

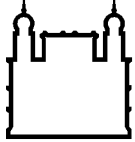
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E
MACRÓFAGOS HUMANOS ESTIMULADAS COM A VACINA BCG MOREAU**

MATHEUS ROGÉRIO ALMEIDA

Rio de Janeiro
Agosto de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Matheus Rogério Almeida

Modulação da resposta *in vitro* de células dendríticas e macrófagos humanos estimuladas com a vacina BCG Moreau.

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

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas

Coorientador (a): Prof. Dra. Rhana Berto da Silva Prata

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2022

Almeida, Matheus Rogério .

Modulação da resposta in vitro de células dendríticas e macrófagos humanos estimuladas com a vacina BCG Moreau. / Matheus Rogério Almeida.

- Rio de Janeiro, 2022.

102 f.; il.

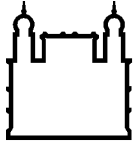
Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

Orientador: Paulo Renato Zuquim Antas.

Co-orientadora: Rhana Berto da Silva Prata. Bibliografia: f.

83-100

1. Vacina BCG. 2. Tuberculose. 3. Células Dendríticas. 4. Macrófagos. 5. Linfócitos T. I.
Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: MATHEUS ROGÉRIO ALMEIDA

Modulação da resposta *in vitro* de células dendríticas e macrófagos humanos estimuladas com a vacina BCG Moreau.

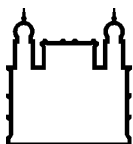
ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Renato Zuquim Antas
Coorientador (a): Prof. Dra. Rhana Berto da Silva Prata

Aprovada em: 24/08/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino – Presidente (IOC-FIOCRUZ)
Prof. Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis (UFG)
Prof. Dr. Paula Mello de Luca (IOC-FIOCRUZ)
Prof. Dr. Luzia Maria de Oliveira Pinto (IOC-FIOCRUZ)
Prof. Dr. Cristiana Santos de Macedo (CDTS-FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 24 de agosto de 2022.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ


Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Medicina Tropical de **Matheus Rogério Almeida**, sob orientação do Dr. Paulo Renato Zuquim Antas e coorientado pela Dr^a. Rhana Berto da Silva Prata. Ao vigésimo quarto dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **“Modulação da resposta *in vitro* de células dendríticas e macrófagos humanos estimuladas com a vacina BCG Moreau”**, no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Dinâmica de Transmissão de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Paulo Renato Rivas Totino - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis - UFG/GO e como suplentes: Dr^a. Cristiana Santos de Macedo- CDTS/FIOCRUZ e Dr^a. Paula Mello de Luca – IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 24 de agosto de 2022.


Dr. Paulo Renato Rivas Totino (Presidente da Banca):


Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Membro da Banca):


Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis (Membro da Banca):


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

Dedico este manuscrito a Deus, a minha família, amigos e minha namorada, por estarem sempre ao meu lado, independente das adversidades.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente às forças do universo que puderam propiciar a chegada deste momento ímpar de minha vida, diante de tantas adversidades postas a jogo, e que me fazem seguir e enfrentar os percalços que a vida vem a trazer.

Aos meus orientadores, Dr. Paulo Antas e Dra. Rhana Prata, por sempre estarem disponíveis nesse momento tão desafiador e único, me passando serenidade, paz e muito aprendizado. Vocês são peças fundamentais no meu crescimento como pesquisador. Obrigado por todos os ensinamentos de vida, assim como acadêmicos, passados a mim durante este período.

Aos amigos de Laboratório de Imunologia Clínica (LIC), Andreon e Sandra, que puderam dividir comigo as alegrias e tristezas, conquistas e percalços, durante esse período de mestrado em meio a uma pandemia. Esses dois sempre me ajudando não importando a dia, lugar ou hora. Aos demais amigos do LIC por sempre contribuírem para minha jornada profissional e pessoal, assim como todos os bons momentos compartilhados.

À Dra. Roberta Olmo e aos demais membros do Laboratório de Hanseníase, por me acolherem em seu laboratório durante este período pandêmico. Sendo sempre prestativos, companheiros e solícitos.

À Mestre Maria Ester Tônus e sua equipe, destacando a Eliana, do INCQS, pelas colaborações para realização da técnica de cultivo da vacina BCG.

A minha família, pai, mãe, irmão, vó e primo por serem presentes e sempre me apoiarem, não importando o momento. Sempre me motivando a seguir meus sonhos e não desistir diante de complicações, foram e são peças fundamentais para minha formação dentro e fora da academia.

A minha namorada, Millena, por tamanho companheirismo durante esse período. Sempre me motivando e estando ao meu lado não importando a situação. Obrigado por toda atenção, compreensão e carinho.

Aos meus amigos queridos, Gabriel, Bia, João, Pedro e Catarina por sempre estarem disponíveis quando eu precisei. Obrigado por todos os momentos compartilhados, pela cumplicidade e carinho.

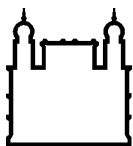
Aos membros da banca, por gentilmente aceitarem o convite para participarem desta banca de mestrado.

Ao IOC, em destaque o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, por todo o suporte aos alunos durante esse período pandêmico, que foi essencial para que pudéssemos continuar nossas jornadas como pesquisadores, mostrando respeito, atenção e compreensão.

As instituições de fomento, CAPES, cujo presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Assim como FAPERJ, pela oportunidade de ser concebido com a bolsa FAPERJ nota 10 durante este período de adversidade.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

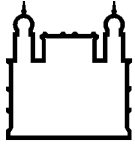
Modulação da resposta *in vitro* de células dendríticas e macrófagos humanos estimuladas com a vacina BCG Moreau

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Matheus Rogério Almeida

A tuberculose (TB) é a principal causa de morte por doença infecciosa no mundo. A BCG é a única vacina licenciada e aprovada, apresentando boa relação custo-eficácia para prevenção das formas severas da TB em crianças. Contudo, sua proteção é considerada limitada contra TB pulmonar em adultos. Células dendríticas (DCs) e macrófagos são APCs de papel fundamental na resposta imune contra a TB. Assim, esse trabalho teve como objetivo aqui averiguar a maturação e a ativação de moDCs e macrófagos humanos estimulados com diferentes variáveis da vacina BCG Moreau contendo bacilos viáveis (frescos ou congelados) e inativados (irradiados; aquecidos e autoclavados) na proporção de 2:1, além de seus efeitos em células T, avaliando principalmente os perfis imunofenotípicos por citometria de fluxo e de produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por ELISA. No geral, observou-se reduções expressivas ($p < 0,05$) enquanto sua frequência de populações para os receptores em macrófagos, CD11c, CD86, CCR7, CD40, MHC-II, TLR-4 e CD14. Em moDCs uma redução foi vista receptores CD11c, MHC-II e CD40 e CD209 enquanto um aumento expressivo e visto no CD86. Enquanto a expressão desses receptores por mediana de intensidade de fluorescência, macrófagos apresentam expressiva redução de MHC-II, CD14 e um aumento de CD80. Enquanto moDCs, uma redução e vista em CD1a, CD83, TLR-2 e CD209. Em contrapartida, também e visto um aumento em moDCs nos receptores CD11c, CD86, CD83. Em contato com linfócitos T, essas APCs pré-estimuladas com o imunógeno em sua forma viável pareceram ser capazes de induzir a polarização dos perfis Th1 e Th- regulatório. Assim, este estudo foi capaz de comprovar o caráter imunomodulatório da vacina BCG Moreau através de um ensaio *in vitro* utilizando moDCs e macrófagos humanos, visando uma melhor compreensão da interação entre APCs e o BCG na tentativa de identificar mecanismos específicos da imunidade contra a TB.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Modulation of the *in vitro* response of human dendritic cells and macrophages stimulated with the BCG Moreau vaccine

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Matheus Rogério Almeida

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death from infectious disease in the world. BCG is the only licensed and approved vaccine and is cost-effective for preventing severe forms of TB in children. However, its protection is considered limited against pulmonary TB in adults. Dendritic cells (DCs) and macrophages are APCs that play a key role in the immune response against TB. Thus, this work aimed to investigate the maturation and activation of human moDCs and macrophages stimulated with different variables of the BCG Moreau vaccine containing viable (fresh or frozen) and inactivated (irradiated; irradiated; heated and autoclaved) bacilli in the proportion of 2:1, in addition to its effects on T cells, mainly evaluating the immunophenotypic profiles by flow cytometry and the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by ELISA. In general, significant reductions ($p < 0.05$) were observed in their population frequency for macrophage receptors, CD11c, CD86, CCR7, CD40, MHC-II, TLR-4, and CD14. In moDCs, a reduction was seen in CD11c, MHC-II, CD40, and CD209 receptors, while a marked increase was seen in CD86. While the expression of these receptors by median fluorescence intensity, macrophages show a significant reduction in MHC-II, CD14, and an increase of CD80. While in moDCs, a reduction is seen in CD1a, CD83, TLR-2 and CD209. In contrast, an increase in moDCs at CD11c, CD86, and CD83 receptors is also seen. In contact with T lymphocytes, these APCs pre-stimulated with the immunogen in its viable form seemed to be able to induce polarization of the Th1 and Th-regulatory profiles. This study was able to prove the immunomodulatory character of the BCG Moreau vaccine through an *in vitro* assay using moDCs and human macrophages, aiming at a better understanding of the interaction between APCs and BCG in an attempt to identify specific mechanisms of immunity against TB.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A tuberculose	2
1.1.1 Agente Etiológico.....	2
1.1.2 O Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.1.3 Epidemiologia da tuberculose no mundo.....	5
1.1.4 Epidemiologia da tuberculose no Brasil.....	8
1.1.5 Diagnóstico e tratamento da tuberculose.....	10
1.1.6 Fisiopatologia.....	12
1.1.7 Imunopatogenia.....	18
1.2 A vacina BCG	23
1.2.1 Histórico da vacina BCG.....	23
1.2.2 Diversidades de cepas da vacina BCG.....	25
1.2.3 A vacina BCG no Brasil.....	27
1.2.4 Eficácia da vacina BCG.....	28
1.2.5 Imunologia da vacina BCG.....	29
1.3 As células dendríticas	33
1.3.1 Migração de células dendríticas.....	33
1.3.2 Heterogeneidade de células dendríticas.....	35
1.3.3 A vacina BCG e células dendríticas.....	40
1.4 Justificativa	42
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 Objetivos Específicos	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Biossegurança	45
3.2 Considerações éticas	45
3.3 População estudada	45
3.4 Obtenção de amostras	46
3.5 Separação de células mononucleares de sangue periférico	46

