 5 - Cobertura vacinal para a BCG no Brasil nos anos de 2015 até 2022.

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A eficácia em adultos contra a forma pulmonar da doença é bem variável, e essa heterogeneidade na proteção pode ser atribuída a múltiplos fatores, como a exposição prévia ao *Mtb*, assim como a micobactérias ambientais (BARRETO et al., 2005; DAVIDS et al., 2006; BARRETO et al., 2006; PEREIRA et al.; 2007; MANGTANI et al., 2014; TRAUER et al.; 2021). Estudos de revacinação têm sido executados buscando entender melhor os efeitos da vacina, e recentemente foi demonstrado que a revacinação de adolescentes QFT- (ausência de exposição indicada ao *Mtb*) levaria a uma proteção contra a conversão sustentada ao teste de QFT (NEMES et al., 2018).

Diversos estudos têm mostrado a capacidade da BCG em gerar efeitos não específicos, de longo prazo, em indivíduos não acometidos pela tuberculose. Dessa forma, a BCG pode propiciar proteção cruzada contra diferentes doenças, infecciosas e não-infecciosas, levando a redução da mortalidade de indivíduos vacinados em relação aos não vacinados. No campo da imunoterapia, há muitos anos a BCG é utilizada como tratamento padrão, por exemplo, contra o câncer de bexiga. A BCG vem sendo associada também com outras aplicações clínicas, apresentando boa performance na imunoterapia contra o melanoma, e em doenças auto-imunes, a exemplo da diabetes do tipo 1 e da esclerose múltipla (Figura 6) (THOMPSON et al., 2015; ZHENG et al., 2015; KOWALEWICZ-KULBAT; LOCHT, 2017; COVIÁN et al., 2019). Na asma alérgica, a BCG é capaz de prevenir ou reduzir a resposta inflamatória induzida pelo alérgeno, redirecionando a resposta Th2 patogênica para uma resposta Th1 protetora e/ou de células T regulatórias (KOWALEWICZ-KULBAT; LOCHT, 2017).

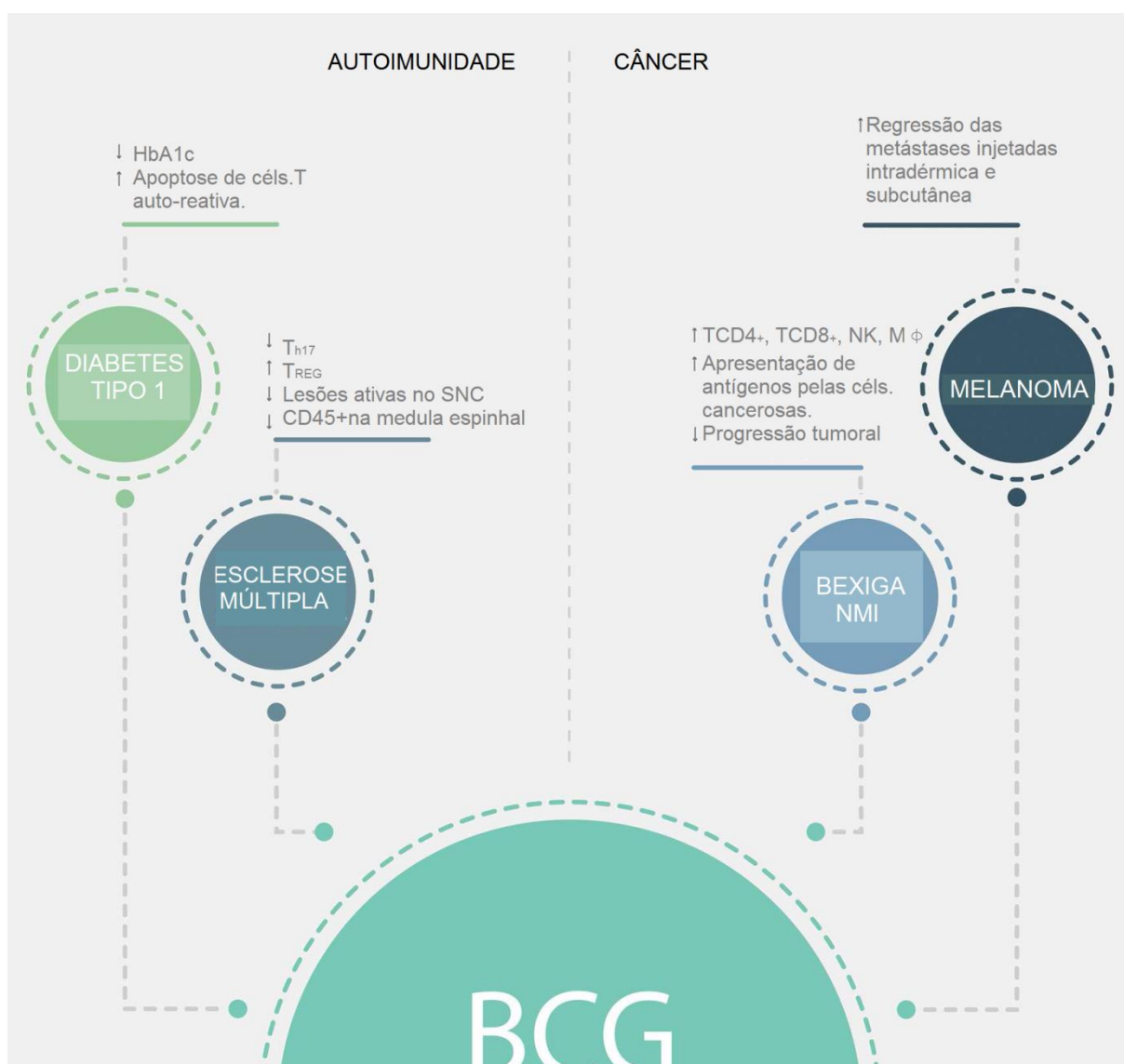


Figura 6 - Aplicações da BCG na imunoterapia do câncer e doenças auto-imunes. HbA1c (hemoglobina glicosilada), SNC (sistema nervoso central), NK (Células Natural Killer), MØ (Macrófagos), NMI (Não-muscular invasiva)

Fonte: (CÓVIÁN et al., 2019)

Essa habilidade de modificar a resposta do hospedeiro de forma prolongada e inespecífica foi denominada imunidade treinada, e sugere a ocorrência de uma reprogramação de longo prazo da resposta imune inata (ARTS et al., 2018; UTHAYAKUMAR et al., 2018; MOURITS et al., 2020; ADESANYA et al., 2021). Estudos em humanos e camundongos sugerem que a reprogramação epigenética, por meio da modificação de histonas em elementos reguladores de determinados genes, aumenta a capacidade das células da resposta inata responderem a um patógeno de forma inespecífica, através da indução de citocinas pró-

inflamatórias, caracterizando um estado “treinado” (COVIÁN et al., 2019; ADESANYA et al., 2021).

Novas estratégias que possam melhorar a eficácia da vacinação contra a TB vêm sendo discutidas, e utilizar como alvo a modulação da imunidade inata (por exemplo, através da indução de diferentes tipos de morte celular, de células T regulatórias ou de citocinas anti-inflamatórias) após a vacinação para o aumento dessa eficácia tem-se mostrado uma estratégia promissora (SCHAIBLE et al., 2017).

Estudos sugerem que um mecanismo celular de defesa importante, a autofagia, pode ser responsável por controlar a indução da imunidade treinada induzida pela BCG. Tanto a inibição farmacológica como polimorfismos em genes relacionados à autofagia bloqueiam a imunidade treinada induzida pela vacina (BUFFEN et al., 2014). A via de sinalização Wnt / β -catenina também já se mostrou como um regulador da autofagia em células infectadas com a BCG, sendo capaz de inibi-la (WU et al., 2019).

Esses achados abrem novas possibilidades para a identificação de alvos potenciais que atuem nestes processos e que possam vir a ser utilizados como uma forma de imunoterapia, com efeito de aumento da proteção, e consequente aprimoramento de futuras vacinas baseadas na BCG (BUFFEN et al., 2014; SCHAIBLE et al., 2017; WU et al., 2019).

A capacidade da BCG em influenciar e modificar diferentes mecanismos do hospedeiro acaba abrindo um novo campo de estudo para o entendimento dos processos associados à TB e desenvolvimento de novas abordagens para o manejo da doença.

1.7 TERAPIAS DIRECIONADAS AO HOSPEDEIRO EM TUBERCULOSE

Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou a estratégia End TB, que tem como objetivo acabar com a epidemia global da tuberculose, por meio da redução global da incidência (em 90%) e da mortalidade (em 95%) da doença, até o ano de 2035. Um dos pilares desta estratégia baseia-se na inovação e intensificação da pesquisa para o desenvolvimento de novos diagnósticos, tratamentos e formas de prevenção da tuberculose, que possam ser adotadas e implementadas efetivamente em todo o mundo (WHO, 2015; WHO, 2021).

Terapias capazes de modular a resposta imune têm o potencial de reduzir a patologia pulmonar e melhorar o desfecho da doença. São parte das estratégias denominadas terapias direcionadas ao hospedeiro (HDT, *host-directed therapies*) e seu potencial no combate a TB tem sido reconhecido (AHMED et al., 2020).

HDTs contra a tuberculose têm sido estudadas com foco na atuação em processos específicos. Agentes como a vitamina D₃, Rapamicina, Metformina, Ácido Valpróico e Estatina têm sido investigados como ativadores da autofagia, o que aumentaria a morte intracelular do *Mtb*. Etanercept e Bevacizumab desintegram a estrutura do granuloma e favorecem a entrada de drogas nas células infectadas. Ibuprofeno, Diclofenaco, Ácido Acetilsalicílico e Vitamina D₃ potencializam a resposta antiinflamatória, reduzindo inflamação e dano tecidual (DARA et al., 2019; AHMED et al., 2020). miRNAs também vêm sendo apontados como promissores HDTs por terem a capacidade de regular a imunidade contra a tuberculose, através, por exemplo, da modulação da autofagia e apoptose (SABIR et al., 2018).

Os avanços no campo da genômica podem fornecer uma visão sobre possibilidades de caminhos a serem explorados como possíveis terapias, e neste contexto, moléculas e vias por elas estimuladas constituem alvos interessantes, pela possibilidade de associação com a proteção e a patogênese das infecções micobacterianas (ETNA et al., 2014; DARA et al., 2019).

Biomarcadores podem desempenhar um papel no desenvolvimento de novas ferramentas necessárias para o combate à tuberculose, por serem indicadores de doença ou de imunidade do hospedeiro, que podem vir a ser utilizados de forma única ou em combinação, correspondendo a uma bioassinatura. Podem vir a ser desenvolvidos para auxiliar de diversas formas, seja na identificação da infecção vs doença, infecção e resposta ao tratamento, como na avaliação da eficácia vacinal (FLETCHER.; DOCKRELL, 2016).

No geral, bioassinaturas de infecção e risco de doença têm sido identificadas, mas não de proteção, visto que não se tem até hoje uma completa compreensão da resposta do hospedeiro na tuberculose. Nesse sentido, análises de expressão gênica usando microarranjos e RNA-seq têm auxiliado com uma visão mais objetiva e ampla da imunologia na TB, propiciando a identificação tanto de genes como de miRNAs ligados ao hospedeiro que podem vir a ser utilizados no combate à doença (FLETCHER.; DOCKRELL, 2016; SAMPATH et al, 2021).

Assinaturas transcricionais têm sido encontradas na TB, no entanto, apesar de ajudarem a entender melhor a sua patogênese, não há um consenso entre os trabalhos sobre qual grupo de moléculas seria crucial nesse contexto (BERRY et al., 2010; ANDRADE et al., 2014; MIHRET et al., 2014; KUBLER et al., 2015; HAAS et al., 2016; LEE et al., 2016; DENG et al., 2019; ZHANG et al., 2019). Múltiplos fatores podem influenciar na diversidade de assinaturas, desde diferenças de cunho genético e região demográfica das populações, até

variações entre os estudos e técnicas metodológicas utilizadas (HAAS et al., 2016; LEE et al., 2016).

Não há consenso na literatura sobre quais seriam as moléculas que constituem os melhores alvos, nas populações em geral. Trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a avaliação de genes que permitem a distinção entre os diferentes estados da tuberculose, constituindo potenciais biomarcadores (Tabela 1).

Tabela 1 - Genes biomarcadores candidatos para distinção entre os estados da tuberculose.

Citação	Genes	Utilização
LU et al., 2011	Combinação de <i>CXCL10</i> , <i>ATP10A</i> , <i>TLR6</i>	Distinguir a forma ativa da infecção latente
MIHRET et al., 2014	<i>BCL2</i> , <i>BLR1</i> , <i>FCGR1A</i> , <i>IL4D2</i> , <i>MARCO</i>	Distinguir casos ativos e contatos domiciliares sem a doença
	<i>CCL19</i> , <i>TGFB1</i> , <i>FOXP3</i>	Distinguir indivíduos com infecção latente e contatos não infectados
	Combinação de <i>BPI</i> , <i>CCL19</i> , <i>FOXP3</i> , <i>FPRI</i> , <i>TGFB1</i>	Distinguir contatos QFT+ e QFT-
LEE et al., 2016	<i>ASUN</i> , <i>DHX29</i> , <i>PTPRC</i>	Discriminar a forma ativa e a infecção latente

Fonte: Elaboração da autora

Nosso grupo buscou verificar se há um padrão distinto de expressão gênica em indivíduos vacinados e não vacinados com BCG, para identificar potenciais vias estimuladas pela vacina que possam estar associadas a uma resposta protetora contra a tuberculose, e dessa forma apontar possíveis alvos para novas terapias contra a doença. Nossos resultados iniciais, a partir de uma metanálise de dados disponíveis na literatura, comparando indivíduos doentes

e não vacinados com a BCG àqueles vacinados, sugeriram a modulação diferencial de uma GTPase da subfamília Rab11, o *RAB25* (MOTA, 2018). Esse gene é expresso especificamente em células epiteliais, porém tem sequência semelhante a outros membros desta subfamília, já descritos com expressão em sangue total. O *RAB25* está associado a vias envolvidas na autofagia, migração, morte e proliferação celular.

1.8 SUBFAMÍLIA RAB11

Após a sua internalização, através da fagocitose, pelos macrófagos, o *Mtb* permanece localizado dentro dos fagossomos. Essas estruturas passam por uma série de eventos de fusão até amadurecer e poder ter uma ação antimicrobiana. Essa progressão, denominada maturação do fagossomo, é ativamente regulada e conduzida por moléculas conhecidas como Rab GTPases. Essas moléculas permitem a identificação dos endossomos (Rab5 para endossomos iniciais e Rab7 para endossomos finais), a triagem de macromoléculas através do processo de reciclagem, assim como a regulação dos eventos de fusão da membrana (DE ARMENTIA; AMAYA; COLOMBO, 2016; MAPHASA; MEYER; DUBE, 2021). As diferentes isoformas das proteínas Rab encontram-se em diferentes compartimentos celulares e atuam em funções específicas, associadas à endocitose, à exocitose e ao transporte (BHUIN; ROY., 2014).

A subfamília Rab11, composta pelos produtos dos genes *RAB11A*, *RAB11B* e *RAB25*, vem sendo implicada em diferentes patologias, como doenças neurodegenerativas, infecções intracelulares (*Chlamydia*), diabetes do tipo 2 e câncer. São conhecidas por serem conservadas evolutivamente e homólogas, sendo descritas com papel crucial na reciclagem endossomal e na regulação do transporte vesicular (KELLY et al., 2012; BHUIN; ROY, 2015). As diferentes isoformas de Rab11 regulam vias de transporte e estão associadas com processos celulares importantes, a exemplo da citocinese e fagocitose. Localizam-se em ambas as vias endocítica e exocítica, mais precisamente nas vesículas endocíticas, vesículas pós-Golgi, endossomos de reciclagem e na rede trans-Golgi (FERRO; BOSIA; CAMPA., 2021).

Diferentes trabalhos têm demonstrado a atuação dessas moléculas nos processos de proliferação e migração celular, apoptose e autofagia (CHUNG et al., 2016; WANG et al., 2017; LIU et al., 2012). Além disto, *RAB25* também já foi descrito como um mediador da resistência ao erlotinib em pacientes com câncer de pulmão, sendo apontado como um promissor biomarcador preditivo e com interessante valor terapêutico (WANG et al.; 2019). *RAB11A* e *RAB11B* demonstraram sítios de ligação adequados em sua estrutura que levam

ao interesse destas moléculas como potenciais candidatos a alvos de drogas (KUMAR; LUKMAN., 2018).

Na tuberculose, a apoptose contribui para o controle da infecção através da modulação da inflamação e aumento da capacidade dos macrófagos em controlar o crescimento intracelular do bacilo (DALLENGA et al., 2017; ANDERSSON et al., 2014). A via da autofagia também pode ser associada à proteção contra a tuberculose, já que promove a eliminação micobacteriana além de modular a resposta imune, por exemplo, a inflamação. Além disso, está envolvida entre os mecanismos de ação da isoniazida e pirazinamida, duas das principais drogas utilizadas no tratamento anti-TB (BENTO et al., 2015; BRADFRUTE et., 2013).

Durante a infecção pelo *Mtb*, o recrutamento de células também possui um papel fundamental frente à infecção. Esse processo requer sinais e sensores, a exemplo das quimiocinas, que serão importantes para definição de quais células serão atraídas para o local de resposta e para que as células migrem adequadamente. O processo de migração torna-se importante então, principalmente, no contexto de estabelecimento do granuloma e na imunidade mediada pelas células contra o patógeno (PETERS; ERNST., 2003; KAUFMANN; DORHOI., 2013).

No presente trabalho, buscamos identificar os perfis transcricionais associados à imunização com a vacina BCG e à tuberculose, explorando em especial a expressão dos genes da subfamília Rab11 em amostras da nossa população e em células infectadas com cepas de micobactérias, investigando a possibilidade desses genes constituírem potenciais alvos para novas terapias contra a doença.

2 JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença que possui uma ampla gama de estados que dependem diretamente da interação entre o bacilo e o sistema imune do hospedeiro, e a multiplicidade de elementos envolvidos na TB dificulta a diferenciação dos seus estágios, e conseqüentemente do desenvolvimento de estratégias contra a doença (PETRUCCIOLI et al., 2016).

Avaliações de expressão gênica surgem como uma possibilidade de estudo exploratório que permite investigar a modulação de genes do hospedeiro durante os diferentes estágios da doença e identificar por meio desta ferramenta novos alvos de investigação na doença. Dentro destes estudos, não se tem levado em consideração uma questão importante que concerne a exposição do indivíduo a outras micobactérias, como a própria vacinação pela BCG.

A BCG ainda constitui a única vacina disponível para a tuberculose e muito tem-se discutido a respeito da sua eficácia contra a forma pulmonar, descrita como altamente variável entre as populações, com o aumento da idade e exposição à micobactérias ligados diretamente a uma menor eficácia da vacina (FINE et al., 2001; BARRETO et al., 2005; DAVIDS et al., 2006; BARRETO et al., 2006; PEREIRA et al.; 2007; MANGTANI et al., 2014; POYNTZ et al., 2014; TRAUER et al.; 2021; WHO, 2021). Além disto, trabalhos já demonstram a capacidade da BCG em modificar a resposta do hospedeiro induzindo, especialmente, uma memória imune não-específica por meio da geração de uma imunidade treinada (COVIÁN et al., 2019; COVIÁN et al., 2020). Apesar desses relatos, ainda não se sabe totalmente quais os efeitos que a BCG pode causar no organismo e a duração destes efeitos (apontados no geral como de curto prazo).

Entender melhor os padrões de expressão de genes que podem ter possíveis implicações no curso da infecção pelo *Mtb*, e sua possível modulação frente aos diferentes processos biológicos que podem ser essenciais na resposta do indivíduo frente a infecção, considerando então a vacinação com a BCG como um possível fator de influência nessas análises, pode abrir novas perspectivas de investigação dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da doença, a partir da identificação de novas moléculas que possam vir a ser melhor investigadas como biomarcadores.