3.6	Purificação de monócitos e linfócitos T	47
3.7	Diferenciação de monócitos em moDCs e macrófagos.....	47
3.8	Obtenção das variáveis da vacina BCG Moreau.....	48
3.9	Cultivos das diferentes variáveis da vacina BCG Moreau	48
3.10	Co-culturas de moDCs-lifócitos T e macrófagos-linfócitos T	49
3.11	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	49
3.12	Leitura no citofluorímetro e estratégia de regiões	51
3.13	Detecção de citocinas.....	53
3.14	Análise estatística	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Cultivo das diferentes variáveis da vacina BCG Moreau	55
4.2	Purificação de Monócitos	56
4.3	Análise da diferenciação de moDCs e macrófagos <i>in vitro</i> e frequência de expressão de diferentes moléculas de superfície e intracelulares após estímulo com BCG.....	58
4.4	Modulação da expressão <i>in vitro</i> das moléculas de superfície e intracelular em moDCs e macrófagos	62
4.5	Secreção <i>in vitro</i> de citocinas pró e anti-inflamatórias por moDCs e macrófagos.....	65
4.6	Avaliação preliminar de perfis linfocitários após interação com moDCs e macrófagos infectados com a vacina BCG Moreau.....	66
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	81
7	PERSPECTIVAS	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9	ANEXO	101
9.1	Microscopia óptica da cultura de macrófagos e moDCs	101
9.2	Inclusão de artigo(s) publicado(s), manuscrito(s) aceito(s) ou submetidos para publicação	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura representando <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).	2
Figura 2: Ilustração da formação estrutural da parede do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).	3
Figura 3: Estimativa de incidência de tuberculose no mundo em 2020.	6
Figura 4: Estimativa de mortalidade de tuberculose em indivíduos HIV negativos em 2019.	7
Figura 5: Coeficiente de incidência de tuberculose no Brasil em 2021.	9
Figura 6: Coeficiente de mortalidade por tuberculose no Brasil em 2020.	10
Figura 7: Ilustração do processo de patogênese do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).	15
Figura 8: Fotografia de aspectos históricos no museu do Instituto Pasteur de Lille, França.	23
Figura 9: Genealogia das cepas da vacina BCG ao longo dos anos, evidenciando suas Regiões de Deleção (RD) e os grupos identificados com os Tandem de Duplicação (DU).	26
Figura 10: Principais subtipos de células dendríticas e linhagens de progenitores relacionadas em humanos.	36
Figura 11: Gráficos representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo para macrófagos (A) e moDCs (B). É feito um gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) característico da população estudada. Para macrófagos é feito um histograma de CD14 enquanto em moDCs um histograma de CD209. Por fim, dentro dessas populações positivas foi feito um histograma dos marcadores destacados a direita.	52
Figura 12: Gráficos representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo de co-cultura de macrófagos e moDCs com linfócitos T. É feito um gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) característico da população estudada. Posteriormente é feito um histograma de CD8 e um histograma de CD4. Por fim, dentro dessas populações positivas foi feito um <i>dotplot</i> dos marcadores FoxP3+CD25+ e IFN- γ +CD69.	53
Figura 13: Culturas da vacina BCG Moreau em diferentes condições de viabilidade. Tubo 1: BCG da FAP. Tubo 2: BCG congelada. Tubo 3: BCG irradiada. Tubo 4: BCG irradiada e aquecida. Tubo 5: BCG autoclavada.	55

Figura 14: Culturas da vacina BCG Moreau em diferentes condições de viabilidade. A) Tubos 1 e 2 (viáveis) e tubo 3 (inativada). B) Tubo 2 (viável) e tubo 3 (inativada).....	56
Figura 15: Perfis morfológicos representativos do processo de purificação de monócitos por microesferas magnéticas CD14+. A) Células advindas do processo de separação de PBMCs por gradiente de densidade, realizada anteriormente a purificação dos monócitos. B) Células advindas após processo de purificação dos monócitos, a partir de PBMCs. C) Eluído obtido após o processo de purificação dos monócitos.	57
Figura 16: Porcentagem de monócitos e linfócitos após purificação celular por beads magnéticas CD14+. A) Porcentagem de monócitos obtidos do processo de enriquecimento de PBMCs, purificação com beads magnéticas ou eluído, após processo de purificação. B) Porcentagem de linfócitos nas mesmas condições que A. (N=10).....	57
Figura 17: Trabalhos em que se foi baseado os protocolos de cultivos dos grupos celulares utilizados neste projeto.....	59
Figura 18: Expressão de moléculas de superfície e intracelulares em macrófagos e moDCs diferenciados a partir de PBMCs de doadores adultos sadio e estimulados com BCG (N=10). As moDCs e os macrófagos foram estimulados com LPS ou infectados com as diferentes condições da vacina BCG Moreau por 24h e o percentual de células expressando CD1a (A), CD11c (B), CD80 (C), CD86 (D), CD83 (E), MHC-II (F), CD40 (G), CCR7 (H), TLR-2 (I) e TLR-4 (J), bem como CD14 em macrófagos e CD209 em moDCs (K), foi detectado por citometria de fluxo. Células sem estímulo foram usadas como Controle. LPS: Controle positivo; BCG FAP; BCG congelada; BCG irradiada; BCG irradiada aquecida e; BCG autoclavada. *p≤ 0.05, ** p≤ 0.005, ***p≤ 0.001.	62
Figura 19: Expressão de moléculas de superfície e intracelulares em macrófagos e moDCs diferenciados a partir de PBMCs de doadores adultos sadios e estimulados com BCG por meio de citometria de fluxo medidas por MFI (N=10). As moDCs e os macrófagos foram estimulados com LPS ou infectados com as diferentes condições da vacina BCG Moreau por 24h e foi mensurado o MFI de células expressando CD1a (A), CD11c (B), CD80 (C), CD86 (D), CD83 (E), MHC-II (F), CD40 (G), CCR7 (H), TLR-2 (I) e TLR-4 (J), bem como CD14 em macrófagos e CD209 em moDCs (K), por citometria de fluxo.	

Células sem estímulo foram usadas como Controle. LPS: Controle positivo; BCG FAP; BCG congelada; BCG irradiada; BCG irradiada aquecida e; BCG autoclavada. *p≤ 0.05, ** p≤ 0.005.	65
Figura 20: Secreção de citocinas dosadas por ELISA no sobrenadante de macrófagos (A) ou moDCs (B) estimuladas com BCG. Em ambos os perfis, foram avaliados as citocinas IL-10, IL-18, IL-1β, IL-1α, TNF-α, IL-12, IL-15, MCP-1, IL-6. (N=8).....	66
Figura 21: Expressão de moléculas de ativação linfocitária por meio de citometria de fluxo (N=1, quadruplicata). A) Gráfico da expressão de Foxp3 e CD25 em linfócitos TCD4 em co-cultura com moDCs e macrófagos de doadores adultos saudáveis, sendo as variáveis controle negativo, estimulado com LPS ou infectadas com as diferentes condições da vacina BCG Moreau. B) Gráfico da expressão de Foxp3 e CD25 em linfócitos TCD8 em co-cultura com moDCs e macrófagos em condições semelhantes de A.*p≤ 0.05, ** p≤ 0.005, ***p≤ 0.001, ****p≤ 0.0001.	68
Figura 22: Expressão de moléculas de ativação linfocitária por meio de citometria de fluxo (N=1, quadruplicata). A) Gráfico da expressão de IFN-γ e CD69 em linfócitos TCD4 em co-cultura com moDCs e macrófagos de doadores adultos saudáveis, sendo as variáveis controle negativo, estimulado com LPS ou infectadas com as diferentes condições da vacina BCG Moreau. B) Gráfico da expressão de IFN-γ e CD69 em linfócitos TCD8 em co-cultura com moDCs e macrófagos em condições semelhantes de A.*p≤ 0.05, ** p≤ 0.005, ***p≤ 0.001.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos monoclonais anti-humano com seus respectivos fluorocromos e suas especificações para a marcação de macrófagos e moDCs.	50
Tabela 2: Anticorpos monoclonais anti-humano com seus respectivos fluorocromos e suas especificações para marcação de linfócitos T.	50
Tabela 3: Limites de detecção de citocinas mensurados por ELISA	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- APC** = Células Apresentadoras de antígenos
- BCG** = Bacilo de Calmette Guérin
- BSA** = Albumina Sérica Bovina
- CLR** = Receptor do tipo Lectina-C
- CFP-10** = *Culture filtrate protein-10 kDa*
- COVID-19** = *Coronavirus disease 19*
- DCs** = Células dendríticas
- DC-SIGN** = *DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin*
- ESAT-6** = *Early secreted antigenic target-6 kDa*
- FAP** = Fundação Atauilpho de Paiva
- FSC** = *Foward Scatter*
- HIV** = Vírus da imunodeficiência humana
- HUCFF** = Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
- ID** = Intradérmica
- IFN** = Interferon
- IGRA** = *Interferon Gamma Release Assay*
- IL** = Interleucina
- IRF** = *Interferon regulatory factor*
- KLRG1** = Receptor G1 tipo lectina de células assassinas
- LAM** = Lipoarabinomanana
- LC** = *Langerhans cells*
- LTBI** = Infecção Tuberculose latente
- ManLAM** = Lipoarabinomanana Manosilada
- MDR-TB** = Tuberculose com resistência multidrogas
- MFI** = Mediana da Intensidade de fluorescência
- MS** = Ministério da Saúde
- Mtb** = *Mycobacterium tuberculosis*
- MTBC** = Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- NK** = *Natural Killer*
- NLR** = Receptor do tipo Nod
- NO** = Óxido Nítrico
- NTM** = Micobacteria não Tuberculosa
- OMS** = Organização Mundial da Saúde

PAMP = Padrão molecular associado a patógenos
PBMC = Células mononucleares do sangue periférico
PBS = Tampão Salina Fosfato
PCR = Reação em Cadeia da Polimerase
PDIM = Ftioceroldimicocerosato
PGL = Glicolípido fenólico
PPD = Derivado Proteico Purificado
RD = Região de diferença
ROS = Espécies reativas de oxigênio
SARS-CoV-2 = Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SCS = Seio subcapsular
SFB = Soro Fetal Bovino
SSC = *Side Scatter*
TA = Temperatura ambiente
TB = Tuberculose
TDM = Trealose-6-6'-Dimicolato
Tfh = Linfócitos T foliculares auxiliares
TipDCS = DCs produtoras de TNF e iNOS
TLR = Receptor do tipo *Toll*
vATPase = ATPase vesicular

1 INTRODUÇÃO

Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Imunologia Clínica (LIC) do Instituto Oswaldo Cruz /Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) versa majoritariamente sobre a resposta imune celular *in vitro* frente a vacina BCG, utilizando amostras clínicas de doadores voluntários adultos saudáveis e vacinados. Destarte, as detecções de citocinas e de marcadores fenotípicos, através de ensaios imune enzimáticos e de marcação com anticorpos para citometria de fluxo, tornaram-se as metodologias padrões da imunologia experimental para este grupo de indivíduos. Assim, sabendo que células imunes de adultos respondem *in vitro* de maneira robusta frente a um estímulo (1, 2), torna-se muito relevante comparar o perfil da resposta imune induzida pela BCG nos leucócitos desse grupo, podendo essa abordagem ajudar a entender por quanto tempo a imunidade inata se mantém ativa após estímulos, bem como seus fatores determinantes. Como o LIC vem ao longo dos últimos anos estudando a interação *in vitro* da vacina BCG com material humano, esta dissertação visa como meta principal **o estudo *in vitro* da maturação e da ativação tanto de células dendríticas quanto de macrófagos humanos e sua relação com diferentes variáveis da vacina BCG Moreau**, avaliando a modulação daquelas células como possível ferramenta para o entendimento da proteção desejada. Esta proposta poderá evidenciar como o sistema imunológico responde a diferentes padrões de viabilidade relacionados à vacina BCG, seja este imunógeno viável, ou morto por calor ou irradiação, auxiliando na melhor compreensão da imunologia por de trás da proteção vacinal. Assim, esta abordagem pode ajudar na concepção de novas intervenções profiláticas, bem como terapêuticas, seguras contra a tuberculose. Em virtude disso, porém, torna-se interessante uma revisão mais aprofundada sobre alguns aspectos da literatura científica relacionados aos objetivos do presente trabalho, para melhor entender a motivação desse estudo.

1.1 A tuberculose

1.1.1 Agente Etiológico

O Bacilo de Koch ou *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), descoberto e descrito em 1882 por Robert Koch, é o agente etiológico da tuberculose (TB), uma enfermidade infectocontagiosa (3). Esta bactéria está presente entre os seres humanos há milênios, tendo sido identificada em necropsias de múmias do antigo Egito, América pré-colombiana e Europa neolítica (4), assim como restos mortais de uma população húngara datada do final da Idade Média (4). A identificação do Mtb a partir desses achados arqueológicos é proporcionada graças aos avanços recentes da biologia molecular (5).

Esta micobactéria é pertencente ao filo Actinobactéria, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae e família Mycobacteriaceae (6). A etimologia “*Mycobacterium*” surgiu a partir da semelhança desse grupo de bactérias com os fungos, por apresentarem crescimento e morfologia análogos (7). Este patógeno dispõe de uma barreira/cápsula grossa e complexa, formato de bacilo/bastonete, apresentando forma curva ou reta, sendo intracelular facultativo, aeróbios estritos, crescimento lento, inerte e não produtor de esporos (8, 9) (Figura 1). Este grupo de bactérias possui uma parede celular rica em lipídeos, o que as diferencia dos demais grupos, conferindo características únicas relacionadas ao seu crescimento, virulência e viabilidade (7).

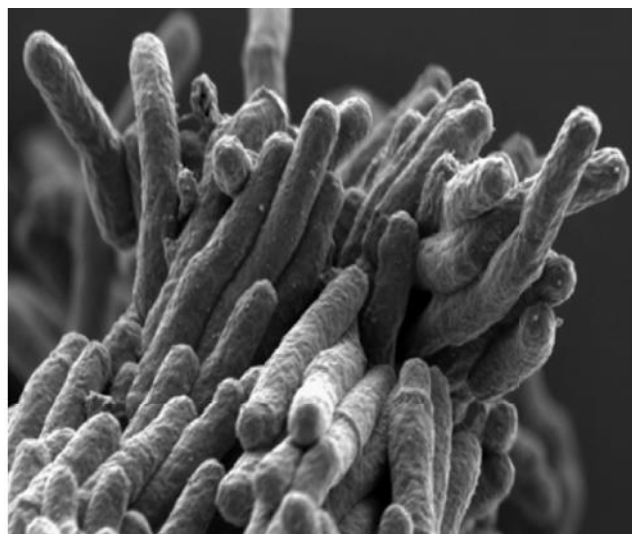


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura representando *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).
Fonte:(6).

A presença de um envelope celular complexo confere à micobacteria uma série de vantagens. A parede celular rica em polissacarídeos e lipídeos possui uma baixa permeabilidade contra drogas hidrofílicas e resistência contra o sistema imune do hospedeiro e detergentes, características de bacilo ácido álcool resistente, ou BAAR (8, 10) (Figura 2).

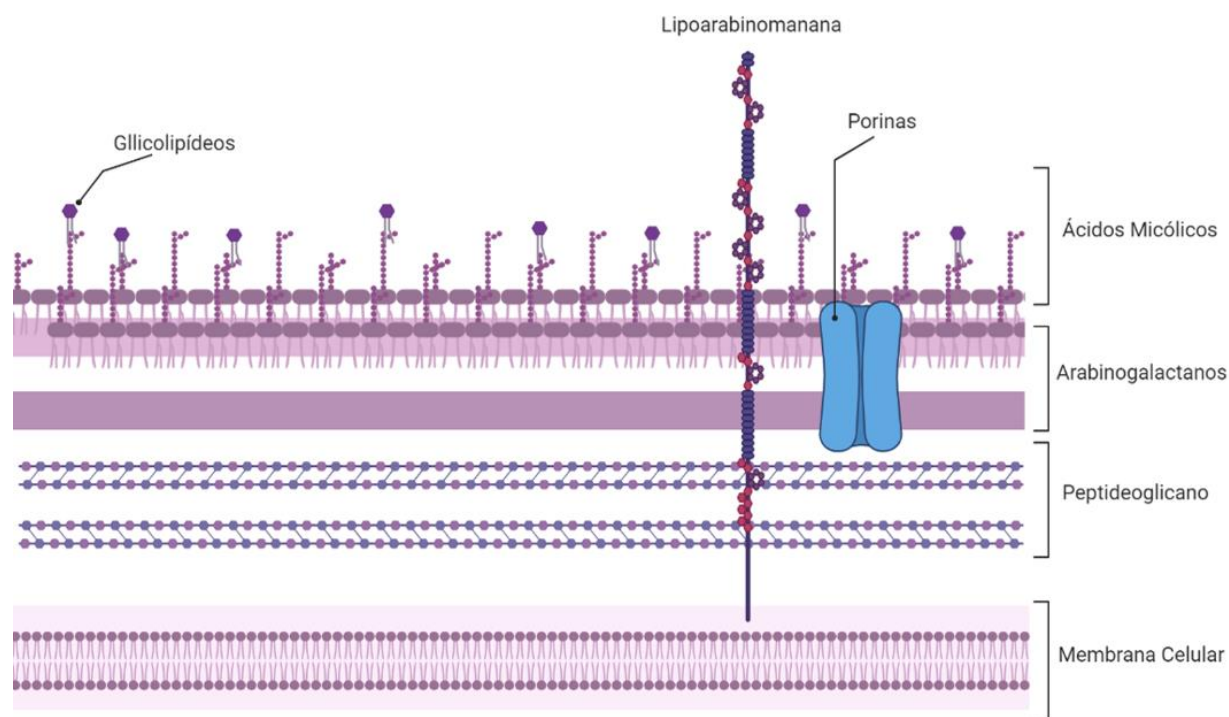


Figura 2: Ilustração da formação estrutural da parede do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).
Fonte: (11)