Resultados prévios deste trabalho identificaram expressão aumentada do gene *RAB25* em indivíduos com tuberculose ativa, não vacinados com a BCG, em comparação com aqueles vacinados. Este gene pertence a uma subfamília composta por mais dois membros (*RAB11A* e *RAB11B*) e estão implicados com vias importantes do hospedeiro. Não há

trabalhos na literatura que abordem a ação das moléculas desta subfamília na tuberculose. Durante as avaliações deste trabalho, foi confirmado que apenas o gene *RAB11A* é expresso em células sanguíneas, de forma que esta molécula foi sugerida como a que corresponde aos resultados obtidos na metanálise desenvolvida pelo grupo previamente a este trabalho.

No presente trabalho, pretendemos então compreender de forma mais ampla os perfis transcricionais associados à imunização com a vacina BCG e à tuberculose, e ainda, caracterizar melhor a expressão do gene *RAB11A*, buscando a validação dos achados iniciais dos estudos de metanálise, além de quantificar a expressão desse gene em uma coorte da nossa população. Pretendemos, ainda, caracterizar essa expressão após infecção *in vitro*, utilizando macrófagos derivados de células da linhagem de monócitos THP-1 infectadas com cepas de micobactérias de diferentes padrões de virulência, bem como após silenciamento gênico, buscando assim, explorar o possível papel desta molécula na tuberculose.

3 HIPÓTESES

Indivíduos vacinados com BCG apresentam assinaturas gênicas distintas em comparação com indivíduos não vacinados, quando se consideram os diferentes estados de infecção/doença tuberculosa, destacando-se a diminuição de expressão em pelo menos um componente da subfamília RAB11.

A diminuição da expressão do gene *RAB11A* em presença de tuberculose ativa constitui um efeito que pode ser detectado a longo prazo em indivíduos vacinados com BCG, com possíveis implicações na resposta ao bacilo.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo geral

Identificar os perfis transcricionais associados à imunização com a vacina BCG e à tuberculose e o possível papel do gene *RAB11A* na doença.

3.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os perfis de expressão gênica em indivíduos com a tuberculose pulmonar ativa, infecção latente e controles não infectados, vacinados ou não com a BCG, a partir de:
 - a) uma metanálise utilizando dados de microarranjo provenientes de um repositório público, o Gene Expression Omnibus (GEO);
 - b) uma metanálise utilizando dados de sequenciamento total de RNA (RNA-seq) provenientes de um repositório público, o Sequence Read Archive (SRA);
 - c) validação experimental dos resultados da metanálise utilizando amostras de sangue total de voluntários com tuberculose ativa, infecção latente e controles não infectados recrutados em Salvador, Brasil;
- Avaliar a expressão do gene *RAB11A* em células THP-1 estimuladas com diferentes cepas de micobactérias tuberculosas, incluindo a cepa laboratorial do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, e cepas provenientes de isolados clínicos.
- Avaliar in vitro o silenciamento gênico do *RAB11A* em células de linhagem THP-1.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

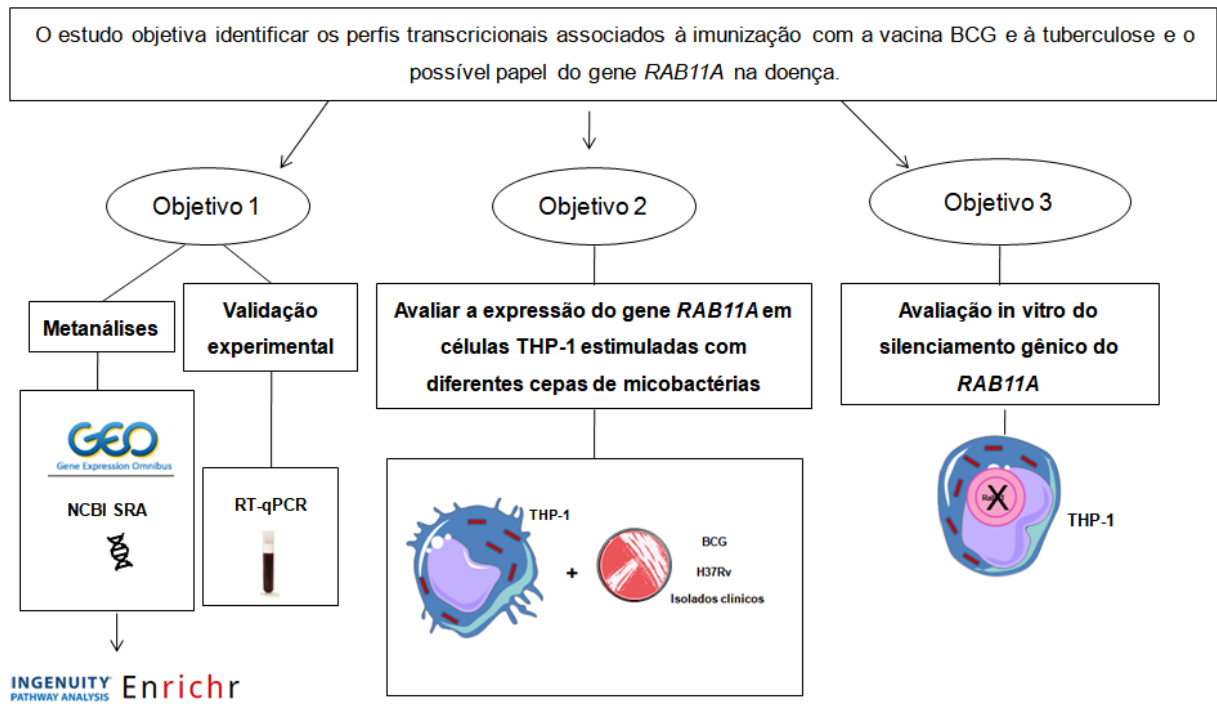


Figura 7- Representação esquemática do desenho de estudo.
Fonte: Elaboração da autora

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SELEÇÃO DOS CONJUNTOS DE DADOS DO GEO

Três conjuntos de dados (GSE19439, GSE19444, GSE19442) que continham dados de microarranjos, sendo provenientes da plataforma Illumina GPL6947, foram selecionados no Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nih.gov/geo>), um repositório público internacional que armazena e distribui livremente dados de transcriptômica enviados pela comunidade científica, a partir das palavras-chave “tuberculosis active latent expression gene OR pathogenesis tuberculosis” e dos critérios de inclusão, organismo *Homo sapiens*, amostras de sangue total, avaliação das formas clínicas da doença, definidas como tuberculose ativa (TBA) e infecção tuberculosa latente (ITBL), assim como controles não infectados (CNI), com a indicação do status vacinal de cada indivíduo com a BCG (BCG-: Não vacinados com a BCG e BCG+: Vacinados com a BCG) (Figura 8).

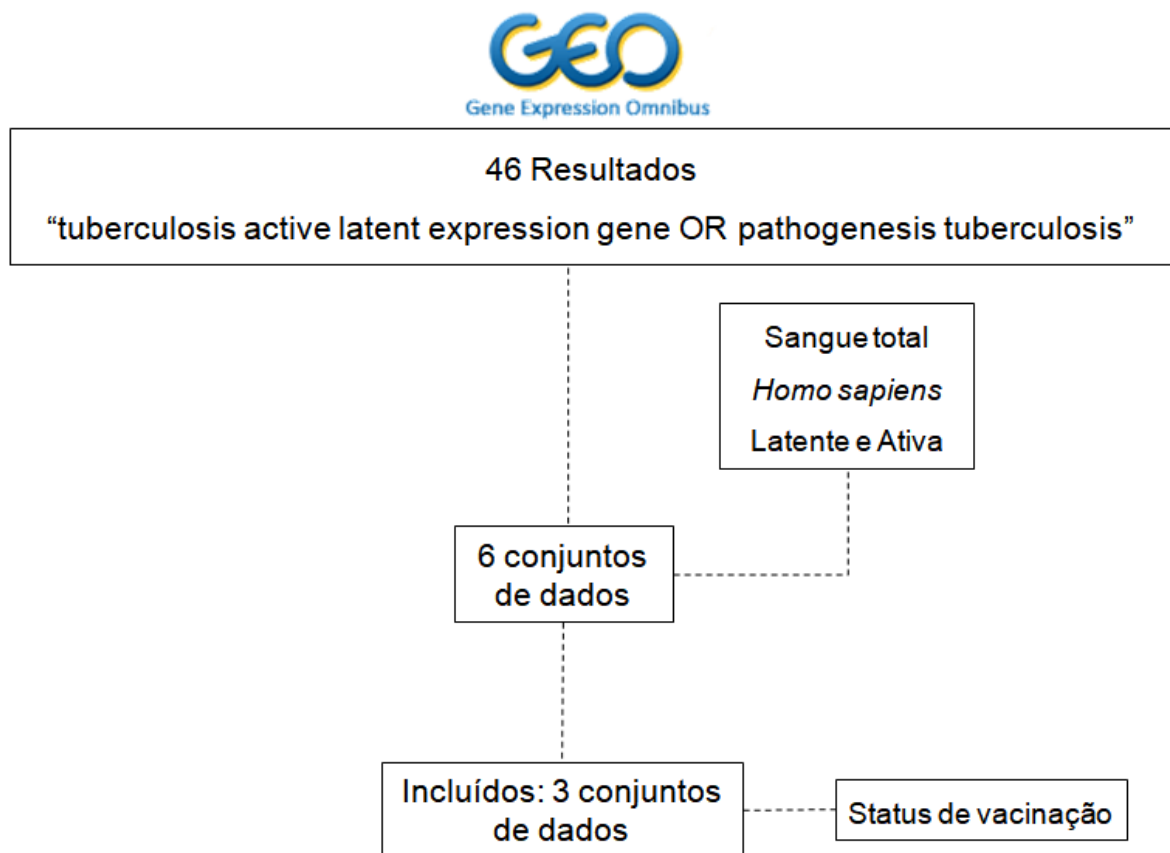


Figura 8 - Seleção dos conjuntos de dados do GEO.

Fonte: Elaboração da autora

Os conjuntos de dados continham amostras de indivíduos provenientes do Reino Unido e África do Sul, com uma média de idade de 64 anos (intervalo de 18-78 anos) e pertenciam a uma mesma publicação, PMID 20725040 (BERRY et al., 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 - Características dos conjuntos de dados do GEO.

Series	Plataforma	Citação	Região geográfica	Grupos
GSE19439	Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947)	PMID: 20725040 Berry et al., 2010	Reino Unido	13 TBA (9 BCG+, 3 BCG-, 1 desconhecido) 17 ITBL (13 BCG+, 3 BCG-, 1 desconhecido) 12 CNI (6 BCG+, 6 BCG-)
GSE19444	Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947)	PMID: 20725040 Berry et al., 2010	Reino Unido	21 TBA (13 BCG+, 2 BCG-, 6 desconhecidos) 21 ITBL (18 BCG+, 3 BCG-) 12 CNI (BCG+)
GSE19442	Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947)	PMID: 20725040 Berry et al., 2010	África do sul	20 TBA (6 BCG+, 14 BCG-) 31 ITBL (4 BCG+, 22 BCG-, 5 desconhecidos)

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

Fonte: Elaboração da autora

Sete amostras outliers (contendo valores atípicos ou anormais) foram excluídas das análises durante o tratamento dos dados, devido à possibilidade de influenciar diretamente nos resultados finais. Estas amostras incluíam 5 indivíduos ITBL (4 BCG+ e 1 BCG-), 1 CNI (BCG-) e 1 TBA (BCG+). Também não foram consideradas amostras sem a informação sobre o status de vacinação do indivíduo. Após tratamento dos dados, foram incluídos para as avaliações 64 indivíduos vacinados, dos quais 27 possuíam a forma ativa da doença, 31 a infecção latente e 6 eram controles não infectados. Para os não vacinados (n=51), 19 tinham a forma ativa, 27 a forma latente e 5 eram controles não infectados. Nos conjuntos de dados, os indivíduos com a tuberculose ativa foram confirmados pelo isolamento do *Mtb* em cultura de

escarro ou lavado broncoalveolar; os indivíduos com a infecção latente pela positividade ao ensaio IGRA (especificamente o Quantiferon), ausência de evidências clínicas, radiológicas ou microbiológicas, e positividade ao teste tuberculínico (enduração >14mm para vacinados e >5mm para não vacinados); e os controles não infectados pela negatividade ao IGRA e ao teste tuberculínico (considerando uma enduração <5mm).

5.2 SELEÇÃO DOS CONJUNTOS DE DADOS DO SRA

Com a proposta de validação adicional à metanálise realizada com os conjuntos de dados do GEO, outro repositório de dados foi considerado para uma metanálise secundária. Para tal, foi feita a busca no Sequence Read Archive (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), um repositório público de sequenciamento de alta performance, a partir das palavras-chave “tuberculosis AND BCG vaccinated” e “tuberculosis AND BCG unvaccinated” e com a aplicação dos critérios de inclusão: organismo *Homo sapiens* e avaliação em amostras de sangue total. Considerando os critérios de inclusão e as palavras-chave previamente estabelecidas, foi possível identificar 19 bibliotecas contendo dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq) de indivíduos vacinados, sendo 11 com a infecção latente e 9 controles não infectados, e 9 bibliotecas referentes a não vacinados, das quais 5 são de indivíduos com a infecção latente e 4 de controles não infectados (Figura 9).

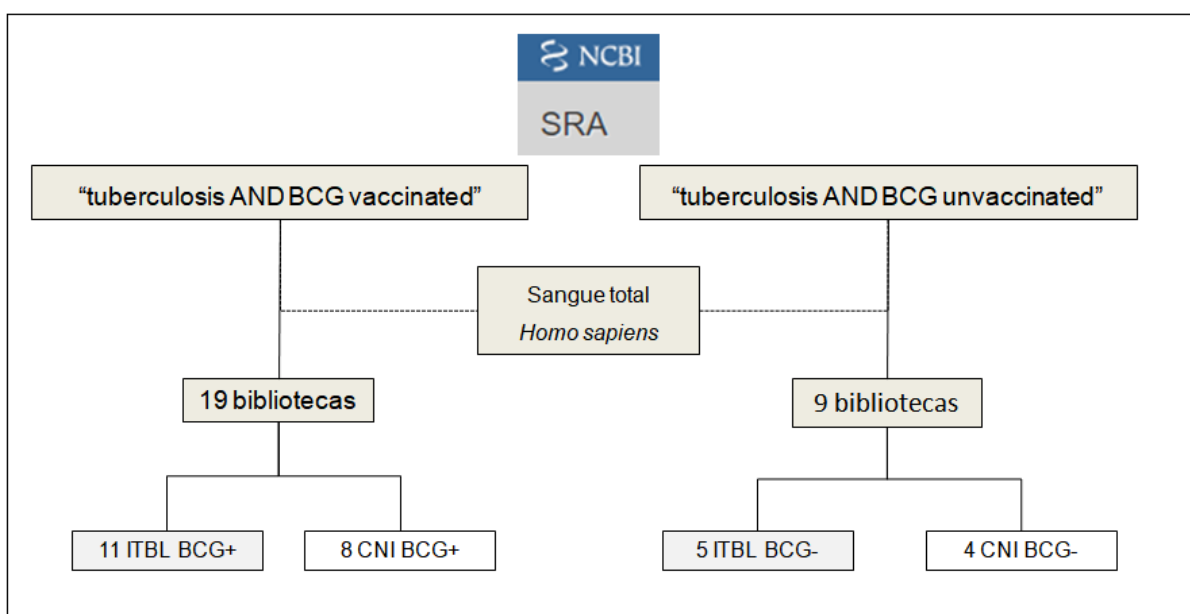


Figura 9 - Triagem realizada no repositório SRA. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado, BCG-: Não vacinado com a BCG, BCG+: Vacinado com a BCG.

Fonte: Elaboração da autora

Todas as bibliotecas encontradas foram avaliadas por meio da plataforma Illumina HiSeq2500 (GPL16791) e pertenciam à publicação PMID: 27826286 (DE ARAÚJO et al., 2016) (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição das bibliotecas encontradas no repositório SRA.

GRUPO	ACESSO GEO	ACESSO SRA	PLATAFORMA	PUBLICAÇÃO (PMID)
CNI BCG+	GSM2226839	SRX1899093		
	GSM2226836	SRX1899090		
	GSM2226834	SRX1899088		
	GSM2226830	SRX1899084		
	GSM2226828	SRX1899082		
	GSM2226824	SRX1899078		
	GSM2226821	SRX1899075		
	GSM2226815	SRX1899069		
ITBL BCG+	GSM2226838	SRX1899092	ILLUMINA (Illumina HiSeq 2500) (GPL16791)	PMID: 27826286 De Araújo et al., 2016
	GSM2226837	SRX1899091		
	GSM2226812	SRX1899066		
	GSM2226833	SRX1899087		
	GSM2226831	SRX1899085		
	GSM2226826	SRX1899080		
	GSM2226823	SRX1899077		
	GSM2226820	SRX1899074		
	GSM2226819	SRX1899073		
	GSM2226814	SRX1899068		
GSM2226813	SRX1899067			

	GSM2226832	SRX1899086
CNI BCG-	GSM2226829	SRX1899083
	GSM2226825	SRX1899079
	GSM2226808	SRX1899062
	GSM2226835	SRX1899089
	GSM2226827	SRX1899081
ITBL BCG-	GSM2226822	SRX1899076
	GSM2226816	SRX1899070
	GSM2226811	SRX1899065

Fonte: Elaboração da autora

Os parâmetros considerados para definição dos indivíduos com a infecção latente foram o teste tuberculínico positivo e IGRA+ e para os controles não infectados o teste tuberculínico negativo e IGRA-. O teste tuberculínico positivo foi considerado como uma induração igual ou maior que 5mm. Todas as bibliotecas foram provenientes de indivíduos recrutados no estado do Rio de Janeiro, Brasil, e a média de idade foi de 42.1 anos para os indivíduos controles e 45.5 para os indivíduos infectados (DE ARAÚJO, 2016). Não foram encontradas bibliotecas para indivíduos com a tuberculose ativa vacinados ou não com a BCG.

5.3 TRATAMENTO DOS DADOS

Para a metanálise do GEO, os dados brutos de cada conjunto de dados foram obtidos e incluídos para análise a partir do software Rstudio, utilizando o pacote Stats. Os dados de expressão foram normalizados por log2, buscando o ajuste dos dados para efeitos sistemáticos, e submetidos à correção através da ferramenta COMBAT, para reparo da variação experimental não-biológica (batch effects). O pacote arrayQualityMetrics, função outliers, método ks.test, foi utilizado para identificação e eliminação de amostras com valores discrepantes, que não se emparelhavam com os valores do seu grupo e poderiam tendenciar os resultados. O gráfico de diagnóstico, ACP (Análise de Componente Principal), foi utilizado

para demonstrar que as amostras se enquadram dentro dos seus respectivos grupos (Figura 10).