O Mtb também possui na sua composição, estruturas como ácido micólico, fosfatidilinositol manosídeo, ftiocerol dimicocerosato (PDIM), trealose-6-6'-dimicolato (TDM), peptídeoglicanos e glicolipídios, como lipomanana e lipoarabinomanana (LAM) (10, 12). O ácido micólico está presente em forma de bicamada em uma associação com a parede celular, sendo que a propriedade deste culmina na flexibilidade, fluidez e permeabilidade (12). A membrana externa do Mtb está ligada covalentemente ao complexo arabinogalactano-peptideoglicano, através do ácido micólico (10).

O TDM é caracterizado por estar conectado a glicolipídios, estando relacionado com a virulência do Mtb (12). Conhecido como fator-corda, essa estrutura está associada com intensa reação granulomatosa, assim como formação de biofilme (13, 14). O TDM é reconhecido por macrófagos através de receptor do tipo Lectina-C (CLR), induzindo produção de citocinas inflamatórias, óxido nítrico

(NO) e formação do granuloma (15). A lipomanana está associada com a indução de interleucina-12 (IL-12), papel antagônico quando comparado ao LAM, que promove a baixa indução de IL-12 em células dendríticas (DCs) e macrófagos, desta forma, controlando o nível de apoptose negativamente induzido pelo Mtb em macrófagos (12, 16). Já o LAM está associado com o fator de virulência do Mtb, por ocupar grande porção da parede celular, modulando a resistência bacteriana contra a resposta imune do indivíduo, além de ser responsável pela ativação de neutrófilos, via receptor do tipo *toll* (TLR) 1 e 2 (12, 17).

Com a exposição ao patógeno, o indivíduo infectado pode apresentar diversas alternativas em virtude da presença do Mtb: (i) o patógeno pode ser eliminado por completo pelo sistema imune do hospedeiro (imunidade esterilizante); (ii) uma infecção TB latente (LTBI) pode ser estabelecida; ou (iii) a TB pode vir a se manifestar de imediato, ou após determinado período de tempo latência, a infecção pode ser reativada devido a alguma deficiência relacionada ao sistema imune do indivíduo (12).

1.1.2 O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo Mtb (MTBC) possui uma gama de espécies de micobactérias responsáveis por causar TB, e estas espécies possuem similaridade genética, indicando que as mesmas apresentam um ancestral comum (18, 19). Segundo Jang e colaboradores (20), as espécies do MTBC evoluíram de micobactérias ambientais, conhecidas como micobactérias não tuberculosas (NTM), a patógenos, quando adquirem a capacidade de sobreviver no interior de protozoários de vida livre. Essa característica singular contribui para que estas bactérias adquiram um fenótipo de virulência (18, 20). Posteriormente, esta característica iria se estender a fagócitos de mamíferos, como os macrófagos, um dos principais alvos do Mtb durante a progressão da desta enfermidade, além da capacidade de disseminação de hospedeiro para hospedeiro (18, 21).

Contudo, as espécies que compõe o MTBC possuem divergências quanto à sua patogenicidade, tropismo e morfologia (19). Algumas dessas espécies irão infectar principalmente humanos (Mtb, *M. africanum*, *M. canettii*), roedores (*M. microti*), caprinos (*M. caprae*) ou bovinos (*M. bovis*), havendo infecção em outros grupos taxonômicos por outras espécies de micobactérias (18, 19). Quando se comparam espécies que infectam humanos, nota-se particularidades. *M. canettii*, por

exemplo, apresenta o maior genoma do MTBC (19) e, similarmente ao *M. africanum*, produz colônias, embora com morfologias distintas, além de serem encontradas em localidades diferentes ao redor do globo (19). Já o Mtb possui a maior capacidade de infectar hospedeiros humanos, quando comparado ao *M. canettii*, fato que está associado a uma virulência mais branda deste segundo, e baixa persistência no hospedeiro (22, 23). Assim, evidencia-se que, embora estas espécies tenham um ancestral comum, as mesmas divergem biologicamente, morfologicamente e quanto à sua patogenicidade.

1.1.3 Epidemiologia da tuberculose no mundo

A TB é caracterizada como uma enfermidade global e está dentre as 10 maiores causas de morte no mundo (24). Esta enfermidade possui transmissão principalmente pelo ar, uma vez que o bacilo é inalado por aerossóis expelidos de indivíduos acometidos pela forma ativa da doença (25). Estudos demonstram que indivíduos saudáveis em contato prolongado com indivíduos positivos se tornam infectados e, assim, se tornam parte da cadeia de transmissão deste patógeno (26).

Até 2019, esta doença liderava o *ranking* de mortes por um único agente infeccioso, acima de outras patologias, como o HIV/AIDS (27). Entretanto, a TB perdeu este posto para o novo coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), responsável pela COVID-19 (27). Atualmente, esta nova enfermidade acumula cerca de 6.410.850 milhões de mortes ao redor do globo (28). Por conta do cenário pandêmico atual, os boletins da Organização Mundial da Saúde (OMS) referentes a 2020 e 2021 foram impactados, no que se refere à coleta de dados de casos novos diagnosticados, óbitos e tratamentos de TB (27, 29). Dentre estes impactos, o principal é referente às pessoas recém diagnosticadas com TB, nas quais houve uma queda de cerca de 18% nas notificações de 2019 para 2020, destacando os países mais afetados, como Índia, Indonésia e Filipinas (27). Estima-se, contudo, que cerca de 9,9 milhões de pessoas desenvolveram a enfermidade em 2020, (27). Cerca de 90% dos casos estão relacionados aos adultos e com grande presença desta enfermidade em homens (56% do total de casos), seguidos pela mulheres (33%) e pelas crianças (11%) (Figura 3) (27).

Estimated TB incidence rates, 2020

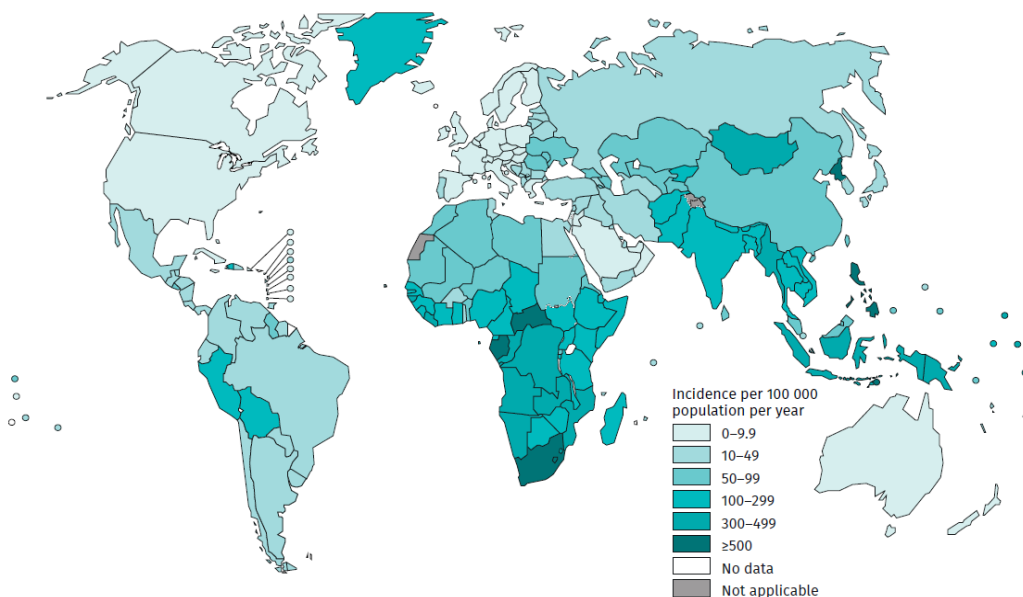


Figura 3: Estimativa de incidência de tuberculose no mundo em 2020.
Fonte: (27).

Os continentes que apresentam maiores concentrações de casos de TB são a Ásia, em sua região sudeste (43%), seguido pelo África (25%). Em contrapartida, os que apresentam menores concentrações são as Américas (3%) e a Europa (2,3%) (27). Destaca-se que 30 países compõem a maior carga de TB, com cerca de 86% de todos os casos pelo mundo, e oito desses detêm cerca de dois terços dos casos em sua totalidade: Índia (26%), China (8,5%), Indonésia (8,4%), Filipinas (6%), Paquistão (5,8%), Nigéria (4,6%), Bangladesh (3,6%) e África do Sul (3,3%). O Brasil, por sua vez, encontra-se dentro do grupo dos 30 países, atualmente ocupando a 19ª posição em número absoluto de casos (29).

Em 2019, a OMS realizou uma estimativa na qual foi apontado que uma redução de 50% no diagnóstico de casos de TB em três meses, por conta da pandemia de COVID-19, poderia levar a cerca de 400.000 mortes (29). A redução em diagnóstico e tratamento influenciou diretamente nas mortes por TB, em que foram estimados cerca de 1,3 milhões de óbitos entre indivíduos HIV-negativos (comparado aos 1,2 milhões de óbitos em 2019) e 214.000 óbitos entre os HIV-positivos (comparado aos 209.000 óbitos em 2019) (27, 29). Dentre as mortes entre os HIV-negativos, 53% são homens, 32% são mulheres e 16% são crianças(27). Enquanto isso, dos óbitos entre os HIV-positivos, 50% são homens, 40% são mulheres e 9,8% são crianças (27).

Também foi evidenciado que 84% das mortes dentre os HIV-negativos, e 85% dentre os HIV-positivos, ocorreram na África e no sudeste asiático (27). Uma

redução de unidades de saúde que oferecem atendimento hospitalar para indivíduos com TB também foi observada (29). Como tentativa de mitigação, muitos países vem realizando atendimento remoto e fornecendo medicamentos de tratamento para um mês, sem a necessidade de ida às enfermarias(29).

Em 2020, a OMS não incorporou em seu boletim um mapa relacionado a taxa de mortalidade (29). Entretanto, com valores aproximados, o mapa de 2019 poderia representar de maneira fidedigna a distribuição da taxa de mortalidade ao redor do globo (29). Essa taxa é extremamente variada entre países, em que naqueles ditos desenvolvidos, ocorreram menos de uma morte para cada 100.000 habitantes, e chegando a 40 ou mais em países da África (Figura 4) (29).

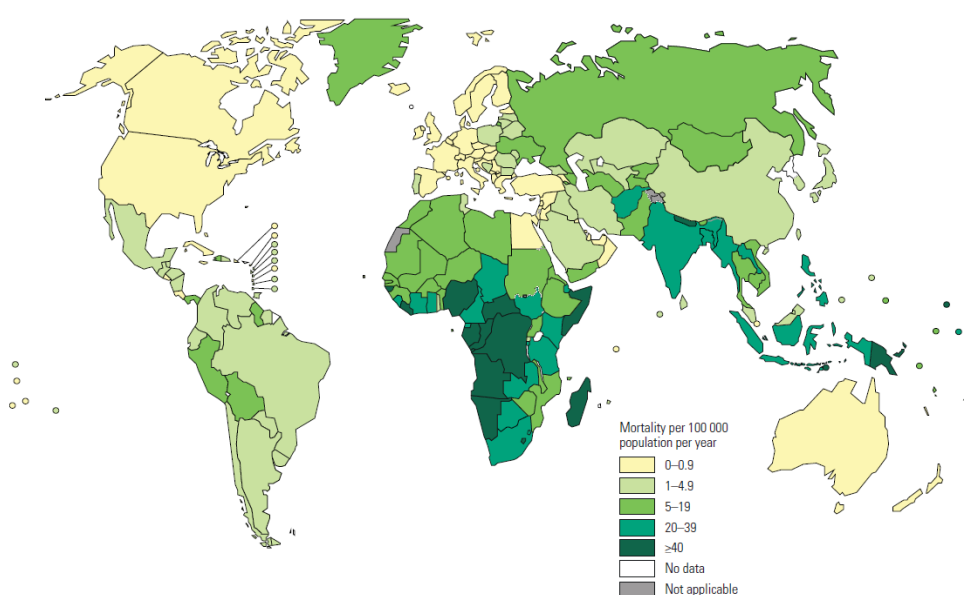


Figura 4: Estimativa de mortalidade de tuberculose em indivíduos HIV negativos em 2019. Fonte: (29).

Em 2014, na tentativa de reduzir a disseminação e mortalidade da TB, a OMS apresentou um plano multisetorial intitulado “*The end TB strategy*”, que propunha a redução da taxa de incidência e de mortalidade em 20% e 35%, respectivamente, entre 2015 e 2020 (30). Esses números não puderam ser alcançados até o dado momento, no qual a redução de mortes ao nível global alcançou cerca de 9,2%, um progresso afetado diretamente pela pandemia de COVID-19 (27). Entretanto, alguns continentes fizeram progressos marcantes, como a Europa, com redução de 26% da mortalidade, e a África, com redução de 18% (27). Todavia, as Américas registraram um aumento no número de mortes em cerca de 10%, quando comparado a 2015 (27). Em relação a redução da taxa de incidência, a mesma chegou a 11% no nível global, destacando novamente a Europa, que atingiu a meta estipulada pela OMS,

com redução de 25%, e a África, que chegara perto da meta proposta, com redução de 19% (27).

Atualmente, estima-se que um quarto da população mundial esteja infectada com Mtb, e que 5 a 10% desses irão desenvolver a TB durante a vida (27), sendo a principal forma clinicada TB caracterizada pelo acometimento pulmonar (31). Entretanto, cerca de 20 a 25% dos casos de TB apresentam envolvimento extrapulmonar, cujas formas mais comuns são a TB pleural, TB ganglionar e TB osteo-articular (32). Ademais, sabe-se que o desenvolvimento de TB aumenta em indivíduos que apresentam comorbidades, como desnutrição, tabagismo, diabetes e etilismo (27).

1.1.4 Epidemiologia da tuberculose no Brasil

Em 2021, o Brasil contabilizou 68.271 casos novos de TB, correspondendo a um coeficiente de incidência de 32,0 casos para cada 100 mil habitantes (33). Cerca de 4,5 mil óbitos foram contabilizados pelo Ministério da Saúde, com um coeficiente de mortalidade de 2,1 óbitos por 100 mil habitantes (33). Com a pandemia de COVID-19, as reduções nos níveis de notificações foram observadas (cerca de 14,3%), assim como no uso de testes rápidos moleculares para TB (14%), quando comparados a 2019 (33).

O coeficiente de incidência de TB vem apresentando redução gradativa desde 2011 até 2016, com 34,4 casos de TB para cada 100,000 habitantes. A partir de 2017, esta taxa apresentou aumento até 2019, com 37,1 casos (33). Por conta do SARS-CoV-2, esse índice despencou abruptamente para 32,0 casos para cada 100.000 habitantes, fator relacionado a subnotificação por conta do período pandêmico (33). Em relação ao coeficiente de incidência visto de maneira estratificada entre os estados brasileiros, aqueles que apresentam maiores números foram Amazonas (71,3) Rio de Janeiro (67,4) e Roraima (54,6) (acima de 54,6 casos por 100 mil habitantes) (Figura 5) (33). Desde 2012, os casos de coinfeção TB/HIV vem aumentando em demasia: em 2012, a taxa de detecção era de 67,3%, tendo subindo para 82,2% em 2020 (33). Subsequentemente, ocorreu uma queda em 2021 (76,9%), devido à redução de detecção por conta da pandemia de COVID-19 (33). As principais capitais que apresentaram maiores índices da coinfeção TB/HIV são Brasília, Porto Alegre e Florianópolis (33).

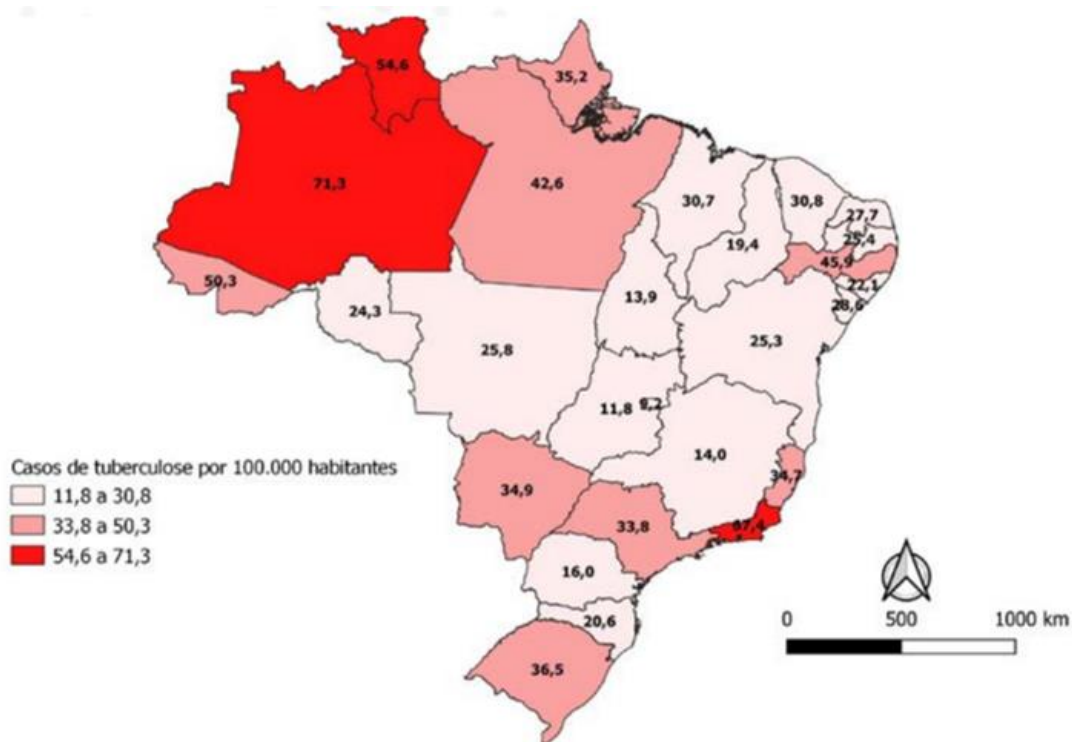


Figura 5: Coeficiente de incidência de tuberculose no Brasil em 2021.
 Fonte: (33).