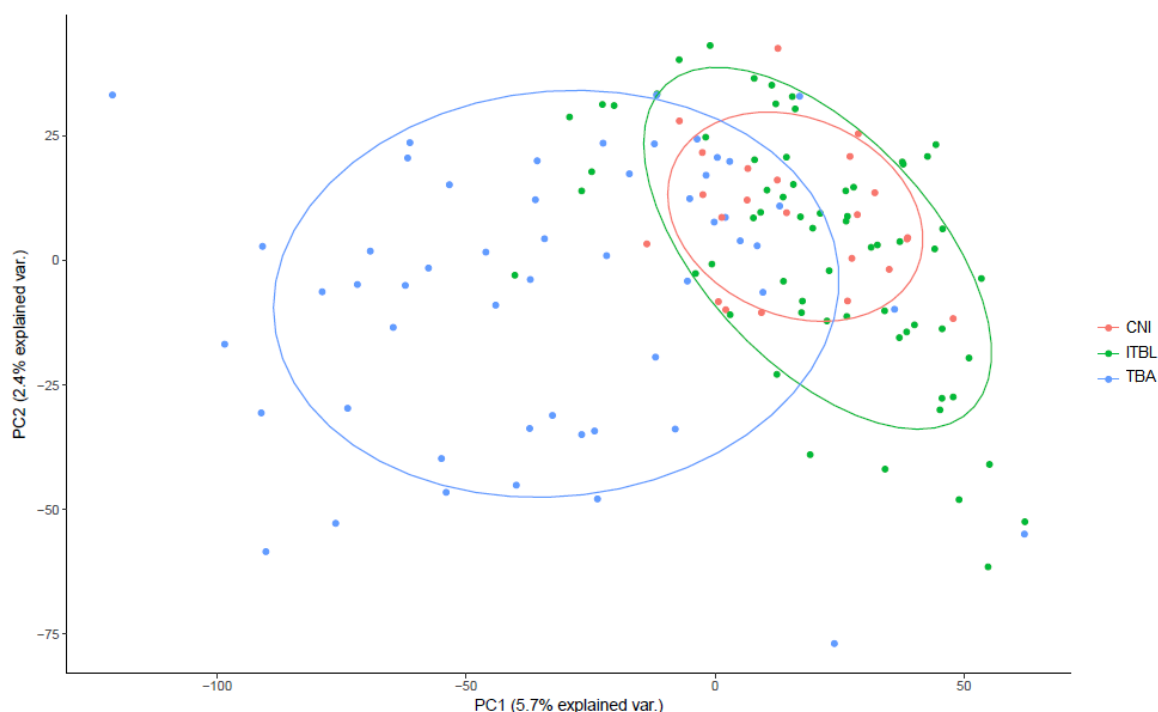


Figura 10. Representação da Análise de Componente Principal realizada com as amostras pertencentes aos grupos CNI, ITBL e TBA dos conjuntos de dados do GEO.

Fonte: Elaboração da autora

Para a metanálise do SRA, os dados das sequências dos conjuntos de dados foram recuperados do banco de dados SRA usando as ferramentas do SRA. Para todas as amostras, as bases de baixa qualidade foram removidas e os adaptadores foram aparados usando Trimmomatic V0.32 (1). Após a verificação de qualidade, as sequências foram pseudo-alinhadas ao transcriptoma humano (GRCh38 versão 100), compreendendo mRNA e ncRNA, com a ferramenta Salmon v1.2.0 (2). Após o mapeamento, os resultados obtidos pelo Salmon foram convertidos em tabelas de contagem com o pacote tximport (3) do R 4.0.2. A matriz de expressão de genes de contagem foi examinada pelo pacote DESeq2 (4) de R 4.0.2 para identificar os genes diferencialmente expressos (GDEs) nas comparações que foram previamente estabelecidas.

Para ambas as metanálises, as alterações nos níveis de expressão gênica foram consideradas significativas quando os valores do teste estatístico (valor de p ajustado para FDR) foram menores que 0,05 e a diferença de expressão de log₂ foi maior que 1,5 ou menor que -1,5.

5.4 SELEÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A identificação dos GDEs foi feita a partir de comparações entre os diferentes grupos experimentais usando análise estatística não paramétrica. O valor de p foi corrigido para múltiplas hipóteses, e ajustado utilizando a abordagem de False Discovery Rate (FDR). Considerou-se nas análises entre os diferentes grupos o nível de significância ($p\text{-value} < 0,05$) e fold-change de $\text{abs}\{\log_2(1,5)\}$. Para as análises do GEO foram definidos três grandes grupos estratificados quanto ao status de vacinação que foram comparados internamente a partir das diferentes formas clínicas: Grupo 1 – indivíduos vacinados e Grupo 2 - indivíduos não vacinados (comparação A: TB ativa vs latente, comparação B: TB ativa vs controles não infectados, comparação C: latente vs controles não infectados), Grupo 3 – não vacinados vs vacinados (comparação A: TB ativa não vacinados vs TB ativa vacinados, comparação B: latente não vacinados vs latente vacinados, comparação C: controles não infectados não vacinados vs controles não infectados vacinados) (Figura 11).

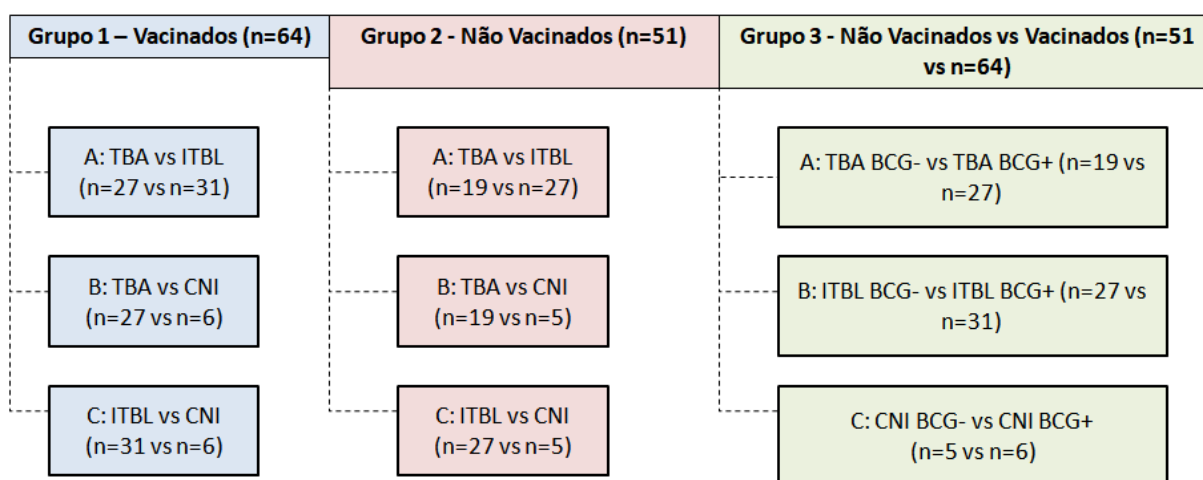


Figura 11- Definição dos grupos de comparação utilizados para definição dos GDEs nas análises do GEO. TBA: Tuberculose ativa, ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado, BCG-: Não vacinado com BCG, BCG+: Vacinado com BCG.

Fonte: Elaboração da autora

Para as análises do SRA, também foram considerados os três grandes grupos estratificados quanto ao status de vacinação, sendo que as comparações internas incluíram apenas os indivíduos com a infecção latente e controles: Grupo 1 – indivíduos vacinados e Grupo 2 - indivíduos não vacinados (comparação C: latente vs controles não infectados), Grupo 3 – não vacinados vs vacinados (comparação B: latente não vacinados vs latente

vacinados, comparação C: controles não infectados não vacinados vs controles não infectados vacinados) (Figura 12).

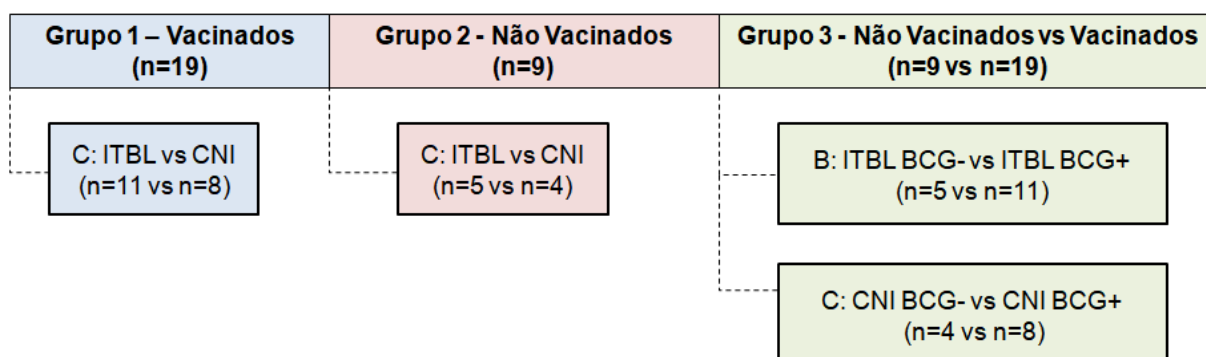


Figura 12 - Definição dos grupos de comparação utilizados para definição dos GDEs nas análises do SRA. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado, BCG-: Não vacinado com BCG, BCG+: Vacinado com BCG.

Fonte: Elaboração da autora

5.5 ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO

Os genes identificados foram carregados no *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Ingenuity Systems Inc. <http://ingenuity.com>) para caracterização destes, de acordo com as vias canônicas e funções celulares e moleculares ou foram analisados na ferramenta gratuita Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) para identificação das vias, considerando as bases de dados KEGG e Bioplanet, e funções associadas às moléculas, pelo GO Biological Process.

5.6 DESENHO DE PRIMERS

Moléculas-alvo foram selecionadas a partir da metanálise do GEO para validação experimental na nossa população de estudo. Com esta finalidade, primers foram desenhados para utilização em ensaios de PCR em tempo real (RT-qPCR). A sequência genômica do(s) gene(s) alvo foi obtida do website da University of California Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>) e o desenho dos primers foi feito a partir da ferramenta Primer3 (v.0.4.0). Primers foram desenhados para os genes-alvo *RAB11A*, *RAB11B* e *RAB25* e para os genes endógenos *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *TBP* (TATA-box binding protein) e *ACTB* (Actin beta). As sequências obtidas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Sequências de primers desenhados para os genes-alvo e endógenos. F=Foward e R=Reverse.

Gene- alvo	Primers	Sequência 5' 3'
<i>TBP</i>	Foward	AGACCATTGCACTTCGTGCCC
<i>TBP</i>	Reverse	GCTCCTGTGCACACCATTTTCCC
<i>ACTB</i>	Foward	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
<i>ACTB</i>	Reverse	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
<i>GAPDH</i>	Foward	GACCTGCCGTCTAGAAAAACC
<i>GAPDH</i>	Reverse	ACCACCTGGTGCTCAGTGTAG
<i>RAB11A</i>	Foward	AGGCACAGATATGGGACACAG
<i>RAB11A</i>	Reverse 1	CAGCCATCGCTCTACATTTTC
<i>RAB11A</i>	Reverse 2	TTCTTTCAGCCATCGCTCTAC
<i>RAB11B</i>	Foward	GTTGATTGATGCAGGGAGAAG
<i>RAB11B</i>	Reverse 1	GCTTCACTTGCAAACAGGTTC
<i>RAB11B</i>	Reverse 2	CTTCACTTGCAAACAGGTTC
<i>RAB25</i>	Foward	GCTCAGATCTGGGACACAGC
<i>RAB25</i>	Reverse 1	ACAGCATAGGTCTGGTGCTTG
<i>RAB25</i>	Reverse 2	ATAGAGCTCCTTCAGCCATCG
<i>RAB25</i>	Reverse 2	GGTCTGGTGCTTGGTTAGGTC

Fonte: Elaboração da autora

5.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS COM TB ATIVA

Amostras de sangue total de indivíduos com tuberculose ativa (recém-diagnosticados com tuberculose pulmonar apresentando sintomatologia e baciloscopia positiva) foram obtidas a partir de um estudo observacional realizado com uma coorte de comunicantes de pacientes adultos vinculado ao projeto “Avaliação da proteção conferida pela vacina

Mycobacterium bovis BCG a comunicantes de pacientes com tuberculose: uma estratégia para a prospecção de potenciais candidatos para novas vacinas e biomarcadores”, aprovado pelo IGM/Fiocruz sob o n° 1045, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IGM/Fiocruz sob o CAAE 16293713.9.0000.0040 e financiado pela FAPESB (Termo de Outorga PET0035/2013) e Programa Translacional da Fiocruz em Tuberculose (Projeto FioTBD1). Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética do IGM/Fiocruz, CAAE:06373319.4.0000.0040 e foi aprovado em 18 de Julho de 2019, CAAE: 06373319.4.0000.0040, Número do parecer: 3.459.716. Amostras destes indivíduos também foram processadas para o ensaio com o kit comercial QuantiFERON Gold In-Tube® (QFT, Qiagen), de acordo com instruções do fabricante, para controle interno do ensaio. Informações deste grupo de indivíduos foram obtidas do nosso banco de dados criado a partir do software EpiData v.3.1. Um total de nove amostras de indivíduos com tuberculose ativa vacinados e não vacinados com a BCG foram selecionadas na proporção de 2:1, onde foram incluídas amostras de 6 indivíduos com a tuberculose ativa e vacinados e 3 de não vacinados. Essas amostras foram utilizadas para avaliação de expressão gênica nos ensaios de RT-qPCR. Idade, sexo e resultado do IGRA (pelo quantiferon) estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características dos indivíduos com tuberculose ativa não vacinados e vacinados com a BCG.

	Tuberculose ativa (BCG-) (3 amostras)	Tuberculose ativa (BCG+) (6 amostras)
Idade	41-50 anos	42-49 anos
Sexo		
Feminino	100%	50%
Masculino	-	50%
IGRA	100%	100%
Positivo		

Fonte: Elaboração da autora

5.8 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1

Células THP-1, uma linhagem de monócitos humanos derivada de um paciente com leucemia monocítica aguda, foram mantidas em meio RPMI-1640 (Gibco) com adição de

antibiótico, enriquecimento com 2nM de L-glutamina e suplementação com SBF (soro bovino fetal) (BOWDISH, 2011).

Para diferenciação em macrófagos, foi utilizado o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Foram testadas as concentrações de 0,1nM, 1nM, 10nM, 20nM, 100nM e 200nM para definição da concentração que seria suficiente para permitir a diferenciação adequada das células. A concentração de 100nM foi definida como a ideal para a diferenciação das células de acordo com o aspecto, aderência e viabilidade.

As células THP-1 foram utilizadas nos ensaios de avaliação da expressão gênica por RT-qPCR e nos ensaios de silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi).

5.9 CULTIVO DE MICOBACTÉRIAS

Para os experimentos de infecção foram utilizadas cepas de micobactérias consideradas com variados graus de virulência: desde a cepa vacinal (*M. bovis* BCG Moreau-RJ), à cepa de *Mtb* virulenta H37Rv (laboratorial, da família *Latin-American Mediterranean* - LAM) e aos isolados clínicos de *Mtb* previamente caracterizados pelo nosso grupo, da família LAM, com diferente representatividade entre os isolados em circulação na cidade de Salvador (CARNEIRO, 2020). Foram utilizados 2 isolados de alta prevalência (sit 42 76937 e 120412) e 1 isolado de baixa prevalência (sit 58 80010) deste estudo. A família LAM pertence à linhagem 4 do completo *Mtb* e está amplamente distribuída no continente americano, sendo caracterizada por sua alta virulência e dispersão.

As cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv - American Type Culture Collection – ATCC 25618, New York, NY, USA) e *Mycobacterium bovis* (linhagem BCG - Montreau) foram obtidas da coleção mantida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / FIOCRUZ (INCQS/FIOCRUZ/RJ). Os três isolados clínicos foram obtidos por realização de projeto anterior, intitulado “Estudo da distribuição espacial e padrões de transmissão da Tuberculose em Salvador através de técnicas moleculares e de análises de redes complexas”, CAAE 0016.0.069.000-07, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde Coletiva (CEP-ISC) da UFBA (Universidade Federal da Bahia), e com a colaboração formal do Laboratório Central do Estado da Bahia (LACEN-SESAB), instituição onde os isolados de micobactérias utilizados neste estudo foram tipados ao nível de espécie. A manutenção das cepas, bem como todos os experimentos envolvendo a infecção e manipulação de culturas com micobactérias, foram realizadas em ambiente de nível de biossegurança 3 (NB3). As cepas foram reidratadas e cultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco, MI, USA)

suplementado com 10% de ADC (albumin dextrose concentrate – BD BBL – Sparks, MD, USA), com adição ou não de glicerol, e em seguida mantidas a 37°C em estufa bacteriológica, por um período de 10 dias. Após incubação, suspensões homogêneas de micobactérias foram obtidas por vórtex em tubo Falcon fechado contendo esferas de vidro, para desagregação das células. A concentração de micobactérias na suspensão foi definida pela escala de McFarland e pela análise da turbidez por densidade óptica utilizando um comprimento de onda de 560nm aferida por espectrometria. Para manutenção do biorrepositório do grupo, parte das alíquotas quantificadas foram estocadas em meio líquido a 20% de glicerol, em uma temperatura de -80°C.

5.10 INFECÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 COM MICOBACTÉRIAS

No ensaio para avaliação da expressão gênica, células THP-1 foram adicionadas e diferenciadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 em cada poço. Os macrófagos foram infectados com as diferentes cepas em uma taxa de infecção de 10 bacilos para 1 macrófago (10:1), durante o período de 2 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado para retirada das micobactérias não internalizadas e meio foi adicionado para manutenção das células por diferentes períodos de tempo. Após 24h e 48h, o sobrenadante foi retirado e 750µL de TRIzol foram adicionados para posterior extração de RNA (Ácido Ribonucléico) e utilização em experimentos de análise gênica. A execução deste experimento foi realizada no Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Pernambuco, já que os experimentos envolvem a realização de procedimentos com necessidade de utilização de laboratório com nível de segurança biológica de classe 3 (NB3), capaz de contenção de microorganismos de disseminação aérea com difícil controle e tratamento (BRASIL, 2015). Apesar de possuir um laboratório NB3, no período de desenvolvimento deste trabalho, o Instituto Gonçalo Moniz suspendeu as atividades do laboratório, dificultando a realização dos experimentos na mesma instituição. Com isso, os experimentos previstos foram realizados no período disponibilizado de 1 mês (janeiro/fevereiro de 2022). Considerou-se para este ensaio de infecção: um grupo controle com células não infectadas, um grupo de células infectadas com a cepa vacinal BCG, um grupo de células infectadas com a cepa laboratorial H37Rv e um grupo de células infectadas com cada um dos três isolados clínicos (2 de alta e 1 de baixa prevalência) selecionados, totalizando 6 grupos distintos. Para extração de RNA, foi feito um pool de 2 poços por condição avaliada.

Células THP-1 também foram infectadas com a cepa vacinal BCG, na proporção de 10:1, para realização dos ensaios de silenciamento gênico descritos neste trabalho.

5.11 EXTRAÇÃO DE RNA E CONVERSÃO PARA DNA COMPLEMENTAR

O RNA total do sangue periférico de indivíduos diagnosticados com a TB ativa (item 5.7) foram extraídos com o reagente TRIzol LS Reagent® (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante, com algumas modificações consideradas para amostras de sangue total. Para cada 250µL de sangue total, foram adicionados 750µL de TRIzol. Antes de se iniciar o protocolo do fabricante, realizamos uma pré-etapa de tratamento das amostras, que consistiu em centrifugar o sangue com Trizol por 10 minutos, a 4°C, e 12.000 r.p.m. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após essa etapa, seguiu-se o protocolo do fabricante. Ao final da extração, as amostras de RNA foram ressuspendidas em 30µL de Água Ultrapura livre de DNases e RNases (Invitrogen™) e quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific™) para verificação da concentração e pureza (razão 260/280).

O RNA das amostras de sangue total obtidas dos indivíduos com tuberculose ativa foi extraído e as concentrações e pureza foram determinadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantificação das amostras de RNA obtidas de sangue total dos indivíduos com tuberculose ativa.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Relação 260/280
A1 TBA BCG-	971,9	1,97
A2 TBA BCG-	1488,2	1,76
A3 TBA BCG-	1217,2	2,17
A1 TBA BCG+	939,6	2,15
A2 TBA BCG+	1139,5	2,20
A3 TBA BCG+	508,9	1,65
A4 TBA BCG+	1562,7	2,11
A5 TBA BCG+	1336,7	2,14
A6 TBA BCG+	987,6	2,07

Fonte: Elaboração da autora

Amostras de RNA das células THP-1 infectadas ou não com as diferentes cepas de micobactérias também foram extraídas seguindo o mesmo protocolo e a concentração e pureza foram determinadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Quantificação das amostras de RNA obtidas das células THP-1 infectadas ou não com as cepas de micobactérias.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Relação 260/280
THP-1 NI 24H	95,2	1,94
THP-1 BCG 24H	65,2	1,88
THP-1 H37RV 24H	56,3	1,85
THP-1 80010 24H	59,0	1,91
THP-1 76937 24H	67,0	1,89
THP-1 120412 24H	47,5	1,91
THP-1 NI 48H	35,0	1,85
THP-1 BCG 48H	54,6	1,89
THP-1 H37RV 48H	38,3	1,89
THP-1 76937 48H	30,5	1,85
THP-1 120412 48H	55,5	1,90

Fonte: Elaboração da autora

Amostras de RNA das células THP-1 infectadas ou não com a cepa vacinal BCG e utilizadas nos ensaios de silenciamento também foram extraídas e a concentração e pureza foram determinadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Quantificação das amostras de RNA obtidas das células THP-1 infectadas ou não a cepa vacinal BCG para uso nos ensaios de silenciamento gênico.

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	Relação 260/280
THP-1 NI	3,1	1,64
THP-1 NI siRNA C-	3,0	1,79
THP-1 NI siRNA <i>RAB11A</i>	6,7	1,76
THP-1 NI siRNA <i>GAPDH</i>	5,1	1,64
THP-1 BCG	6,0	1,82
THP-1 BCG siRNA C-	2,0	4,34
THP-1 BCG siRNA <i>RAB11A</i>	1,8	1,76
THP-1 BCG siRNA <i>GAPDH</i>	3,1	2,33

Fonte: Elaboração da autora

A síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi performada a partir do Kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™), seguindo-se as instruções do fabricante. Para preparo do cDNA, considerou-se diferentes concentrações de RNA, de acordo com o rendimento obtido em cada experimento. 1 μ g de RNA total foi utilizado no processo para as amostras de sangue total, 300ng foi considerado para as amostras das células THP-1 infectadas e não infectadas com as diferentes cepas de micobactérias e 15ng para as amostras de células THP-1 infectadas ou não com a cepa vacinal BCG utilizadas nos ensaios de silenciamento gênico.

5.12 PCR EM TEMPO REAL

O método de PCR em tempo real requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados aconteçam com alta eficiência. Desta forma, cada par de primers (forward-reverse) foi submetido a duas etapas de padronização, uma etapa inicial de otimização foi realizada para se definir a concentração ideal para uso dos primers desenhados e sua especificidade. Uma etapa posterior de validação foi executada para se definir a

eficiência de amplificação da reação a partir de uma curva padrão de cDNA. Nesta etapa, cada par de primer com sua concentração fixa ideal previamente estabelecida é submetido a uma curva padrão de diluição seriada de cDNA considerando as condições: amostra concentrada e diluída nas proporções 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Os ensaios foram conduzidos no aparelho ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando-se o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). Os ciclos de amplificação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão. A curva de dissociação (Melt curve) também foi selecionada para que a especificidade das reações fosse garantida. Como controle negativo da reação, foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os primers, na ausência do cDNA. Uma vez que a concentração ideal dos primers (otimização) foi determinada, e estes, foram validados (validação) não havia mais a necessidade de se repetir essas etapas e a análise de expressão dos genes alvo pôde ser executada. Nesta etapa de padronização, foram utilizadas amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) de indivíduos controles não infectados estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), que foi empregado como controle positivo nas padronizações de primers. Também foram utilizadas células HACAT e HepG2. O tipo de amostra utilizada foi determinada de acordo com a expressão descrita na literatura para cada gene. As reações de otimização e validação foram realizadas em duplicata.

O cálculo de eficiência dos pares de primers foi realizado pela fórmula: [Eficiência = $10(-1/\text{slope}) - 1$]. O valor de slope é determinado pela inclinação da curva gerada pelos dados de regressão linear dos valores de amplificação Ct em função das concentrações do cDNA.

O aumento ou a diminuição na expressão gênica foi determinado pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{alvo})} - \Delta Ct_{(\text{controle})}$. Os valores de Ct (do inglês, Cycle threshold: ciclo de amplificação acima do limiar) foram obtidos no 7500 software v2.0.6.

A eficiência do gene-alvo e a do gene-referência devem ser aproximadamente iguais para que haja uma maior acurácia entre as comparações, preferencialmente entre 90 a 110%. O slope obtido deve corresponder a um valor entre -3,6 e -3,1 (LOBO; LOBO, 2014). Os primers desenhados para avaliação da expressão de *RAB25*, *RAB11A* e *ACTB* atenderam aos requisitos para a realização de PCR quantitativo e foram considerados para as avaliações (Tabela 8).

Para o gene *RAB11A*, utilizou-se as células HACAT como amostras-controle. A melhor concentração determinada foi de 125nM, utilizando as sequências de primers F+R1, e a eficiência dos primers ficou definida em 105,17% com o valor de slope de -3,204. A validação também foi feita em PBMC's estimulados com PHA e os resultados foram

similares. Com o gene *RAB25*, utilizou-se também as células HACAT como amostras-controle. Definiu-se a melhor concentração de 125nM utilizando as sequências de primers F+R1. A eficiência dos primers foi de 97,81% e o valor de slope de -3,3755. Para o *RAB25*, não foi possível realizar a padronização em PBMC's estimulados com PHA, pois não foi observada expressão nesse tipo celular. Em relação ao gene endógeno *ACTB*, foram utilizados os PBMC's estimulados com PHA como amostras-controle. A melhor concentração definida para o *ACTB* foi de 125nM e a eficiência dos primers ficou definida em 112,33% com valor de slope de -3,058 (Tabela 9). A expressão do gene *RAB11A* em indivíduos com a tuberculose ativa e não vacinados comparado com àqueles vacinados, foi determinada, portanto, pelo ensaio de PCR em tempo real, utilizando-se o gene endógeno *ACTB*.

Tabela 9 - Padronização dos primers para os genes-alvo previamente selecionados.

GENE	EFICIÊNCIA	SLOPE
<i>RAB11A</i>	105,17%	-3,204
<i>RAB25</i>	97,81%	-3,375
<i>ACTB</i>	112,33%	-3,058
<i>GAPDH</i>	172,43%	-2,297
<i>RAB11B</i>	561,73%	-1,218
<i>TBP</i>	-	-

Fonte: Elaboração da autora

Apesar de padronizado, o *RAB25* não foi utilizado nas avaliações posteriores, visto que sua ausência de expressão em células sanguíneas foi confirmada durante as avaliações (*RAB11B* também não demonstrou expressão detectável neste tipo celular, apenas para as células HepG2) (Figura 13). Em adição, o *RAB25* também foi testado com um pool das amostras dos indivíduos doentes vacinados e não vacinados, onde também não foi observada expressão deste gene. Desta forma, para os experimentos seguintes de avaliação gênica e silenciamento, foi considerado apenas o uso do *RAB11A* (Figura 14).

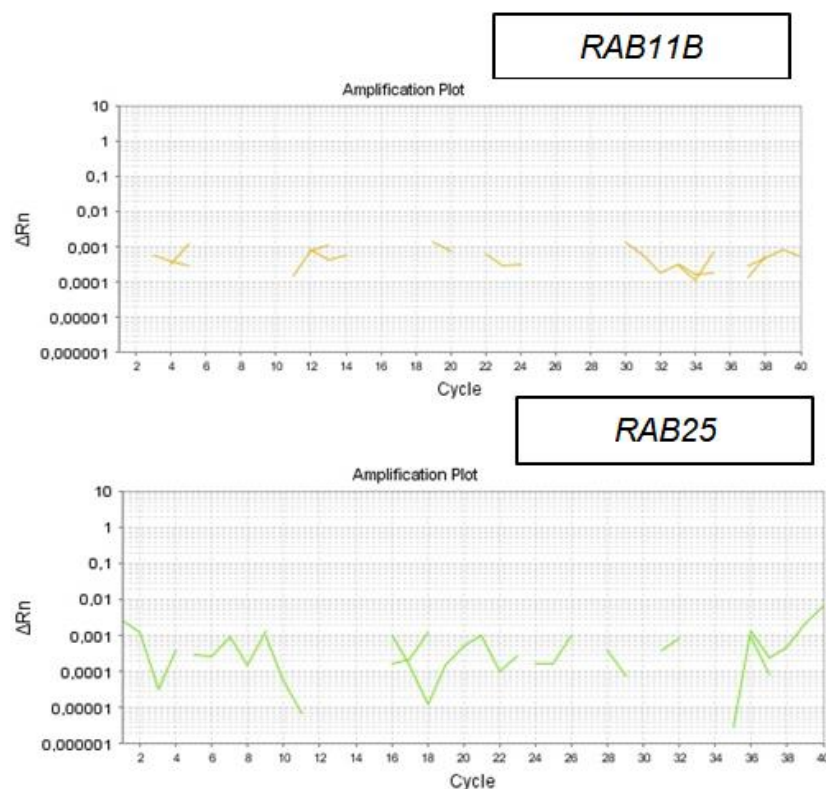


Figura 13 - Expressão dos genes *RAB25* e *RAB11B* em PBMC's.

Fonte: Elaboração da autora

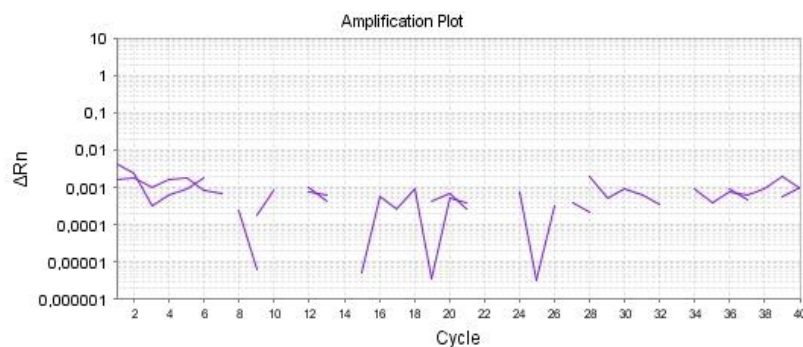


Figura 14 - Expressão do gene *RAB25* no pool das amostras de indivíduos com tuberculose ativa vacinados ou não com a BCG.

Fonte: Elaboração da autora

Com as etapas de padronização finalizadas, seguiram-se os ensaios para avaliação da expressão do gene alvo *RAB11A* nas amostras de indivíduos com a TB ativa vacinados e não vacinados da nossa população, assim como nas amostras de células THP-1 infectadas com as diferentes cepas de micobactérias. Os ensaios foram realizados em triplicata, e o gene endógeno *ACTB* foi utilizado como normalizador do experimento.

5.13 SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA

Objetivando o silenciamento do gene *RAB11A*, a metodologia do RNA de interferência foi empregada. Para tal, a concentração de 1.2×10^5 por poço de células THP-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços. As células foram então diferenciadas em macrófagos utilizando-se 100nM de PMA, e após diferenciação seguiu-se o protocolo de silenciamento. Foram consideradas as seguintes condições de avaliação: células THP-1 não infectadas, células infectadas com a cepa vacinal BCG, células não infectadas e silenciadas para o *RAB11A*, células infectadas com BCG e silenciadas para o *RAB11A*, células não infectadas e com o controle negativo do silenciamento, células infectadas e com o controle negativo do silenciamento, células não infectadas e com o controle positivo *GAPDH*, e células infectadas e com o controle positivo *GAPDH*.

Para o silenciamento, foi feita a mistura de 190 μ L de meio Opti-MEM (Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, Gibco) e 6 μ L de Oligofectamina (Oligofectamine™ Transfection Reagent, Invitrogen) e aguardada a incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o RNA de interferência (concentração final de 100nM) correspondente a cada condição (condição alvo: ON-TARGETplus Human RAB11A siRNA - SMARTpool; controle positivo: ON-TARGETplus GAPD Control Pool; controle negativo: ON-TARGETplus Non-targeting Pool; todos da Dharmacon, concentração de 5nmol), e realizada a incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 800 μ L de meio Opti-MEM à mistura. Realizou-se então a completa retirada dos meios presentes nos poços contendo as células THP-1, foram adicionados 1000 μ L dos mixes de silenciamento correspondentes a cada condição e feita a incubação à 37°C, por 6h. Depois desse período, o sobrenadante foi retirado, 3mL do meio RPMI completo foi adicionado e realizou-se a incubação overnight. Após o silenciamento, as células foram infectadas com a cepa vacinal BCG na proporção de 10:1 no período de 2h. Em seguida, o sobrenadante das culturas foi retirado e 750 μ L de TRIzol foi adicionado para posterior extração de RNA. A avaliação da eficácia do silenciamento foi realizada pela análise da expressão gênica do *RAB11A* por RT-qPCR.

5.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis são apresentadas como diferença de expressão (\log_2 ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Comparações entre grupos foram realizadas utilizando testes paramétricos para distribuições

normais e não-paramétricos quando se verificou desvio significativo da normalidade. Foram consideradas significativas as diferenças cujo p-valor calculado foi inferior a 0.05. Os resultados são apresentados em tabelas e em gráficos realizados utilizando o programa GraphPad Prism (versão 9.3.1, GraphPad Software). Os testes não foram realizados na avaliação da expressão gênica do *RAB11A* em amostras da nossa população, devido ao reduzido número de amostras.

6 RESULTADOS

6.1 METANÁLISE A PARTIR DE DADOS DEPOSITADOS NO GEO

Considerando os três conjuntos de dados de sangue total (GSE19439, GSE19444, GSE19442) obtidos do repositório de dados públicos GEO NCBI, foram observadas diferenças nos padrões de expressão gênica ao se comparar os indivíduos com tuberculose ativa, infecção tuberculosa latente e controles não infectados, estratificados pelo status de vacinação com a BCG. Foram observados padrões distintos para os grupos avaliados, com um número maior de genes diferencialmente expressos identificados em indivíduos não vacinados (principalmente de genes modulados negativamente: em azul) e um número menor em indivíduos vacinados. Poucos genes se sobrepõem dentro de cada grupo avaliado, vacinados e não vacinados. Pode-se observar que os GDEs identificados são específicos para cada grupo, nenhum dos genes presentes nas comparações realizadas no grupo dos vacinados estão presentes no grupo dos não vacinados (Figura 15).

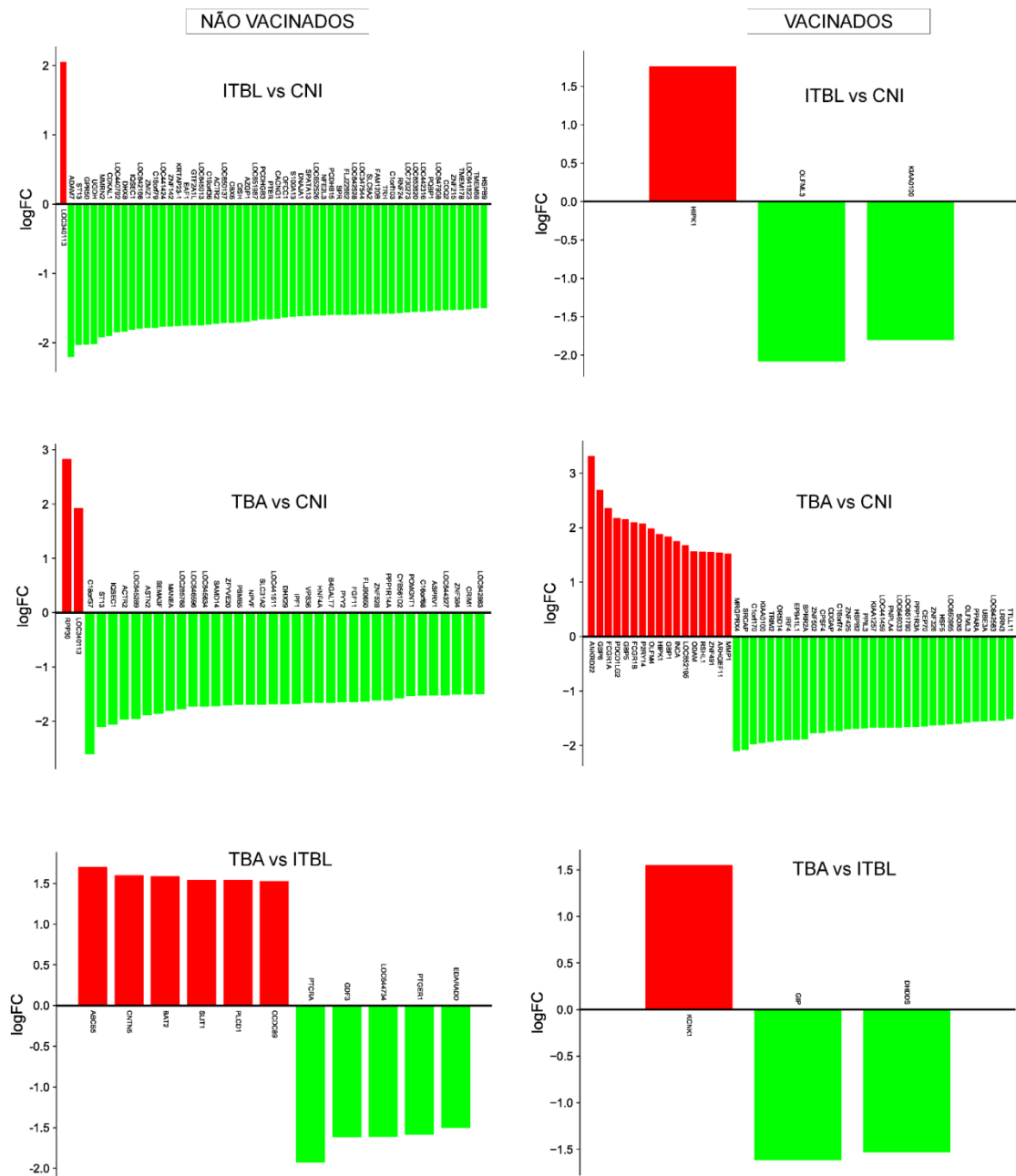


Figura 15 - GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados na metanálise do GEO. TBA: tuberculose ativa, ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado. Genes em vermelho: modulação positiva. Genes em verde: modulação negativa.

Fonte: Elaboração da autora

No total, foram identificados 100 genes diferencialmente expressos no grupo dos não vacinados, sendo que 4 foram observadas nas comparações envolvendo tanto indivíduos com a tuberculose ativa quanto com a infecção latente frente aos controles não infectados. Destes 100 genes, 92 estavam modulados negativamente e 8 estavam modulados positivamente. Em contrapartida, apenas 53 genes foram identificados em indivíduos vacinados, sendo 18

superexpressos e 35 subexpressos nas mesmas comparações. Poucos genes se sobrepõem dentro de cada grupo avaliado, vacinados e não vacinados. (Figura 16).