Desde 2010, o número de mortes por TB no Brasil vem variando dentro de uma faixa de 4.563 a 4.543, sendo refletido pelo coeficiente de mortalidade de 2,1 a 2,3 óbitos para cada 100.000 habitantes (33). Cerca de 10 estados brasileiros apresentaram o coeficiente de mortalidade igual ou maior ao nacional, sendo esses o Rio de Janeiro (4,4), Acre (3,9), Amazonas (3,6), Pernambuco (3,1), Pará (2,8), Mato Grosso do Sul (2,6), Rio Grande do Sul (2,4), Rio Grande do Norte (2,2), Roraima (2,2), Roraima (2,2), Mato Grosso (2,2) (Figura 6) (33).

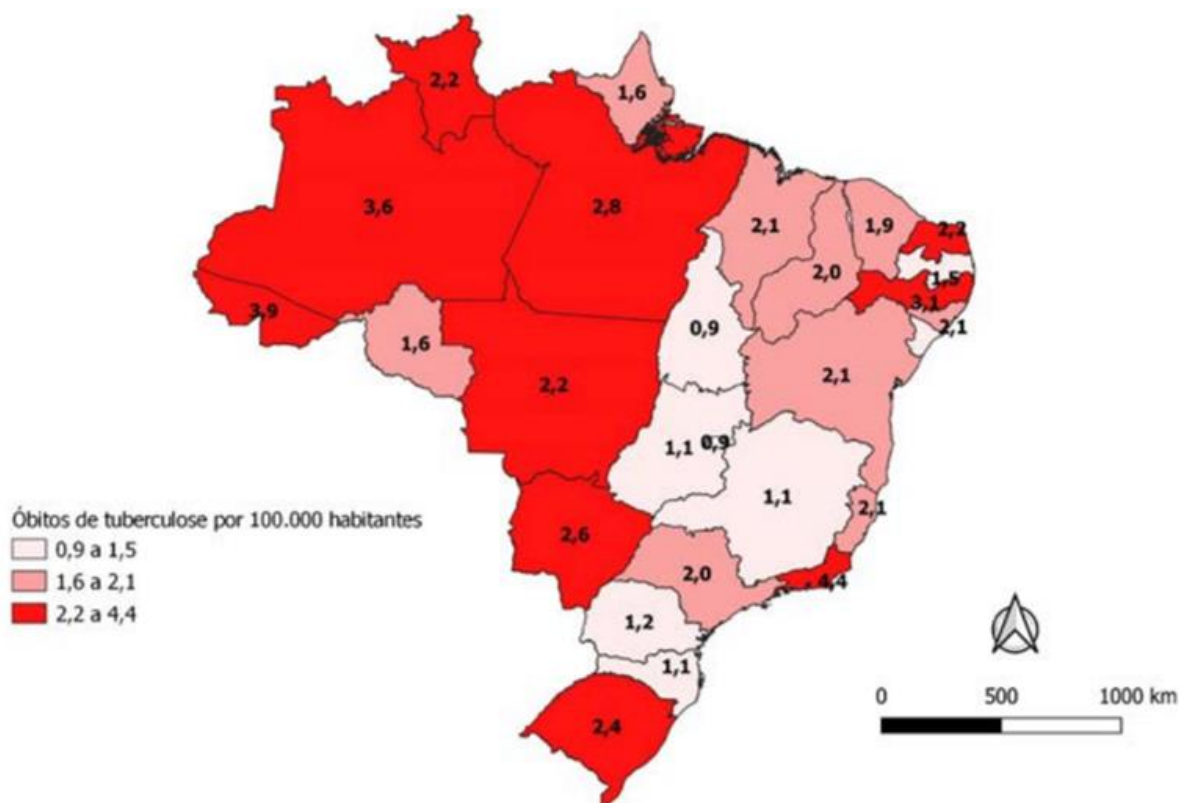


Figura 6: Coeficiente de mortalidade por tuberculose no Brasil em 2020.
Fonte: (33).

1.1.5 Diagnóstico e tratamento da tuberculose

Resumidamente, o diagnóstico da TB se baseia primeiramente na identificação dos sintomas clínicos, comparando-os com os achados em exames/testes laboratoriais. Atualmente, para se detectar a TB existe uma gama de testes diagnósticos (34). A baciloscopia é uma técnica implementada há mais de 100 anos (27), na qual o diagnóstico é realizado a partir do esfregaço do escarro de indivíduos com suspeita desta enfermidade. A baciloscopia é feita a partir das colorações de Ziehl–Neelsen ou Kinyoun na amostra de escarro (35). Esta primeira coloração é feita amplamente para se detectar BAAR (34). Porém, esta metodologia não difere o *Mtb* de outras bactérias BAAR (35). Esta metodologia apresenta uma baixa sensibilidade e requer grande quantidade de bacilos ($>10^4$) (34-37).

Desde 2010, o teste rápido e molecular, realizado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vem sendo usualmente endossado pela OMS. Esse teste é capaz de detectar genes específicos do *Mtb* e sinalizar a resistência à rifampicina, com sensibilidade acima da baciloscopia (cerca de 90%, comparado a 65% pelo BAAR) e especificidade de 99% (27, 36).

Até a atualidade, entretanto, a realização da cultura em amostra de escarro de indivíduos com suspeita de TB permanece como padrão-ouro para a detecção desta enfermidade (27). Este método possui cerca de 99% de especificidade, apresentando um período de pelo menos duas semanas para visualização de colônias, que pode se prolongar por até seis a oito semanas (38). Para detecção do Mtb, a amostra clínica é cultivada em meio Lowenstein–Jensen, ou LJ (38). As culturas de Mtb em meio de cultura sólido são caracterizadas por serem colônias espessadas, irregulares e enrugadas, com a coloração inicialmente branco-cremoso, tornando-se amarelada ao longo do tempo de cultivo (36, 38).

Teste imunológicos também são utilizados para se detectar indivíduos com TB. O pioneiro destes testes foi idealizado pelo próprio Robert Kock com tuberculina ou derivado proteico purificado (PPD), que induz uma reação de hipersensibilidade tardia na pele de indivíduos com contato prévio com as micobactérias (36). Entretanto, esse teste é ideal em locais onde micobactérias são raras, pois em países de baixas latitudes, devido à alta exposição as NTM, assim como sob a aplicação da vacina BCG, testes falso-positivos são comuns (36).

Outro teste mais recente e amplamente utilizado em países desenvolvidos é o de liberação de interferon-gama, ou IFN- γ (do inglês, *Interferon Gamma Release Assay*– IGRA) (39). Sua realização é feita diretamente a partir de amostras de sangue venoso, onde células imunes circulantes serão expostas aos antígenos do Mtb, como as proteínas ESAT-6 (do inglês, *early secreted antigenic target-6 kDa*), CFP-10 (do inglês, *culture filtrate protein-10 kDa*) e TB7.7 (codificados pelo locus RD1 intacto). Nesse abordagem, uma vez que seja vista a produção de IFN- γ por linfócitos específico para esses antígenos, o diagnóstico é dado como positivo (39).

Nos últimos anos, vem sendo desenvolvido um teste imunocromatográfico para diagnóstico de TB. Desde 2015 a OMS recomenda o uso deste teste, em formato de cromatografia de fluxo lateral, capaz de detectar antígenos da superfície do Mtb, como a lipoarabinomanana em indivíduos HIV-positivos (40). Esses antígenos são detectados a partir da urina de indivíduos com sintomas de TB, devido a sua abundância neste tipo de amostra clínica (41). Atualmente vem sendo desenvolvido outros testes de cromatografia de fluxo lateral para indivíduos HIV-negativos (42).

Além dos testes diagnóstico supracitados, existem outros meios de detecção da TB, como o clínico. Este patógeno afeta principalmente o sistema respiratório inferior e causa sintomas, como tosse crônica, astenia, inapetência, emagrecimento,

febre e sudorese noturna (27). Além disso, métodos auxiliares de imagem, como o raio-x e a tomografia do tórax do paciente, fazem parte do diagnóstico clínico, sendo capazes de detectar a formação de lesões no pulmão, formação de granulomas e o crescimento de linfonodos periféricos na região (36).

Como tratamento da TB, sucintamente existe uma primeira linha de fármacos utilizados desde 1940 (27). Via de regra, este tratamento dura seis meses e engloba quatro medicamento distintos: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, sendo estes administrados por via oral (27).