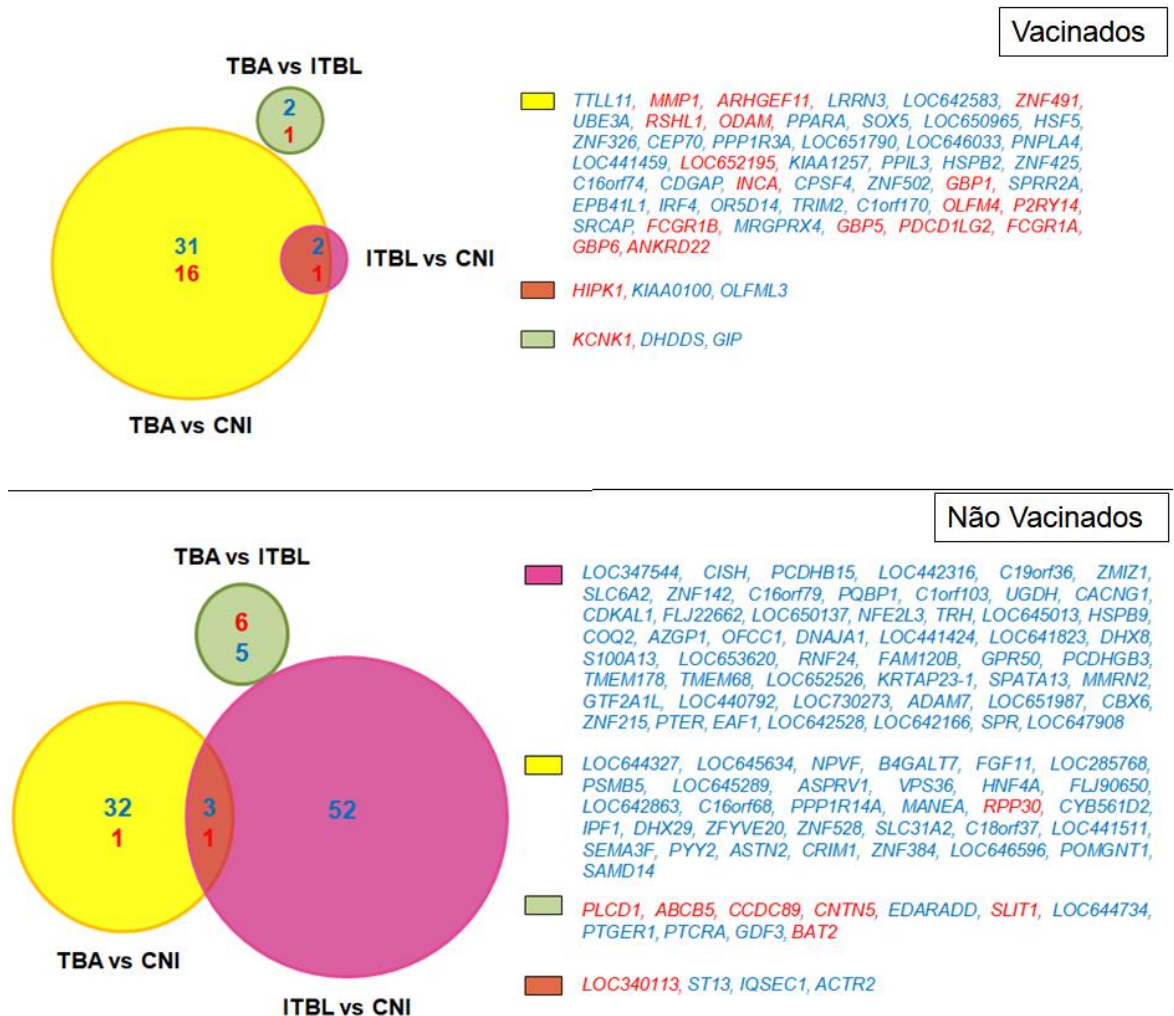


Figura 16 - Diagrama de Venn com os GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados na metanálise do GEO. TBA: tuberculose ativa, ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado. Genes em vermelho: modulação positiva. Genes em azul: modulação negativa.

Fonte: Elaboração da autora

Também se observou maior expressão dos genes *RAB25* e *SLC30A3*, ao se comparar os indivíduos com a TB ativa e não vacinados àqueles vacinados (Figura 17) (Tabela 10).

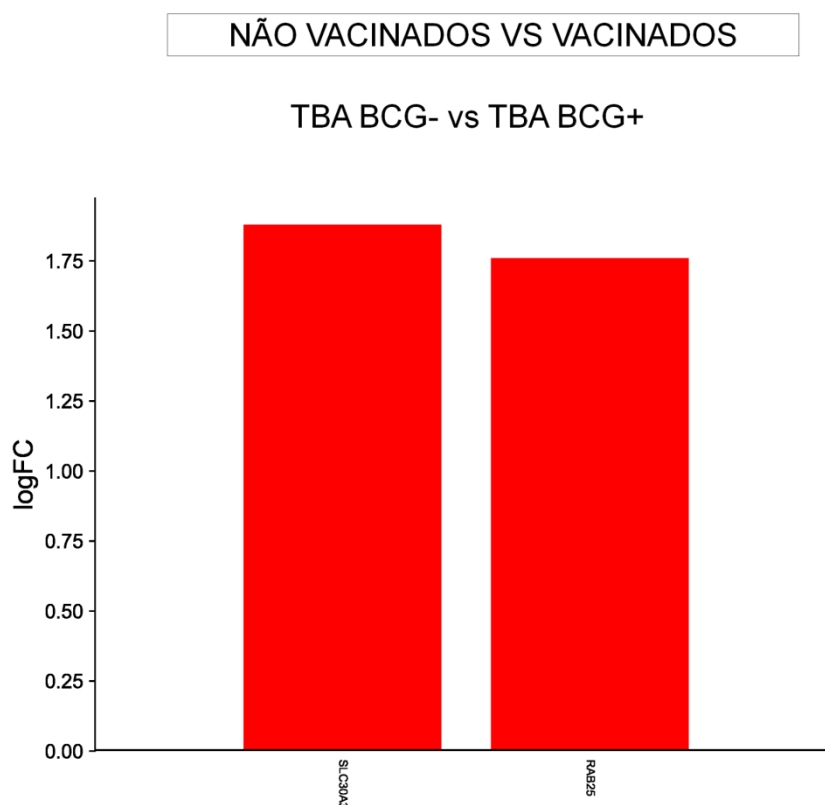


Figura 17 - GDEs encontrados no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação TBA BCG- vs TBA BCG+, na metanálise do GEO. TBA: tuberculose ativa, vermelho: modulação positiva.

Fonte: Elaboração da autora

Tabela 10 - Descrição dos genes diferencialmente expressos no Grupo 3 – Não Vacinados vs Vacinados, Comparação TBA BCG- vs TBA BCG+.

Gene	Valor de p	Valor de p corrigido	Diferença de expressão (log2)
<i>RAB25</i>	0,000003	0,01978	1,76
<i>SLC30A3</i>	0,00001	0,04567	1,88

Fonte: Elaboração da autora

6.2 VIAS E FUNÇÕES ASSOCIADAS AOS GENES IDENTIFICADOS

Os genes diferencialmente expressos encontrados no grupo dos não vacinados foram associados principalmente a vias e funções associadas ao metabolismo, enquanto para o grupo dos vacinados foram vistos genes ligados principalmente aos processos vinculados à imunidade. Esse resultado sinaliza que a BCG é capaz de modular a resposta do indivíduo por

períodos longos, já que as amostras avaliadas pertenciam a indivíduos com idade entre 18 e 78 anos.

Para os não vacinados, foram identificadas vias enriquecidas para os genes ativados ligadas a sinalização da orientação axonal, biossíntese de D-mio-inositol (1,4,5)-trifosfato, fosfolipases, via Wnt/Ca⁺ e sinalização de melatonina, enquanto que para os genes suprimidos para a sinalização de eicosanóides, sinalização MODY, biossíntese da região de ligação entre glicoaminoglicano-proteína, sinalização RhoA, hidrólise de Acyl-CoA, sinalização de endocitose mediada por clatrina, biossíntese de tetrahydrobiopterina, de UDP-D-xilose e UDP-D-glucoronato. Referente às funções celulares e moleculares, foram observados para os genes superexpressos processos ligados a morfologia, migração, organização, sobrevivência e morte celular, metabolismo de lipídeos, transporte molecular e modificação pós-transcricional do RNA. Para os genes subexpressos, foram vistas funções direcionadas a sinalização, desenvolvimento, crescimento, proliferação e ciclo celular, sinalização e interação célula-célula, metabolismo de macromoléculas, vitaminas e minerais, além da bioquímica de pequenas moléculas (Figura 18).

Em relação às vias, observou-se, dentro dos vacinados, que os genes modulados positivamente estão associados principalmente a vias de sinalização de IFN- γ , sinalização do sistema imune por interferons, interleucinas, prolactina e hormônios de crescimento, via de sinalização de mobilidade celular Rho, de sinalização do receptor NOD e fagocitose mediada Fc-gama-R e senescência celular. Para esse grupo ainda, foram encontrados genes subexpressos com associação a vias voltadas para a biossíntese de dolicol e fosfato de dolicol, sinalização mediada-GPCR, poliadenilação de mRNA, complexo proteassoma, metabolismo de retinol, via de sinalização de adipocitocina e do glucagon, diferenciação celular Th17, proteólise mediada ubiquitina e via de regulação da matriz extracelular mediante TGF-beta. Avaliando as funções celulares e moleculares, viu-se para os genes modulados positivamente, funções mais voltadas para o transporte molecular, resposta celular para IFN- γ , regulação da propagação celular mediada por adesão ao substrato, vias de sinalização mediada por citocinas, processamento e apresentação de antígenos de peptídeos exógenos mediante MHC de classe I e hemopoiese definitiva, processo apoptótico de células epiteliais, regulação da via de sinalização mediada pelo TNF e via de sinalização apoptótica extrínseca, e ainda, a regulação positiva da angiogênese. Foram observadas ainda funções ligadas à genes subexpressos caracterizadas pelo metabolismo de macromoléculas, transporte molecular, bioquímica de pequenas moléculas, comprometimento da linhagem Th17, regulação da diferenciação de células tronco mesenquimais, regulação negativa do armazenamento de

colesterol e do processo glicolítico, e regulação positiva da beta-oxidação de ácidos graxos (Figura 18).

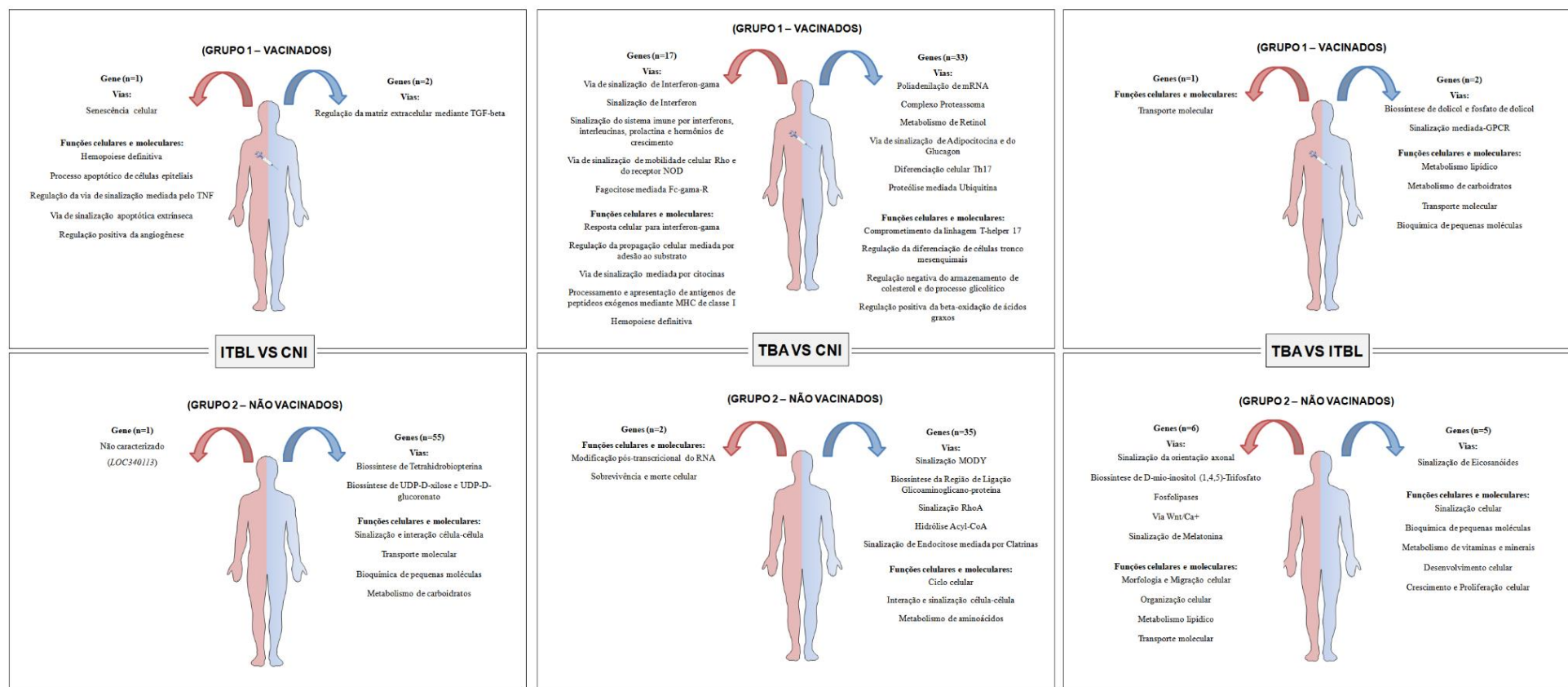


Figura 18 - Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos não vacinados e no grupo dos vacinados - metanálise GEO. Lado vermelho: genes com modulação positiva e lado azul: genes com modulação negativa. TBA: Tuberculose ativa, ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controles não infectados.

Fonte: Elaboração da autora

6.3 METANÁLISE SECUNDÁRIA PELO SRA

Objetivando identificar padrões gênicos e validar os dados obtidos na metanálise realizada no GEO, foi proposta a realização de uma metanálise secundária utilizando um outro repositório de dados de transcriptoma, o SRA. Os genes obtidos em ambas as metanálises foram sobrepostos para observação de genes presentes em comum nos diferentes grupos de comparação. Tanto para o grupo dos vacinados como para os não vacinados, não foi observada a presença de genes diferencialmente expressos comuns para ambas as metanálises (Figura 19).

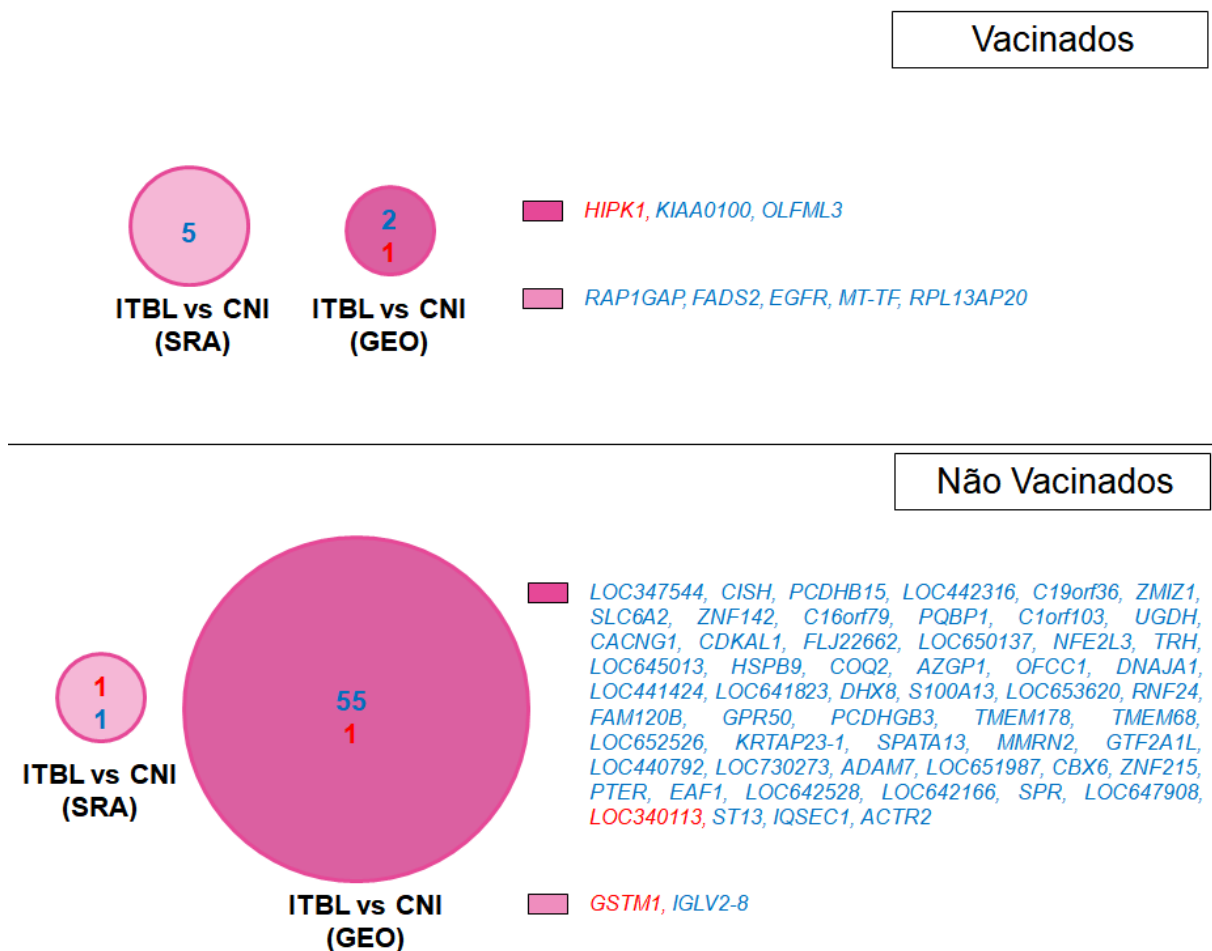


Figura 19 - Diagrama de Venn com os GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados nas metanálises do GEO e do SRA. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado. Genes em vermelho: modulação positiva. Genes em azul: modulação negativa.

Fonte: Elaboração da autora

No entanto, o gene descrito como *TRH* (do inglês, thyrotropin releasing hormone), identificado na metanálise do GEO como modulado negativamente nos indivíduos com a infecção latente não vacinados em relação aos controles não vacinados, também foi

encontrado em comum na tabela de genes da metanálise do SRA (tabela com os dados tratados antes da aplicação dos critérios de definição para genes diferencialmente expressos - o nível de significância, $p\text{-value} < 0,05$ e fold-change de \log_2 , $> 1,5$). Apesar de não ter se enquadrado no nível de significância considerado para a comparação realizada, pôde-se observar que a diferença de expressão encontrada condizia com o que foi identificado na metanálise do GEO (Tabela 11).

Tabela 11 - Gene comum nas metanálises do GEO e SRA, na comparação entre ITBL vs CNI no grupo dos Não Vacinados. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controles não infectados.

Gene	Valor de p	Valor de p corrigido	Diferença de expressão (log2)
<i>TRH</i> (metanálise do GEO)	0,00018	0,01745	-1,58
<i>TRH</i> (metanálise do SRA)	0,59086	1	-2,30

Fonte: Elaboração da autora

A metanálise secundária pelo SRA revelou assinaturas distintas, onde, considerando os vacinados, 5 genes estavam modulados negativamente nos indivíduos com a infecção latente em comparação com os controles em contrapartida com apenas 3 revelados pela metanálise do GEO na mesma comparação (2 subexpressos e 1 superexpresso). Para os não vacinados, foi possível identificar apenas 2 genes (1 modulado positivamente e 1 negativamente) pela metanálise do SRA, também na comparação entre latentes vs controles, em relação aos 56 observados na metanálise do GEO (Figura 20).

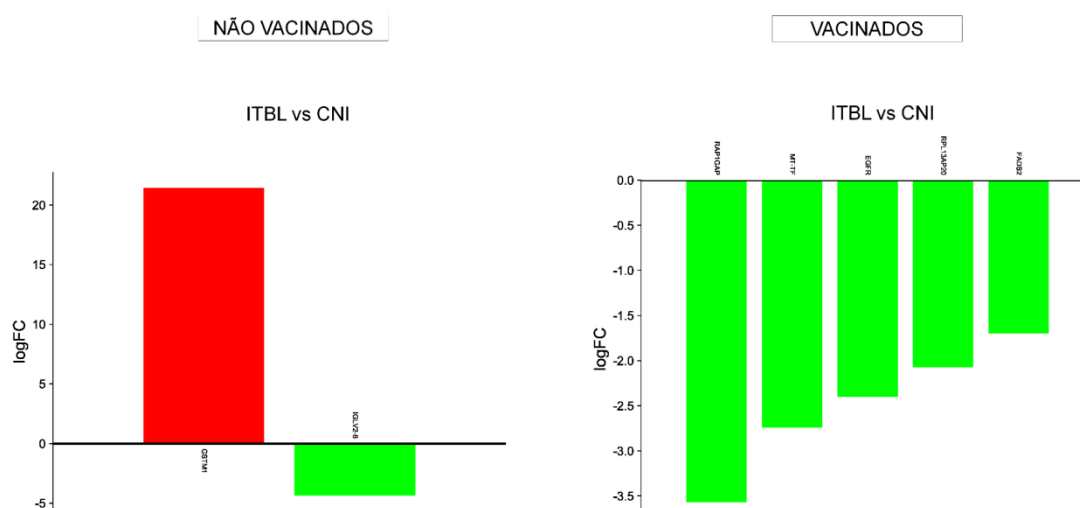


Figura 20 - GDEs encontrados nos grupos dos vacinados e não vacinados na metanálise do SRA. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado. Vermelho: modulação positiva. Verde: modulação negativa.

Fonte: Elaboração da autora

Referente às vias e funções celulares associadas aos genes, pode-se observar que um dos genes encontrado no grupo dos não vacinados, estando modulado positivamente nos indivíduos latentes em relação aos controles na metanálise do SRA, também está ligado a processos metabólicos, principalmente para o metabolismo da glutathiona, de drogas e de prostaglandina (Tabela 12).

Para os vacinados, foi visto que os 5 genes encontrados como subexpressos nos indivíduos latentes quando comparados aos controles na metanálise do SRA, estão associados diretamente com vias e funções importantes para a sinalização e proliferação celular, como a via de sinalização associada à proteína G alfa, sinalização pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e pelo Rap1 (Tabela 13).

Considerando as comparações entre indivíduos não vacinados e indivíduos vacinados, na metanálise pelo SRA foi possível observar genes diferencialmente expressos nessas condições, o que não havia sido observado na metanálise anterior realizada no GEO. Cinco genes estavam menos expressos nos indivíduos latentes e não vacinados, assim como nos controles não vacinados, em comparação com os grupos vacinados correspondentes. Em adição, 6 outros genes (4 subexpressos e 2 superexpressos) estavam modulados especificamente nos controles não vacinados em comparação com os vacinados (Figura 21 e 22).

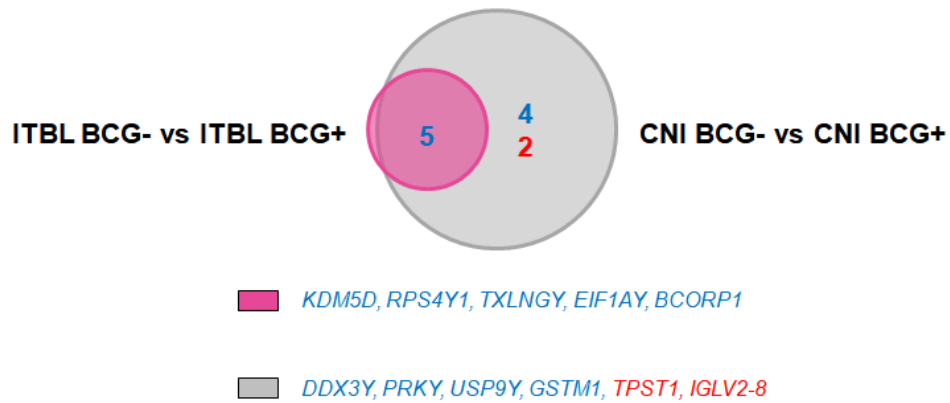


Figura 21 - Diagrama de Venn com os GDEs encontrados no grupo 3 - não vacinados vs vacinados, na metanálise do SRA. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado. Genes em vermelho: modulação positiva. Genes em azul: modulação negativa.
Fonte: Elaboração da autora

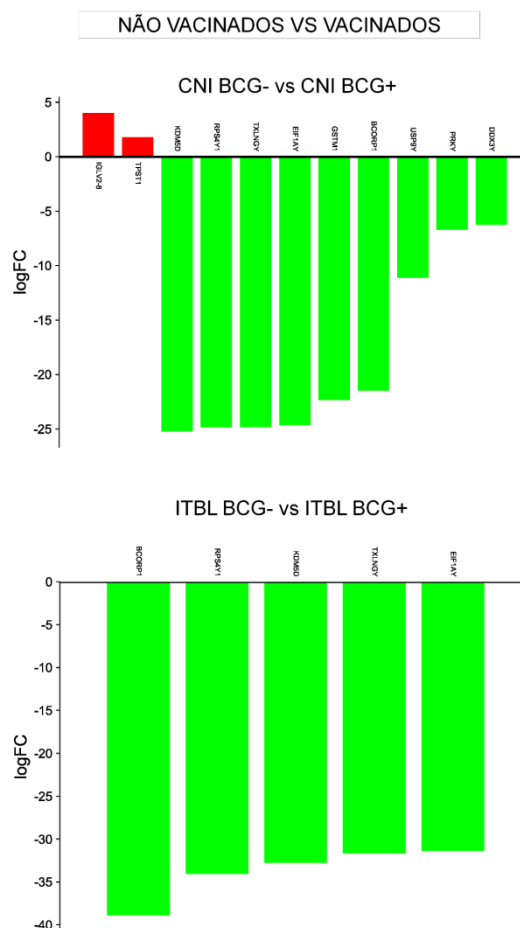


Figura 22 - GDEs encontrados no grupo 3 - não vacinados vs vacinados, na metanálise do SRA. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controle não infectado. Vermelho: modulação positiva. Verde: modulação negativa.
Fonte: Elaboração da autora

Para os 5 genes subexpressos identificados nos indivíduos com a infecção latente não vacinados quando comparados com aqueles vacinados, foram observadas vias e funções ligadas principalmente ao ribossomo, as histonas e a cromatina. Já para os controles não vacinados em relação aos vacinados, foram vistos 9 genes modulados negativamente e associados também a vias e funções direcionadas ao ribossomo e as histonas, mas adicionalmente aos processos metabólicos da glutatona, de drogas e da prostaglandina. Para os 2 genes superexpressos, têm-se em destaque a via de sinalização da interleucina-2 (IL-2) e a inflamação (Tabela 14).

Bibliotecas para indivíduos com a tuberculose ativa vacinados ou não com a BCG não foram encontradas. Desta forma, foi considerada a validação experimental de alguns genes encontrados pela metanálise do GEO nas comparações realizadas com este grupo de indivíduos por meio da PCR em tempo real.

Tabela 12 - Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos não vacinados pelas metanálises do GEO e do SRA. Genes em vermelho: modulação positiva e genes em azul: modulação negativa. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controles não infectados.

	Genes	Vias	Funções celulares e moleculares
C: ITBL vs CNI (GEO)	<i>LOC340113</i>	-	-
	55 Genes (Figura 10)	<ul style="list-style-type: none"> •Biossíntese de Tetrahydrobiopterina •Biossíntese de UDP-D-xilose e UDP-D-glucoronato 	<ul style="list-style-type: none"> •Sinalização e interação célula-célula •Transporte molecular •Bioquímica de pequenas moléculas •Metabolismo de carboidratos
C: ITBL vs CNI (SRA)	<i>GSTM1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo da Glutathione • Metabolismo da Aflatoxina B1 • Metabolismo do Estrógeno • Metabolismo de drogas 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo catabólico de xenobióticos • Processo metabólico derivado da Glutathione • Processo metabólico da Prostaglandina
	<i>IGLV2-8</i>	-	-

Fonte: Elaboração da autora

Tabela 13 - Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos vacinados pelas metanálises do GEO e do SRA. Genes em vermelho: modulação positiva e genes em azul: modulação negativa. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controles não infectados.

	Genes	Vias	Funções celulares e moleculares
C: ITBL vs CNI (GEO)	<i>HIPK1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Senescência celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Hemopoiese definitiva • Processo apoptótico de células epiteliais • Regulação da via de sinalização mediada pelo TNF • Via de sinalização apoptótica extrínseca • Regulação positiva da angiogênese
	<i>KIAA0100, OLFML3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Regulação da matriz extracelular mediante TGF-beta 	-
C: ITBL vs CNI (SRA)	<i>RAP1GAP, FADS2, EGFR, MT-TF, RPL13AP20</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Via de sinalização G alfa • Sinalização por EGFR • Sinalização Rap1 • Biossíntese de ácidos graxos insaturados • Metabolismo do ácido alfa-linolênico 	<ul style="list-style-type: none"> • Regulação positiva da atividade da proteína C quinase • Regulação da transdução de sinal mediada pelo óxido nítrico • Processo metabólico do ácido alfa-linolênico

Fonte: Elaboração da autora

Tabela 14 - Vias e funções associadas às moléculas moduladas no grupo dos não vacinados vs vacinados pela metanálise do SRA. Genes em vermelho: modulação positiva e genes em azul: modulação negativa. ITBL: Infecção tuberculosa latente, CNI: Controles não infectados.

	Genes	Vias	Funções celulares e moleculares
ITBL BCG- vs ITBL BCG+	<i>KDM5D</i> , <i>RPS4Y1</i> , <i>TXLNGY</i> , <i>EIFIAY</i> , <i>BCORP1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ribossomo • Transporte de RNA • Proteínas ribossomais citoplasmáticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Demetilação de histonas • Direcionamento de proteínas para ER • Remodelamento e organização da cromatina
CNI BCG- vs CNI BCG+	<i>KDM5D</i> , <i>RPS4Y1</i> , <i>TXLNGY</i> , <i>EIFIAY</i> , <i>BCORP1</i> , <i>DDX3Y</i> , <i>PRKY</i> , <i>USP9Y</i> , <i>GSTM1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo da Glutaciona • Metabolismo da Aflatoxina B1 • Metabolismo do estrógeno • Metabolismo de drogas • Ribossomo 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo catabólico de xenobióticos • Demetilação de histonas • Processo metabólico derivado da Glutaciona • Processo metabólico da Prostaglandina
	<i>TPST1</i> , <i>IGLV2-8</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Via de sinalização da Interleucina-2 	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfatação de proteínas • Processo metabólico de purinas • Resposta inflamatória

Fonte: Elaboração da autora

6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *RAB11A* EM INDIVÍDUOS COM A TUBERCULOSE ATIVA, VACINADOS OU NÃO COM A BCG

Durante a metanálise realizada a partir dos conjuntos de dados obtidos no GEO, foi observada a possível modulação de um gene da subfamília Rab11, o *RAB25*, que estaria suprimido em indivíduos com a TB ativa e vacinados com a BCG, quando comparados com aqueles não vacinados. Devido à elevada similaridade de seqüências presente entre os membros desta subfamília e importante papel em diferentes processos biológicos, toda a subfamília foi selecionada para validação experimental. Como mencionado anteriormente, seguiu-se apenas com a utilização de um gene desta subfamília nas avaliações seguintes, o *RAB11A*, visto que foi o único com expressão apontada em células sanguíneas.

Estavam disponíveis 3 amostras de pacientes com tuberculose ativa não vacinados e 6 amostras de pacientes com tuberculose ativa vacinados. Este número amostral foi insuficiente para atingir o poder amostral de 80% para a comparação entre os grupos. Apesar disso, foi observado um menor valor médio de expressão do gene *RAB11A* nas amostras de indivíduos com a TB ativa e vacinados em comparação com os não vacinados, o que era esperado considerando os achados da metanálise anterior (Figura 23).

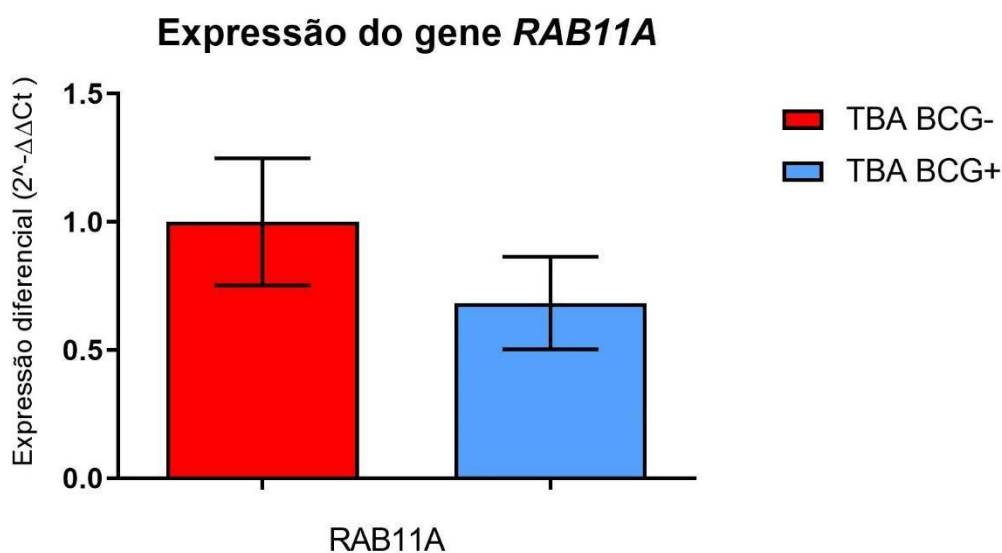


Figura 23 - Expressão diferencial do gene *RAB11A* em indivíduos com TBA BCG- vs TBA BCG+, normalizados pelo gene endógeno ACTB. TBA: Tuberculose ativa, BCG-: Não vacinado com a BCG, BCG+: Vacinado com a BCG.

Fonte: Elaboração da autora

6.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *RAB11A* APÓS INFECÇÃO DE CÉLULAS THP-1 COM MICOBACTÉRIAS

É sabido que a virulência da micobactéria pode impactar diretamente na sua sobrevivência no hospedeiro por meio do sucesso em desenvolver mecanismos que permitem a sua colonização, replicação e sobrevivência. Cepas com um nível mais alto de virulência possuem maior expressão de genes e proteínas que atuam diretamente na modulação da resposta do hospedeiro (LY; LIU, 2020; QIAN et al., 2020; SHARMA et al., 2022).

Com o intuito de avaliar uma possível correspondência entre a expressão do gene *RAB11A* e a potencial virulência das micobactérias, foi proposta a infecção de células THP-1 com cepas de micobactérias de virulência variada, conforme nível de virulência do maior para o menor (isolados clínicos, cepa laboratorial H37Rv, cepa vacinal BCG) para posterior avaliação por PCR em tempo real (Figura 24).

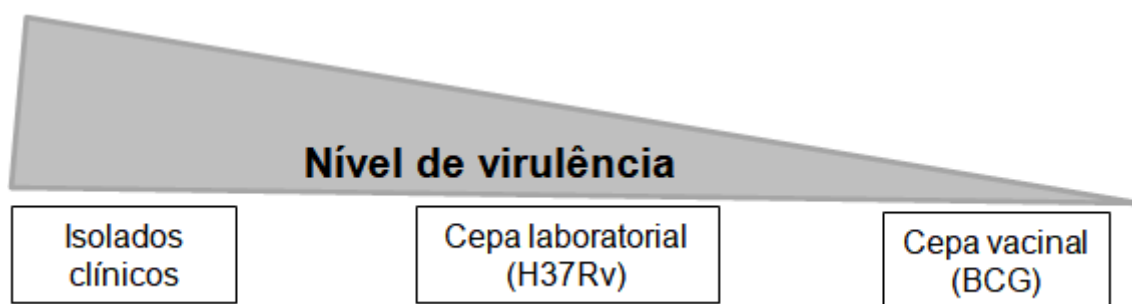


Figura 24 - Nível de virulência das cepas de micobactérias.

Fonte: Elaboração da autora

Culturas foram avaliadas em dois períodos de tempo (24h e 48h) e realizadas nas seguintes condições: controle composto por células não infectadas, células infectadas com BCG, células infectadas com H37Rv e células infectadas com cada um dos três isolados clínicos, 2 de alta prevalência (76937 e 120412) e 1 de baixa prevalência (80010). Para o isolado 80010, por problemas experimentais e impossibilidade de repetição dos experimentos, só foi possível avaliar culturas mantidas por 24h.

Observou-se valores de expressão do gene *RAB11A* menores nas células infectadas com a cepa vacinal BCG, principalmente no tempo de 24h, em comparação com as células não infectadas, corroborando com o que foi visto na metanálise do GEO. Referente às demais cepas, foi visto que os valores de expressão do *RAB11A* diferem de acordo com o tipo de cepa e com o tempo. A cepa H37Rv induziu valores de expressão menores em comparação com as células não infectadas, em culturas de 24h. Em culturas de 48h essa expressão foi restaurada

ao nível das células não infectadas. Em relação aos isolados clínicos, observou-se que as células infectadas tanto com o isolado de baixa prevalência 80010, como o de alta prevalência 76937 apresentaram valores de expressão do gene similares aos das células não infectadas no tempo de 24h. Porém, em 48h o isolado 76937 induziu redução dos valores de expressão do gene nas células, um fenômeno inverso ao observado com a cepa H37Rv. O segundo isolado de alta prevalência, 120412, induziu níveis de expressão do gene reduzidos tanto no tempo de 24h quanto no de 48h (Figura 25).

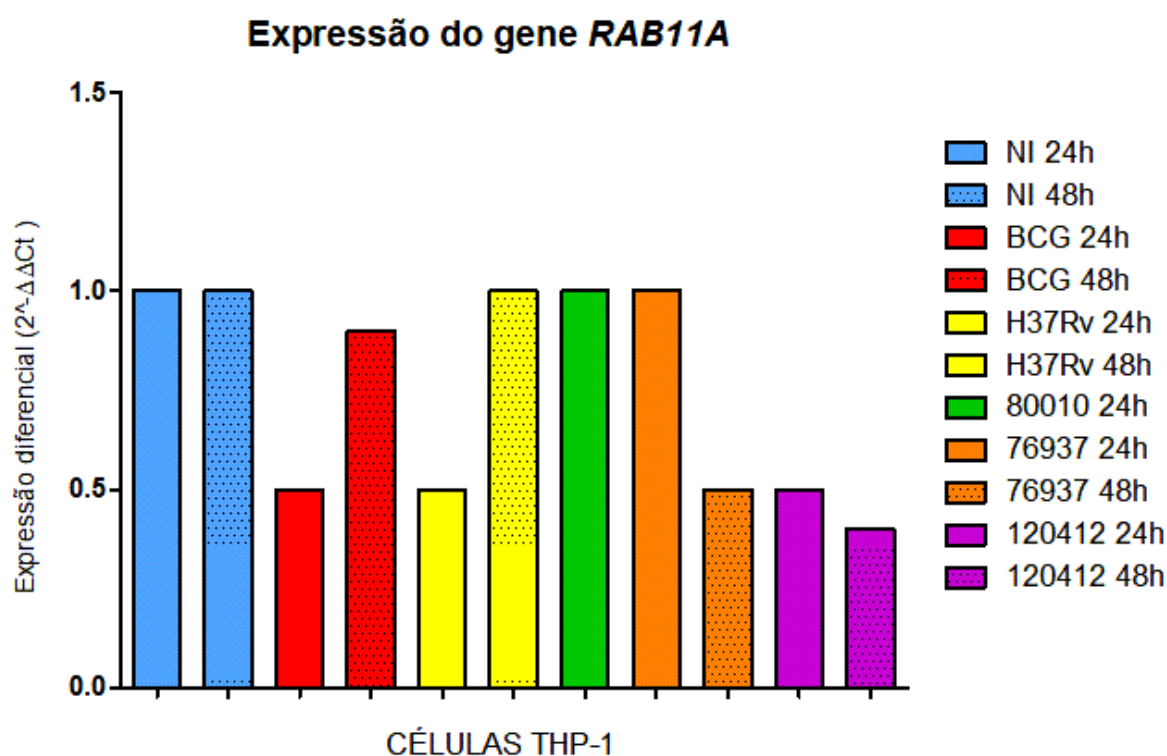


Figura 25 - Expressão diferencial do gene *RAB11A* em células THP-1 infectadas ou não com diferentes cepas de micobactérias nos tempos de 24h e 48h. NI: Não infectado.

Fonte: Elaboração da autora

A reprodutibilidade desses achados deverá ser avaliada no futuro, desde que haja disponibilidade de uso do laboratório NB3.