O Brasil detêm o posto de primeiro país do globo a incorporar esse tratamento de longo prazo ao seu sistema público de saúde, já em meados dos anos 70 (43). A resistência do Mtb aos fármacos de primeira linha para tratamento da doença vem sendo um problema mundial de saúde pública, em que indivíduos vem apresentando resistência a rifampicina, ou resistência a mais de um fármaco, como rifampicina e isoniazida, sendo caracterizado como resistência a multidrogas (MDR-TB) (27). Em 2020, 150.359 pacientes foram tratados para MDR-TB (27). Como medida alternativa, indivíduos que apresentam MDR-TB devem adotar os fármacos de segunda linha (27). Porém, estes são mais caros e apresentam maiores efeitos colaterais (27). Assim, diversas abordagens têm sido realizadas na tentativa de reduzir a morbidade e mortalidade relacionada à TB, e dentre as principais, a tenacidade de alta cobertura pela vacina BCG (33).

1.1.6 Fisiopatologia

O Mtb é transmitido através de aerossóis expelidos por indivíduos com a TB ativa (25), bem como na forma LTBI (44). Grande parte dessas gotículas contendo bacilos viáveis são retidos pelas barreiras físicas do indivíduo exposto (45). Porém, parte dessas gotículas, que variam de tamanho, não serão retidas, chegando aos pulmões (45, 46). Assim, gotículas diminutas serão depositadas nas vias aéreas inferiores, enquanto gotículas maiores podem se depositar nas vias aéreas superiores ou orofaringe, podendo culminar no desenvolvimento da TB da orofaringe ou nódulos cervicais (46).

Através das vias aéreas superiores ou inferiores, os bacilos irão para os alvéolos pulmonares (47), que são constituídos por células epiteliais alveolares dos tipos I e II e células imunes inatas, como macrófagos alveolares, DCs e neutrófilos (47). O Mtb primariamente é reconhecido por macrófagos alveolares e DCs, através de moléculas conservadas na superfície do patógeno, como ácido micólico e TDM,

em que essa APCs irão realizar a fagocitose e desta forma ativar o processo inflamatório (47, 48). Nesse ambiente, o Mtb sofre uma série de ações inóspitas do hospedeiro, no qual é privado de nutrientes e sofre ação de peptídeos antimicrobianos como óxido nítrico, enquanto induz a produção de citocinas que gera um aumento da resposta imune inata, como IL-1 β , IL-1 α e TNF- α , atraindo células imunes ao sítio de infecção. Nesse sítio, ocorre o início da formação de uma estrutura madura, gerando um meio ácido e hidrolítico, inibindo o crescimento do bacilo (49). As APCs, como DCs e macrófagos, por suas vezes, irão migrar para os linfonodos e realizar a apresentação de antígenos para linfócitos T, estimulando a resposta imune adquirida, caracterizada por apresentar especificidade (49).

Todavia, o Mtb tem uma competência notável de evadir o sistema imune (49). Esse patógeno tem a capacidade de infectar macrófagos permissivos e subverter aqueles com maior caráter microbicida através do fitocerol dimicocerosado, mascarando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (49, 50). Na ausência de PDIM, os PAMPs ativam macrófagos produtores de espécies reativas de oxigênio (ROS) (51). Glicolípídios fenólicos do Mtb também promovem o recrutamento de macrófagos permissivos, via CCR2 (50, 52).

Após o processo de fagocitose e já no ambiente intracelular, as micobactérias internalizadas são retidas em uma estrutura denominada fagossomo (49). Este é dividido em fagossomo inicial e tardio e fagolisossomo (49). Primordialmente, esta organela não possui a capacidade de degradar o Mtb, sendo necessário passar pelo processo de maturação (53). O fagossomo passa por diversos processos de fusão e fissão de vesículas do aparelho de Golgi, endossomos, lisossomos e autofagossomos em seu processo de maturação (53). Assim, ocorre a acidificação do lúmen fagossômico através do acúmulo de prótons promovido pelas bombas de ATPase vesicular, que promovem o influxo de H⁺ (49, 54). Uma vez que o fagolisossomo está formado, este possui um pH baixo, ideal para que ocorra a atividade enzimática de hidrolases de modo eficiente (53).

Alguns bacilos virulentos podem vir a evadir a resposta imune inata, persistindo no ambiente intracelular (45). Como já dito, o Mtb possui alguns mecanismos subversivos para impedir o processo de digestão celular (49). Através de estruturas TDM, o Mtb é capaz de retardar este processo de maturação do fagossomo, contribuindo para a sobrevivência desta micobactéria (55). Outra proteína presente no fagossomo contendo a micobactéria é denominada de coronina ou TACO (56). A mesma ativa a ação da fosfatase calcineurina dependente

de cálcio, que por sua vez, impede a fusão do fagossomo com o lisossoma, permitindo assim que o bacilo escape das ações degradativas do lisossoma (56).

O Mtb possui a capacidade de inibir a fusão do fagolisossomo através de outras vias, envolvendo ESAT-6 e CFP-10, as quais formam um complexo multiproteico que é secretado pelo sistema ESX-1 do Mtb. Este fato impede a ação de ROS e NO, enquanto ManLAM impede o processo de acidificação (57). Além disso, o Mtb induz uma morte celular por necrose, através de ruptura da membrana mitocondrial interna, e inibindo a reparação da membrana celular de células imunes, como macrófagos alveolares, em que o Mtb irá se replicar e ao ocorrer a morte celular, irá infectar células vizinhas (58, 59). Para o rompimento celular por lise, seria necessário alcançar um limiar estimado de 25 bacilos por célula, processo este que leva alguns dias pelo fato da taxa lenta de replicação do Mtb (60). Além disso, o Mtb pode infectar macrófagos que são mais receptivos ao seu crescimento (57).

Uma vez que os macrófagos no parênquima pulmonar estejam infectados, as micobactérias se replicam, liberando micobactérias viáveis no meio extracelular, infectando, assim, outros macrófagos em um ciclo contínuo (61). Na tentativa de conter a propagação deste microrganismo, uma resposta pró-inflamatória do hospedeiro é orquestrada inicialmente pelos macrófagos, através da secreção de citocinas e quimiocinas, como IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α atraindo outras células imunes para o sítio de infecção (61). Esta resposta imune inata se perpetua até o início da resposta imune adaptativa, mediado por linfócitos (45). Importaneamente, esse início da resposta imune adaptativa específica é induzida após a apresentação antigênica de DCs nos linfonodos, ativando células T *naïve* a migrarem para o sítio de infecção, iniciando a formação do granuloma (61, 62). O processo de apresentação antigênica é lento, com a ativação de linfócitos T ocorrendo no período de 12 a 21 dias após infecção (63). O bacilo, alternativamente, pode vir a se disseminar pelo organismo do indivíduo pelas vias linfática ou hematogênica, levando a quadros de TB extrapulmonar (48).

O granuloma é uma estrutura histopatológica típica e marcante da TB (48). Esse arcabouço celular é caracterizado por ser uma lesão fechada, também denominada de tubérculo, uma propriedade que dá nome à doença (48). O granuloma é caracterizado como uma defesa imunológica que limita fisicamente a disseminação do bacilo por ação antimicobacteriana de células da imunidade inata e adaptativa que compõe essa estrutura, limitando a disponibilidade de oxigênio e nutrientes para este patógeno (64). Por outro lado, o granuloma pode se tornar um

ambiente favorável ao patógeno, onde o bacilo pode crescer ou persistir a longo prazo (64).

O granuloma é uma estrutura dinâmica composta por uma gama de células imunes distintas, sendo um agregado central de macrófagos infectados e não infectados, estes em vários estágios de maturação (44). Frequentemente, estas células podem sofrer uma alteração epiteloide, tornando-se macrófagos espumosos ricos em lipídeos, uma vez que o Mtb gera o acúmulo de colesterol como principal fonte de nutriente, ou se fundir gerando células gigantes multinucleadas (64). Estes macrófagos possuem uma alta variedade fenotípica no granuloma, secretando compostos antibacterianos, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, quimiocinas e proteínas relacionados ao remodelamento tecidual (65). Justapostos ao anel central de macrófagos, DCs, neutrófilos, células T *Natural Killers* (NKT) e linfócitos T γ/δ , CD8 (CTL), CD4 (Th1, Th17 e T regulatórias) e B, associados a fibroblastos e a componentes da matriz extracelular, como colágeno, formam uma borda fibrótica periférica que circundam a estrutura (48, 66). Essa composição celular torna esse microambiente carente tanto de oxigênio (hipóxia), regulado por moléculas, como NO (67), quanto de nutrientes, em que as células centrais sofrem necrose caseosa, formando um núcleo granulomatoso acelular, inibindo a respiração aeróbia e o crescimento do bacilo (Figura 7) (68).

Os granulomas possuem heterogeneidade e além de caseoso clássico, pode se apresentar como estrutura não necrosante (composto por poucos linfócitos), necrótico rico em neutrófilos ou com uma composição predominantemente cavitária ou fibrótica (64). Além disso, granulomas podem variar de acordo com sua composição celular, carga bacteriana e níveis de oxigênio, dentro de um mesmo indivíduo (64). Ainda, um granuloma calcificado é caracterizado por ser derivado de uma resposta imune eficiente e menos inflamatória, quando comparado a outros tipos de granuloma (65).