6.6 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DO *RAB11A* POR RNA DE INTERFERÊNCIA

O silenciamento gênico do *RAB11A* por RNA de interferência foi padronizado e avaliado *in vitro* utilizando células de linhagem THP-1. As células silenciadas com sucesso serão utilizadas futuramente para avaliar o impacto do gene em processos celulares

importantes na resposta contra o bacilo, especificamente a autofagia e a migração. Foram avaliadas culturas de células não infectadas versus infectadas com a cepa vacinal BCG sem utilização dos RNAs de interferência ou com os RNAs de interferência (controles negativo e positivo de silenciamento e o correspondente ao alvo de estudo, *RAB11A*). Observou-se que o silenciamento do gene-alvo ocorreu com sucesso, tanto nas células não infectadas como nas infectadas com BCG (Figuras 26).

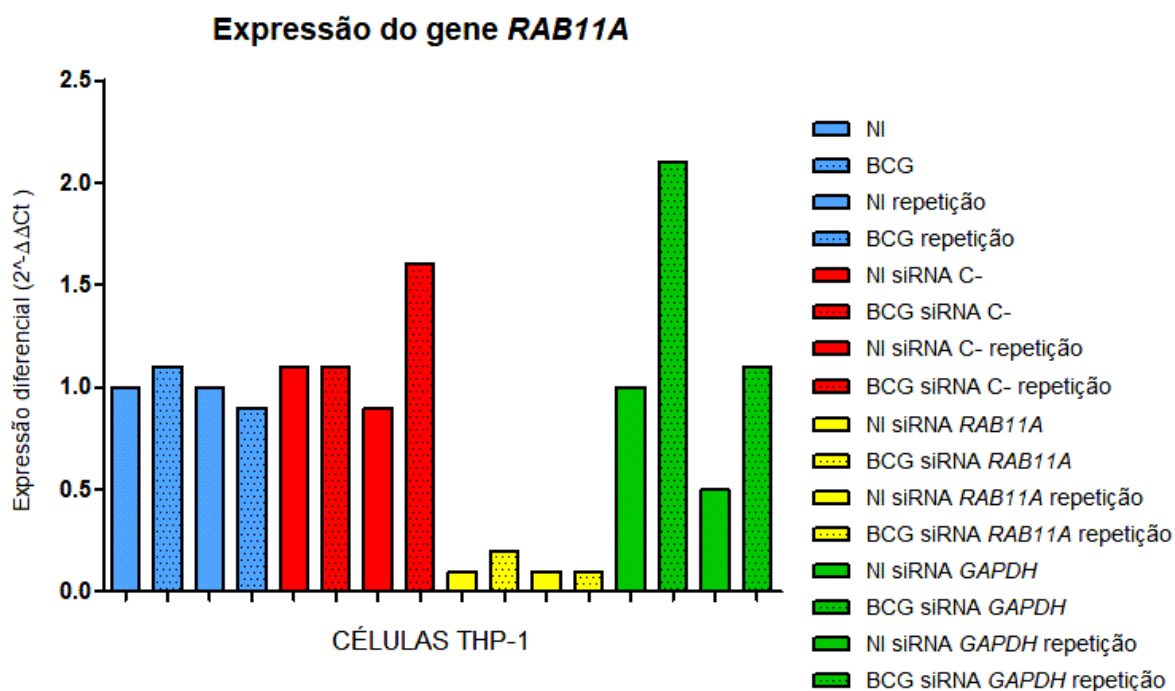


Figura 26 - Expressão diferencial do gene *RAB11A* após silenciamento gênico em células THP-1 infectadas ou não com a BCG. NI: Não infectado.

Fonte: Elaboração da autora

Com isso, futuramente poderá vir a ser utilizado o silenciamento com RNA de interferência para avaliar o possível impacto do *RAB11A* na infecção tuberculosa, com enfoque nos processos de autofagia e migração celular, havendo a disponibilidade de uso do laboratório NB3 da instituição para a realização dos experimentos.

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi proposto caracterizar os mecanismos potencialmente envolvidos na progressão da tuberculose que são modulados pela vacinação com BCG. Para isso, foi realizado um estudo amplo de avaliação gênica, e em consequência dos resultados obtidos, foi dado foco para o possível papel do gene *RAB11A*.

Foram observados padrões distintos de expressão gênica relacionados à vacinação com a BCG entre os grupos avaliados, através da metanálise realizada utilizando o GEO, com 100 genes diferencialmente expressos identificados em não vacinados, sendo 92 modulados negativamente e 8 modulados positivamente. Em contraste, apenas 53 genes foram identificados modulados em indivíduos vacinados, sendo 18 superexpressos e 35 subexpressos.

A eficácia da BCG contra a tuberculose pulmonar é altamente variável e a perda dessa eficácia tem sido explicada pelo avanço da idade do indivíduo e pelo aumento da exposição a micobactérias (FINE et al., 2001; BARRETO et al., 2005; DAVIDS et al., 2006; BARRETO et al., 2006; PEREIRA et al.; 2007; MANGTANI et al., 2014; POYNTZ et al., 2014; TRAUER et al.; 2021). Os resultados deste trabalho demonstram que a vacinação com a BCG é capaz de gerar efeitos a longo prazo, já que a média de idade dos indivíduos avaliados na metanálise do GEO foi de 64 anos (intervalo de 18-78 anos), e foi possível observar a modulação positiva e negativa de diferentes genes nos grupos avaliados. Quando há uma sensibilização anterior com a BCG, o número de genes alterados é efetivamente menor, levando conseqüentemente a uma diferença nos processos biológicos alterados que podem estar envolvidos na proteção conferida pela vacina, bem como no destino da infecção pelo *Mtb*.

Vias e funções celulares e moleculares apontadas no grupo dos não vacinados estavam associadas principalmente ao metabolismo, enquanto para o grupo dos vacinados destacaram-se os processos vinculados à imunidade.

Para os não vacinados, foram identificadas, por exemplo, vias ligadas a sinalização de eicosanóides e biossíntese de tetrahydrobiopterina enriquecidas para os genes suprimidos.

Na tuberculose, a via de sinalização por eicosanóides tem grande relevância, pois essas moléculas têm a capacidade de modular as respostas inflamatórias envolvidas na morte celular dos macrófagos infectados, e conseqüentemente influenciam no desfecho da doença (MARAKALALA et al., 2018). A tetrahydrobiopterina é um importante cofator para sistemas enzimáticos importantes, como a produção de óxido nítrico sintase e conseqüente liberação de

óxido nítrico e redução de superóxido, sendo essencial para manter o balanço entre essas moléculas (BENDALL et al., 2014; CRABTREE; CHANNON, 2011). O equilíbrio do estado óxido-redutor (REDOX) intracelular é essencial para a sobrevivência, persistência e reativação do bacilo (KUMAR et al., 2011). Na tuberculose, o óxido nítrico constitui um dos mecanismos utilizados pelas células com ação antimicrobiana (GUPTA et al., 2012; MARAKALALA et al., 2018).

Para vacinados, são vistos genes superexpressos associados principalmente a vias de sinalização de IFN- γ , e genes subexpressos com associação ao comprometimento da linhagem Th17.

Células com perfil de resposta Th1 (caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α) e Th17 (produção de IL-17 e IL-22) são consideradas essenciais na contenção do *Mtb*, sendo associadas diretamente com a proteção. O estado de equilíbrio entre estes dois perfis pode estar associado a modificações que podem implicar em um papel mais patogênico do que protetor da resposta tipo Th17. Células do tipo Th1 acabam sendo induzidas como forma de reverter os seus efeitos (LI et al., 2012; CANTINI et al., 2017; MOURIK et al., 2017).

Buscando validar os achados da metanálise do GEO, foi realizada uma metanálise secundária com um segundo banco de dados, o SRA. Nenhum gene diferencialmente expresso foi observado em comum nas duas metanálises, considerando os critérios do nível de significância (p -value $<0,05$) e fold-change (de log2, >1.5). No entanto, um gene conhecido como *TRH*, modulado negativamente na metanálise do GEO nos indivíduos com a infecção latente não vacinados vs controles não vacinados, também foi observado com valores de expressão reduzidos nesta mesma comparação na metanálise do SRA, embora não haja diferença significativa entre os grupos.

O *TRH* é um gene importante no controle da secreção do hormônio TSH (do inglês, thyroid-stimulating hormone), que por sua vez regula a secreção dos hormônios da tireóide, um importante eixo de regulação do metabolismo corporal (MOURA.; MOURA., 2004; GÁSPÁR et al., 2010).

Embora a metanálise do SRA não tenha sido capaz de validar os genes diferencialmente expressos encontrados na metanálise do GEO, ela também ajudou a revelar padrões associados à vacinação com a BCG. Dentre as assinaturas reveladas, foram observados 5 genes modulados negativamente nos infectados vacinados em comparação com os controles vacinados e 2 genes modulados (1 negativamente e 1 positivamente) nos indivíduos com a infecção latente não vacinados vs controles não vacinados.

Para os não vacinados, foi visto que o gene superexpresso está associado, por exemplo, com vias e funções ligadas ao metabolismo da glutatona.

A Glutatona consiste em um importante antioxidante que possui também papel essencial na regulação da imunidade, tanto inata como adaptativa, e na inflamação (GHEZZI, 2011).

Na tuberculose, estudos mostram que os níveis de glutatona estão reduzidos significativamente em pacientes com tuberculose ativa e que a suplementação com glutatona lipossomal restaura o equilíbrio redox, induz o balanço de citocinas e aumenta a resposta imune contra a infecção pelo *Mtb*. O tratamento com N-acetilcisteína (NAC), um precursor para a síntese de glutatona, também demonstrou efeitos micobactericidas diretos, com redução do crescimento intracelular do bacilo, diminuição de citocinas inflamatórias e aumento dos níveis de IFN- γ (VENKETARAMAN et al., 2006; VENKETARAMAN et al., 2008; LY et al., 2015).

Referente aos vacinados, observamos que os genes suprimidos se associam com vias e funções para a sinalização celular, a exemplo da sinalização pelo EGFR.

O EGFR consiste em uma importante molécula que medeia vias de sinalização que levam a desfechos biológicos importantes, como o crescimento e migração celular, produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como a sobrevivência celular (URIBE.; MARROCCO.; YARDEN., 2021).

As diferenças encontradas entre as metanálises podem ser decorrentes das diferentes abordagens metodológicas empregadas nos estudos (GEO: microarranjos; SRA: RNA-seq), as quais podem favorecer a detecção da expressão gênica de forma diferenciada entre as duas técnicas. A comparação entre perfis de expressão obtidos a partir de dados de microarranjo e aqueles obtidos a partir de RNA-seq mostra que os resultados deste último fornecem uma maior variedade de genes codificantes de proteínas diferencialmente expressos, e uma faixa de variações de níveis de expressão também maior, em comparação aos microarranjos (RAO et al., 2019). É possível, ainda, que haja diferenças entre as populações avaliadas (GEO: Reino Unido e África do Sul; SRA: Brasil).

A avaliação pela metanálise do GEO propiciou a identificação de um gene presente em uma subfamília conhecida como Rab11, que estava mais expresso em indivíduos com a TB ativa e não vacinados em comparação com vacinados. Esta subfamília tem influência direta em alguns processos biológicos relevantes na tuberculose, o que nos motivou a investigar melhor o possível papel dessas moléculas na doença.

Nas avaliações durante o estudo da subfamília Rab11, foi confirmada a ausência de expressão dos genes *RAB25* e *RAB11B* em células sanguíneas. Dessa forma, o estudo seguiu apenas com o gene *RAB11A*. Na coorte avaliada, foi identificado um maior valor numérico de expressão média desta molécula em amostras de indivíduos com a TB ativa e não vacinados com BCG em comparação aos indivíduos com TB ativa vacinados, porém a amostra não atingiu poder estatístico. Considerou-se, entretanto, que os resultados obtidos são compatíveis com os achados da metanálise do GEO.

É sabido que dentro dos macrófagos o bacilo é capaz de interagir com múltiplas proteínas Rab, e estas, por sua vez, estão envolvidas em diferentes processos, em especial o tráfego entre compartimentos dentro da célula, o que pode ter relevância na patogênese da doença. Após a infecção, o *Mtb* regula o tráfego e a integridade da membrana celular permitindo o recrutamento das GTPases RAB5 e RAB11 para o fagossoma e inibindo RAB7 e RAB20 (CHAI et al., 2020). O recrutamento de RAB5, mas não de RAB7, previne a maturação do fagolisossoma (CARRANZA.; CHAVEZ-GALAN., 2019). A via de reciclagem endocítica pelo RAB11 é apontada com papel importante na captação de ferro para as micobactérias (HALAAS et al., 2010). E a via de tráfego vesicular dependente de RAB20 promove o influxo de membrana dos fagossomos de *Mtb*, permitindo o seu deslocamento para compartimentos que restringem o crescimento do bacilo (SCHNETTGER, L et al., 2017).

Maior colocalização de RAB11A e micropartículas já foi observada com forte associação em modelo de macrófagos infectados com BCG em comparação com as células não infectadas. Esta interação seria importante para o transporte do bacilo dentro da célula após internalização pelos macrófagos, e consequente interação entre os componentes celulares (WALTERS et al., 2013). O acúmulo de RAB11 também já foi observado no fagossoma micobacteriano de macrófagos infectados com *Mtb* em comparação com células dendríticas infectadas (TAILLEUX et al., 2003).

Também foi avaliado a expressão deste gene em células THP-1 após infecção com cepas de micobactérias com virulência variada, buscando entender se a expressão seria proporcional à virulência da cepa.

Atualmente, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) divide-se em 7 linhagens amplamente adaptadas aos humanos, que diferem quanto a sua distribuição por região demográfica (COMAS et al., 2013; COSCOLLA.; GAGNEUX., 2014). As linhagens de *Mtb* também se diferenciam em relação a sua virulência, bem como quanto à capacidade de levar à progressão para a doença ativa no hospedeiro, de promover doença grave e de desenvolver resistência a antibióticos (YIMER et al., 2015; RUTAIHWA et al., 2019).

Foi observado que as células infectadas com BCG, a micobactéria de menor virulência utilizada em nosso experimento, induziram baixa expressão de *RAB11A* em comparação com as células não infectadas, corroborando também com o achado obtido no GEO. Em relação à cepa laboratorial H37Rv, aqui considerada com virulência intermediária, foi observado que as culturas infectadas após 24h também apresentaram valores de expressão menores do *RAB11A* em comparação com as células não infectadas. Um comportamento semelhante foi obtido com isolados clínicos de alta prevalência em nosso meio (76937 no tempo de 48h e 120412 nos tempos de 24 e 48h) da mesma subfamília da cepa laboratorial (LAM), aqui considerados como de mais alta virulência. Em contrapartida, células infectadas com o isolado de baixa prevalência 80010, também da subfamília LAM e considerado de virulência intermediária, após 24h mantiveram os valores de expressão do gene iguais aos das células não infectadas. Para as células infectadas com H37Rv em culturas após 48h e para as culturas infectadas com o isolado de alta prevalência 76937 após 24h foi obtido esse mesmo resultado. Esses achados precisam ser validados em novo experimento e interpretados à luz dos resultados que forem obtidos após o silenciamento do gene *RAB11A*, em nossa perspectiva de continuidade deste trabalho.

Em um estudo anterior utilizando modelo de infecção in vivo, isolados de *Mtb* com diferente capacidade de transmissão na comunidade foram testados e pôde-se constatar diferença na capacidade de causar dano pulmonar e de desencadear uma resposta imunológica no hospedeiro de acordo com o tipo de isolado avaliado (SHANLEY et al., 2018). Cepas sem transmissão registrada na comunidade originaram danos pulmonares mais extensos e mais inflamação do que aquelas com alta transmissão, que em contrapartida levavam a uma resposta mais imunogênica do hospedeiro com desenvolvimento de uma resposta protetora maior e mais rápida das células T. Por outro lado, as cepas sem transmissão registrada levaram ainda ao aumento, de três vezes mais, do número de genes diferencialmente expressos (tanto subexpressos como superexpressos) nos pulmões do hospedeiro em comparação com as cepas de transmissão muito alta (SHANLEY et al., 2018).

Pretendendo estudar melhor o papel de *RAB11A*, o silenciamento do gene foi realizado com sucesso em células THP-1, utilizando RNA de interferência. Dessa forma, foi estabelecido em nosso grupo um modelo in vitro com utilidade para explorar a função de *RAB11A* na tuberculose, em experimentos futuros.

Até o momento, esse estudo ajudou a revelar padrões de expressão importantes associados à vacinação com a BCG, com possíveis implicações no curso da infecção pelo *Mtb* por meio da modulação positiva e negativa de diferentes genes diretamente implicados com

processos biológicos que podem ser essenciais na resposta do indivíduo frente à infecção. Além disso, foi possível identificar um alvo que deve ser melhor investigado na doença, o *RAB11A*. Estes resultados abrem novas perspectivas de investigação dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da tuberculose e geração de estratégias futuras para combate da doença.

8 CONCLUSÕES/PERSPECTIVAS

- A primovacinação com a BCG é capaz de gerar efeitos que afetam a modulação de genes específicos do hospedeiro.
- A expressão do gene *RAB11A* foi maior no grupo dos indivíduos com TB ativa não vacinados em comparação àqueles vacinados, corroborando com um dos achados obtidos na metanálise realizada no GEO.
- A expressão do gene *RAB11A* foi menor nas células THP-1 infectadas com a cepa vacinal BCG em comparação com as células não infectadas, corroborando também com um dos achados obtidos na metanálise realizada no GEO.
- A expressão do gene *RAB11A* difere de acordo com o tipo de isolado de *Mtb* utilizado na infecção de células THP-1.
- RNA de interferência é uma metodologia adequada para silenciamento gênico do *RAB11A* em células THP-1, possibilitando a utilização desse modelo celular na avaliação de processos ligados a este gene e com possível implicação na tuberculose.
- Perspectivas de continuidade do estudo incluem a reprodução do experimento de infecção das células THP-1 com as diferentes cepas de micobactérias e a avaliação de processos biológicos (autofagia e migração celular) associados ao *RAB11A* após silenciamento do gene.

REFERÊNCIAS

- ADESANYA, O. A.; UCHE-ORJI, C. I.; ADEDEJI, Y. A.; et al. Bacillus Calmette-Guerin (BCG): the adroit vaccine. **AIMS Microbiology**, v. 7, n.1m p. 96-113, 2021.
- AHMED, D.; RAQIB, R.; GUOMUNDSSON, G. H.; et al. Host-Directed Therapy as a Novel Treatment Strategy to Overcome Tuberculosis: Targeting Immune Modulation. **Antibiotics**, v. 9, 2020.
- ANDERSSON, H. et al. Apoptotic Neutrophils Augment the Inflammatory Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Human Macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- ANDRADE, B. B.; SINGH, A.; NARENDRAN, G., et al. Mycobacterial antigen driven activation of CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes is a predictor of tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.
- ARAÚJO-PIRES, A. C.; FRANCISCONI, C. F.; BIGUETTI, C. C.; et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 4, p. 336-46, 2014.
- ARTS, R. J. W.; MOORLAG, S. J. C. F. M.; NOVAKOVIC, B.; et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 23, p. 89-100, 2018.
- BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de pediatria**, v. 82, n. 3 Suppl, p. S45–S54, 2006.
- BARRETO, M. L.; CUNHA, S. S.; PEREIRA S. M.; et al. Neonatal BCG protection against tuberculosis lasts for 20 years in Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 10, p. 1171–1173, 2005.
- BARRY, C. E.; BOSHOFF, H. I.; DARTOIS, V; et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, 2009.
- BENDALL, J. K. et al. Tetrahydrobiopterin in Cardiovascular Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 18, p. 3040–77, 2014.
- BENTO, C. F.; EMPADINHAS, N.; MENDES, V. Autophagy in the Fight Against Tuberculosis. **DNA and cell biology**, v. 34, n. 4, p. 228-242, 2015.
- BERRY, M. P. R.; GRAHAM, C. M.; MCNAB, F. W.; et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 973–977, 2010.
- BHUIN, T.; ROY, J. K. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. **Experimental Cell Research**, v. 328, p. 1-19, 2014.
- BHUIN, T.; ROY, J. K. Rab11 in disease progression. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 4, n. 1, 2015.

- BITENCOURT, J.; SARNO, A.; OLIVEIRA, C.; et al. Comparing cytokine production and clinical response following vaccination with BCG Moreau and BCG Russia strains in a Brazilian infant population. **Vaccine**, v. 39, p. 3189-3196, 2021.
- BOWDISH, D. **Maintenance & Culture of THP-1 Cells**, 2011. Disponível em: <<http://www.bowdish.ca/lab/wp-content/uploads/2011/07/THP-1-propagation-culture.pdf>>. Acesso em: 20 de out. de 2019.
- BRADFUTE, S. B.; CASTILLO, E. F.; ARKO-MENSAH, J.; et al. Autophagy as an immune effector against tuberculosis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p.355-365, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. **Ministério da Saúde**, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Biocontenção: o gerenciamento do risco em ambientes de alta contenção biológica NB3 e NBA3. **Ministério da Saúde**, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**, volume único, 3. ed., 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Tuberculose 2020. **Ministério da Saúde**, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Tuberculose 2021. **Ministério da Saúde**, 2021.
- BUFFEN, K.; OOSTING, M.; QUINTIN, J.; et al. Autophagy Controls BCG-Induced Trained Immunity and the Response to Intravesical BCG Therapy for Bladder Cancer. **PLoS Pathogens**, v. 10, n.10, 2014.
- BUSSI, C.; GUTIERREZ, M. G. *Mycobacterium tuberculosis* infection of hosts cells in space and time. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, p.341-361, 2019.
- CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29–35, 2006.
- CANTINI, F.; NANNINI, C.; NICCOLI, L.; et al. Risk of Tuberculosis Reactivation in Patients with Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Receiving Non-Anti-TNF-Targeted Biologics. **Mediators of Inflammation**, 2017.
- CARRANZA, C.; CHAVEZ-GALAN, L. Several Routes to the Same Destination: Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion by *Mycobacterium tuberculosis*. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 357, n. 3, 2019.
- CARDONA, P-J. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n.1, p.38-46, 2018.
- CDC. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know, **Centers for Disease Control and Prevention**, 7ª edição, 2021.

- CÉSARE, N.; MOTA, T. F.; LOPES, F. F. L.; et al. Longitudinal profiling of the vaccination coverage in Brazil reveals a recent change in the patterns hallmarked by differential reduction across regions. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 98, p. 275-280, 2020.
- CHAI, Q.; WANG, L.; LIU, C. H.; GE, B. New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, p. 901-913, 2020.
- CHUNG, Y-C.; WEI, W-C.; HUNG, C-N.; et al. Rab11 collaborates E-cadherin to promote collective cell migration and indicates a poor prognosis in colorectal carcinoma. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 46, n.12, p. 1002-1011, 2016.
- COFFMAN, R. L. Origins of the TH1-TH2 model: a personal perspective. **Nature Immunology**, v. 7, n.6, 2006.
- COLE, S. T.; BROSCHE, J.; PARKHILL, T.; et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.
- COMAS, I.; COSCOLLA, M.; LUO, T., et al. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1176-1182, 2013.
- COMAS, I.; GAGNEUX, S. The past and future of tuberculosis research. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. 1–7, 2009.
- COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Seminars in Immunology**, v. 26, p. 431-444, 2014.
- COVIÁN, C.; FERNÁNDEZ-FIERRO, A.; RETAMAL-DIAZ, A.; et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, v.10, 2019.
- COVIÁN, C.; RETAMAL-DIAZ, A.; BUENO, S. M.; KALERGIS, A. M. Could BCG Vaccination Induce Protective Trained Immunity for SARS-CoV-2?. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.
- CRABTREE, M. J.; CHANNON, K. M. Nitric Oxide Synthesis and Recycling of Tetrahydrobiopterin in Endothelial Function and Vascular Disease. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 81–88, 2011
- CUDAHY, P.; SHENOI, S. Diagnostics for pulmonary tuberculosis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1086, p. 187-193, 2016.
- DALLENKA, T.; REPNIK, U.; CORLEIS, B.; et al. M. tuberculosis-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 4, p. 519-530, 2017.
- DARA, Y.; VOLCANI, D.; SHAH, K.; SHIN, K.; VENKETARAMAN, V. Potentials of Host-Directed Therapies in Tuberculosis Management. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, 2019.
- DAVIDS, V.; HANEKOM, W. A.; MANSOOR, N.; et al. The Effect of BacilleCalmette-Guérin Vaccine Strain and Route of Administration on Induced Immune

Responses in Vaccinated Infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 4, p. 531–536, 2006.

DE ARAÚJO, L. S.; VAAS, L. A. I.; RIBEIRO-ALVES, M.; et al. Transcriptomic Biomarkers for Tuberculosis: Evaluation of *DOCK9*, *EPHA4*, and *NPC2* mRNA Expression in Peripheral Blood. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016.

DE ARMENTIA, M. M. L., AMAYA, C., COLOMBO, M. I. Rab GTPases and the Autophagy Pathway: Bacterial Targets for a Suitable Biogenesis and Trafficking of Their Own Vacuoles. **Cells**, v. 5, n. 11, 2016.

DENG, M.; XIAO-DONG, L.; FANG, Z-X.; et al. The blood transcriptional signature for active and latent tuberculosis. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 321-328, 2019.

DUBNAU, E.; FONTAN, P.; MANGANELLI, R.; SOARES-APPEL, S.; SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2787–95, 2002.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v.12, 2012.

ETNA, M. P.; GIACOMINI, E.; SEVERA, M.; et al. A human dendritic cell-based in vitro model to assess *Mycobacterium tuberculosis* SO2 vaccine. **Altex**, v. 31, n. 4, p. 397–406, 2014.

FERRO, E.; BOSIA, C.; CAMPA, C. C. RAB11-Mediated Trafficking and Human Cancers: An Updated Review. **Biology**, v. 10, n. 26, 2021.

FINE, P. E. M.; FLOYD, S.; STANFORD, J. L.; et al. Environmental micobactéria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy. **Epidemiology & Infection**, v. 126, p. 379-387, 2001.

FLETCHER, H. A.; DOCKRELL, H. M. Human biomarkers: can they help us to develop a new tuberculosis vaccine? **Future Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 781-787, 2016.

FORRELLAD, M. A.; KLEPP, L. I.; GIOFFRÉ, A.; et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v.4, n. 1, p.3-66, 2013.

GÁSPÁR, E.; HARDENBICKER, C.; BODÓ, E.; et al. Thyrotropin releasing hormone (TRH): a new player in human hair-growth control. **The FASEB Journal**, v. 24, 2010.

GHEZZI, P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. **International Journal of General Medicine**, v. 4, p. 105-113, 2011.

GONG, W.; WU, X. Differential Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection and Active Tuberculosis: A Key to a Successful Tuberculosis Control Strategy. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

GUPTA, A.; KAUL, A.; TSOLAKI, A. G.; et al. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. **Immunobiology**, v. 217, p. 363-374, 2012.

HAAS, C. T.; ROE, J. K.; POLLARA, G.; MEHTA, M.; NOURSADEGHI, M. Diagnostic “omics” for active tuberculosis. **BMC Medicine**, v. 14, n. 37, p. 1-19, 2016.

- HALAAS, O.; STEIGEDAL, M.; HAUG, M.; et al. Intracellular *Mycobacterium avium* intersect transferrin in the Rab11(+) recycling endocytic pathway and avoid lipocalin 2 trafficking to the lysosomal pathway. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 5, p. 783-792, 2010.
- JAGATIA, H.; TSOLAKI, A. G. The Role of Complement System and the Immune Response to Tuberculosis Infection. **Medicina**, v. 57, n. 84, 2021.
- KAUFMANN, S. H.; DORHOI, A. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances, and interventions. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, p. 441-449, 2013.
- KELLY, E. E.; HORGAN, C. P.; GOUD, B.; MCCAFFREY, M. W. RabGTPases and their interacting proteins in health and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, 2012.
- KUBLER, A.; LUNA, B.; LARSSON, C.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* dysregulates MMP/TIMP balance to drive rapid cavitation and unrestrained bacterial proliferation. **The Journal of Pathology**, v. 235, n. 3, p.431-444, 2015.
- KUMAR, A. P.; LUKMAN, S. Allosteric binding sites in Rab11 for potential drug candidates. **PLoS ONE**, 2018.
- KOWALEWICZ-KULBAT, M.; LOCHT, C. BCG and protection against inflammatory and auto-immune diseases. **Expert Review of Vaccines**, 2017.
- KUMAR, A. et al. Redox Homeostasis in Mycobacteria: the Key to Tuberculosis Control? **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. 39, 2011.
- LEE, S.-W.; WU, L. S.-H.; HUANG, G.-M.; et al. Gene expression profiling identifies candidate biomarkers for active and latent tuberculosis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 3, 2016.
- LI, Q.; LI, J.; TIAN, J.; et al. IL-17 and IFN- γ production in peripheral blood following BCG vaccination and *Mycobacterium tuberculosis* infection in human. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, p.2029-2036, 2012.
- LI, J.; LAGMAN, M.; SAING, T., et al. Liposomal Glutathione Supplementation Restores Th1 Cytokine Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in HIV-Infected Individuals. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 11, 2015.
- LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. **The Journal of Immunology**, v.185, n.1, p.15-22, 2010.
- LIU, Y.; TAO, X.; JIA, L.; et al. Knockdown of RAB25 promotes autophagy and inhibits cell growth in ovarian cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 5, p. 1006–1012, 2012.
- LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão Gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR. **Embrapa**, 2014. (Publicação do tipo folheto).
- LU, C.; WU, J.; WANG, H.; et al. Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–10, 2011.

LY, A.; LIU, J. Mycobacterial Virulence Factors: Surface-Exposed Lipids and Secreted Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3985, 2020.

MANGTANI, P.; ABUBAKAR, I.; ARITI, C.; et al. Protection by BCG Vaccine Against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 4, p. 470-80, 2014.

MAPHASA, R. E.; MEYER, M.; DUBE, A. The Macrophage Response to Mycobacterium tuberculosis and Opportunities for Autophagy Inducing Nanomedicines for Tuberculosis Therapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2021

MARAKALALA, M. J.; MARTINEZ, F. O.; PLÜDDEMANN, A.; GORDON, S. Macrophage Heterogeneity in the Immunopathogenesis of Tuberculosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

MIHRET, A.; LOXTON, A. G.; BEKELE, Y.; et al. Combination of gene expression patterns in whole blood discriminate between tuberculosis infection states. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 257, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores prioritários para o monitoramento do plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública no Brasil. **Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, v. 48, n.8, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. **SIPNI - Sistema de Informações do Programa Nacional de Imunizações**. Cobertura Vacinal da BCG no Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?bd_pni/cpnibr.def>. Acesso em: 21 de set. de 2022.

MOTA, S. T. M. **Padrões de expressão gênica em indivíduos com tuberculose ativa e infecção latente, vacinados ou não com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25930>>.

MOURA, E. G; MOURA, C. C. P. Regulação da Síntese e Secreção de Tireotrofina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 1, 2004.

MOURITS, V. P.; KOEKEN, V. A. C. M.; BREE, L. C. J.; et al. BCG-Induced Trained Immunity in Healthy Individuals: The Effect of Plasma Muramyl Dipeptide Concentrations. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, 2020.

MOURIK, B. C.; LUBBERTS, E.; STEENWINKEL, J. E. M.; et al. Interactions between Type 1 Interferons and the Th17 Response in Tuberculosis: Lessons Learned from Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

NARASIMHAN, P.; WOOD, J.; MACINTYRE, C. R.; MATHAI, D. Risk Factors for Tuberculosis. **Pulmonary Medicine**, v. 2013, 2013.

NEMES, E.; GELDENHUYS, H.; ROZOT, V.; et al. Prevention of *M. tuberculosis* Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, p. 138-149, 2018.

- NUNES-ALVES, C.; BOOTY, M. G.; CARPENTER, S. M.; et al. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014.
- PAI, M.; BEHR, M. A.; DOWDY, D.; et al. Tuberculosis. **Nature Reviews**, v. 2, 2016.
- PALOMINO, J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **European Respiratory Journal**, v.26, n. 2, p. 339-350, 2005.
- PEREIRA, S. M. et al. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, 2007.
- PETERS, W.; ERNST, J. D. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 151-158, 2003.
- PETRUCCIOLI, E.; SCRIBA, T. J.; PETRONE, L.; et al. Correlates of tuberculosis risk: predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 48, p. 1751-1763, 2016.
- POYNTZ, H. C.; STYLIANOU, E.; GRIFFITHS, K. L.; et al. non-tuberculous micobactéria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 94, p. 226-237, 2014.
- QIAN, J.; CHEN, R.; WANG, H.; ZHANG, X. Role of the PE/PPE Family in Host-Pathogen Interactions and Prospects for Anti-Tuberculosis Vaccine and Diagnostic Tool Design. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.
- RAO, M. S.; VAN VLEET, T. R.; CIURLIONIS, R.; et al. Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the Toxicogenomic Evaluation of Liver From Short-Term Rat Toxicity Studies. **Frontiers in Genetics**, v.9, 2019.
- RUTAIHWA, L. K.; MENARDO, F.; STUCKI, D., et al. Multiple Introductions of *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 2-Beijing Into Africa Over Centuries. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, 2019.
- RYU, Y. J. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v.78, p. 64-71, 2015.
- SABIR, N.; HUSSAIN, T.; SHAH, S. Z. A.; et al. miRNAs in Tuberculosis: New Avenues for Diagnosis and Host-Directed Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- SAMPATH, P.; PERIYASAMY, K. M.; RANGANATHAN, U. D.; BETHUNAICKAN, R. Monocyte and Macrophage Mirna: Potent Biomarker and Target for Host-Directed Therapy for Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.
- SCHAIBLE, U. E.; LINNEMANN, L.; REDINGER, N.; et al. Strategies to Improve Vaccine Efficacy against Tuberculosis by Targeting Innate Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- SCHNETTGER, L.; RODGERS, A.; REPNIK, U.; et al. A Rab20-Dependent Membrane Trafficking Pathway Controls *M.tuberculosis* Replication by Regulating Phagosome Spaciousness and Integrity. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 5, p. 619-628, 2017.

SHANLEY, C. A.; HENAO-TAMAYO, M. I.; BIPIN, C., et al. Biology of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* with varying levels of transmission. **Tuberculosis**, v. 109, p. 123-133, 2018.

SHARMA, T.; ALAM, A.; EHTRAM, A.; et al. The Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS Protein Family Acts as an Immunological Decoy to Subvert Host Immune Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 525, 2022.

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

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463-466, 2011.

TAILLEUX, L.; NEYROLLES, O.; HONORÉ-BOUAKLINE, S.; et al. Constrained Intracellular Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Human Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 1939-1948, 2003.

THE WORLD BANK. **Brasil**. Disponível em: <<https://data.worldbank.org/country/brazil?locale=pt>>. Acesso em: 21 de set. de 2022.

THOMPSON, D. B.; SIREF, L. E.; FELONEY, M. P.; et al. Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 11, n. 2, p. 265-279, 2015.

TRAUER, J. M.; KAWAI, A.; COUSSENS, A. K.; et al. Timing of *Mycobacterium tuberculosis* exposure explains variation in BCG effectiveness: a systematic review and meta-analysis. **Thorax**, v. 76, p. 1131-1141, 2021.

URIBE, M. L.; MARROCCO, I.; YARDEN, Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. **Cancers**, v. 13, 2021.

UTHAYAKUMAR, D.; PARIS, S.; CHAPAT, L.; et al. Non-specific Effects of Vaccines Illustrated Through the BCG Example: From Observations to Demonstrations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

VENKETARAMAN, V.; MILLMAN, A.; SALMAN, M., et al. Glutathione levels and immune responses in tuberculosis patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, p. 255-261, 2008.

VENKETARAMAN, V.; RODGERS, T.; LINARES, R., et al. Glutathione and growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy and HIV infected subjects. **AIDS Research and Therapy**, v. 3, n. 5, 2006.

VERRALL, A. J.; ALISJAHBANA, B.; APRIANI, L.; et al. Early Clearance of *Mycobacterium tuberculosis*: The INFECT Case Contact Cohort Study in Indonesia. **The Journal of Infectious Diseases**, 2020.

WALTERS, S. B.; KIECKBUSCH, J.; NAGALINGAM, G.; et al. Microparticles from Mycobacteria-Infected Macrophages Promote Inflammation and Cellular Migration. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 669-677, 2013.

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

WANG, J.; ZHOU, P.; WANG, X.; et al. Rab25 promotes erlotinib resistance by activating the β 1 integrin/AKT/ β -catenin pathway in NSCLC. **Cell Proliferation**, 2019.

WHO. International Programme on Chemical Safety. **Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation**. 2001. Retrieved from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>. Access in: 03.09.2020.

WHO. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 155. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles**, World Health Organization, Geneva, 1993.

WHO. Brazil: WHO and UNICEF estimates of immunization coverage: 2016 revision. **World Health Organization**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/bra.pdf>. Acesso em: 31 de out. de 2017.

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

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. WHO Report. Geneva, Switzerland, 2020.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. WHO Report. Geneva, Switzerland, 2021.

WHO. World Health Organization. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death#:~:text=The%20top%20global%20causes%20of,birth%20asphyxia%20and%20birth%20trauma%2C>>. Acesso em: 23 de mar.o de 2021.

WU, X.; ZHANG, J.; MA, C.; et al. A role for Wnt / β -catenin signalling in suppressing Bacillus Calmette-Guerin-induced macrophage autophagy, **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 277-287, 2019.

YIMER, S. A.; NORHEIM, G.; NAMOUCHI, A., et al. *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 7 Strains Are Associated with Prolonged Patient Delay in Seeking Treatment for Pulmonary Tuberculosis in Amhara Region, Ethiopia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, 2015.

YOUNG, D.; STARK, J.; KIRSCHNER, D. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 520–528, 2008.

ZAK, D. E.; PENN-NICHOLSON, A.; SCRIBA, T. J.; et al. A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 387, p. 2312-2322, 2016.

ZHAI, W.; WU, F.; ZHANG, Y.; et al. The Immune Escape Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 340, 2019.

ZHANG, X.; CHEN, D.; YANG, W.; WU, J. Identifying candidate diagnostic markers for tuberculosis: A critical role of co-expression and pathway analysis. **Mathematical Biosciences and Engineering**, v. 16, n. 2, p. 541-552, 2019.

ZHENG, Y.-Q.; NAGUIB, Y. W.; DONG, Y.; et al. Applications of bacillus Calmette-Guerin and recombinant bacillus Calmette-Guerin in vaccine development and tumor immunotherapy. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 9, p. 1255-1275, 2015.

Apêndice A - Artigo produzido no período do doutorado

NOTA TÉCNICA

SEQUÊNCIA DIDÁTICA PARA ENSINO DE MEIO AMBIENTE E SAÚDE: O PETRÓLEO COMO OBJETO DE ESTUDO NO ENSINO BÁSICO

DIDACTICS SEQUENCE FOR TEACH OF ENVIRONMENTAL AND HEALTH:
PETROLEUM LIKE OBJECT OF STUDY IN BASIC EDUCATION

Talita Andrade da Anunciação¹

Gabriele Louise Soares Martins^{1,2}

Leile Camila Jacob Nascimento¹

Melina Mosquera Navarro Borba¹

Maria Carolina Santos de Souza¹

Scarlet Torres Moraes Mota³

E-mail: scarlettorres@hotmail.com

1-Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PGBSMI). Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz Bahia.

2-Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael – Bahia.

3-Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana (PGPAT). Faculdade de Medicina da Bahia (FAMED). Universidade Federal da Bahia (UFBA) em Ampla Associação com a Fiocruz Bahia.

v. 10 (2020): Edição especial de Metodologias Ativas no ensino de saúde e ciências

SUMÁRIO