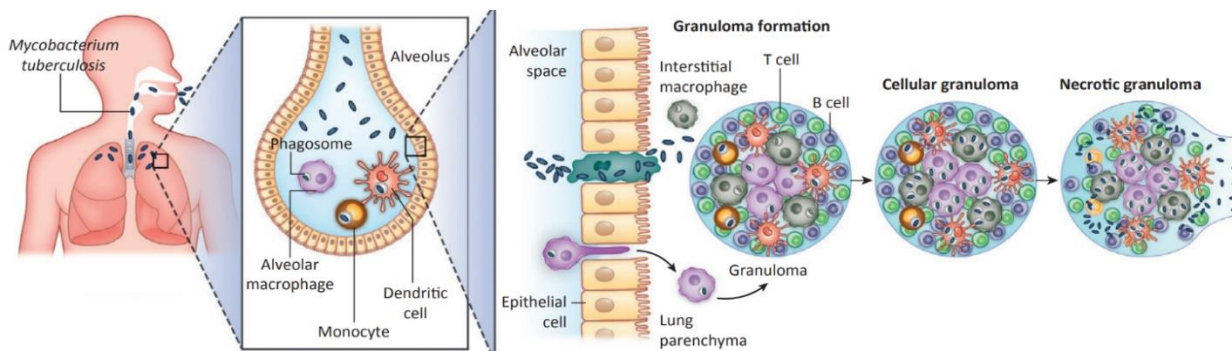


Figura 7: Ilustração do processo de patogênese do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).
Fonte:(6).

Encontram-se no centro do granuloma citocinas pro-inflamatórias, peptídeos antimicrobianos e ROS, enquanto que na periferia, citocinas anti-inflamatórias e mediadores teciduais são evidenciados (44, 65, 69). Quanto à celularidade, os linfócitos T constituem uma rede multifuncional dentro do granuloma, sendo responsáveis por secretar IL-2, IL-17, IL-10, IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF), estando estas duas últimas associadas com a formação e manutenção do granuloma (70). O TNF está principalmente associado à indução de uma tempestade de citocinas, na qual uma gama de quimiocinas são secretadas para recrutar leucócitos, como monócitos, fibroblastos, células T e B, dentre outras, para a formação dessa estrutura (71). Já IL-10 e IL-17, presentes em conjunto no granuloma, estão associadas com a estabilidade deste, e melhores chances de depuração do bacilo (72).

A funcionalidade de linfócitos, assim como sua capacidade de interação com DCs e macrófagos infectados no granuloma, pode influenciar na contenção ou disseminação do bacilo (64). Uma vez que células componentes desse estrutura, como DCs e linfócitos T, têm a capacidade de apresentação e reconhecimento, respectivamente, estas são cruciais no destino deste arcabouço (73). Por ser uma estrutura dinâmica, o granuloma apresenta a renovação de grupos celulares constantemente, no qual 10-80% das células de seu interior são substituídas no intervalo de uma semana (74). Schreiber e colaboradores observaram que DCs possuem uma taxa de 50% de renovação no granuloma após uma semana (75). De interesse, as DCs possuem a capacidade de migrar do sítio de infecção granulomatosa para os linfonodos, recrutando constantemente linfócitos T para reestruturação do granuloma, tanto em um cenário agudo, quanto no crônico (75).

Uma vez que o indivíduo adquire TB ativa, este pode possuir inúmeros granulomas incapazes de conter a infecção (71). Isso se deve ao fato de DCs infectadas carregarem a micobactéria para o sítio exterior de um granuloma, com estas células entrando em contato com linfócitos antígeno-específicos (71). Por sua vez, estes induzem a disseminação da inflamação granulomatosa, podendo acarretar a formação de mais granulomas (71). Através de uma resposta pró-inflamatória exacerbada e descontrolada, pode haver ainda a dissolução da estrutura do granuloma, liquefação do centro caseoso e, por sua vez, a disseminação do bacilo no parênquima pulmonar ou para outros órgãos, causando aumento da inflamação e injúria tecidual (65, 76) e iniciando a formação de novos

granulomas (Figura 7). Cada granuloma possui características inflamatórias únicas, quantidade peculiar de células, padrões distintos de citocinas, carga bacilar e capacidade de contenção de bacilos, tudo em um único hospedeiro (69). Essas características estão relacionados à capacidade de resposta imune do hospedeiro, ditando assim, o sucesso ou não da formação e contenção do granuloma (69, 70).

A infecção pelo Mtb pode ocasionar doença ativa, sintomática, ou latente, assintomática (44). Nesta última, o indivíduo não apresenta manifestações clínicas típicas da TB, porém ainda possui a capacidade de disseminar o bacilo, em uma proporção menor quando indivíduos com a doença ativa (44, 77). Na forma de LTBI, com o Mtb dormente dentro do granuloma, o indivíduo possui uma reatividade forte aos antígenos micobacterianos, seja pelos testes cutâneo do PPD ou pelo IGRA (44, 77). Mundialmente, a LTBI engloba cerca de 90% das infecções por TB, em que os indivíduos têm sucesso na contenção da infecção, mas não na eliminação do bacilo (77). Entretanto, cerca de 10% daqueles com LTBI têm chances de reativação da doença ao longo dos anos. Estes indivíduos que possuem LTBI são caracterizados como reservatórios de disseminação da infecção por Mtb (44, 65).

Indivíduos que possuem a LTBI podem vir a ter baixas chances de desenvolver novamente a TB, ou ter a infecção eliminada por completo através da imunidade esterilizante, ambos relacionados com o sucesso de manter o centro do granuloma em estado de hipóxia (44, 78). Entretanto, aqueles mecanismos que propiciam aos indivíduos com LTBI a reativação ou não desta enfermidade ainda não estão bem elucidados (77).

Aquelas comorbidades já anteriormente destacadas, podem propiciar a progressão de indivíduos com LTBI para TB ativa (27). Outras comorbidades podem levar as alterações do sistema imune do hospedeiro, sendo elas cânceres, medicação imunossupressora, infecções helmínticas e doenças pulmonares obstrutivas crônicas (48, 79). Em adendo, os pacientes HIV-positivos com LTBI possuem as maiores chances desenvolver a TB ativa (64, 80). Assim, o HIV é a principal comorbidade relacionada ao desenvolvimento de TB, devido à depleção ou má funcionalidade de linfócitos T do hospedeiro, no qual o sistema imune por sua vez, se encontra prejudicado para responder eficientemente ao Mtb (64, 80). Por consequência, a estrutura celular do granuloma é desfeita, e o bacilo ganha novamente a sua capacidade de se replicar e infectar novas células, levando o indivíduo a desenvolver sintomas e sinais clínicos de TB ativa (44). Para piorar este

cenário, junta-se a capacidade de disseminar novamente o Mtb no meio ambiente, podendo infectar potencialmente novos hospedeiros (66).

1.1.7 Imunopatogenia

Uma vez que macrófagos alveolares são o primeiro grupo celular da resposta imune a ter contato direto com o Mtb nos alvéolos pulmonares, eles desempenham um papel crucial na tentativa de se evitar que seja estabelecida a infecção primária nos pulmões (81). Através de PAMPs do Mtb, como glicoproteínas, carboidratos, dentre outras moléculas reconhecidas por PRRs, como TLRs, receptores do tipo Lectina-C (CLRs) e receptores do tipo Nod (NLRs), acredita-se que se estabeleça o reconhecimento primário deste patógeno (81).

Dentre os CLRs em macrófagos, pode se evidenciar receptores de manose, que reconhecem estruturas do Mtb, como LAM e LAM manosilado (ManLAM) (82). Este receptor está associado à sobrevivência do Mtb, uma vez que sua ligação a ManLAM está envolvida na ausência da fusão do fagossomo com o lisossomo, propiciando a persistência do patógeno (83). Em contrapartida, a ausência de CLRs culmina em macrófagos mais propensos à infecção, e consequente sobrevivência do bacilo (84-86). O CLR Mincle também é expresso na superfície de macrófagos; este reconhecendo a estrutura TDM presente na parede do Mtb (15). Já os NLRs são responsáveis por reconhecer peptidoglicanos, tendo sido evidenciado que macrófagos alveolares ativado por NOD-2 apresentam controle de crescimento bacteriano. O TLR2 também reconhece componentes micobacterianos, como ManLam, LAM, peptideoglicanos e lipoproteínas, enquanto que o TLR4 é ativado pela proteína de choque térmico hsp65, secretada pelo Mtb (87, 88). De um modo ou de outro, este cenário leva à expressão de NO, IL-1 β , IL-12 e TNF- α , através do fator de transcrição NF- κ B (89-91).

Uma vez que os PAMPs são reconhecidos pelos macrófagos alveolares, uma série de mediadores pró-inflamatórios são secretados, como IL-1 β , IL-1 α , IL-12, IFN- γ , TNF- α e MIP-1 α /CCL3, recrutando mais leucócitos para o sítio de inflamação (81). Estas moléculas são cruciais para o controle da infecção pelo Mtb durante o estabelecimento da resposta imune adquirida (81). Como já dito, a expressão de TNF é crucial para a manutenção do granuloma (92) e pode induzir a expressão de NO e ROS, duas moléculas com propriedade microbicidas capazes de matar o bacilo (92). O IFN- γ secretado por macrófagos no sítio de inflamação está relacionado à indução de iNOS (93). Porém, este último tem a capacidade de

suprimir a secreção de IL-1 β e IL-1 α , bem como estimular a produção de IL-10 em macrófagos vizinhos. Isto se caracteriza em uma tentativa de não induzir uma inflamação excessiva, que também se traduz em um mecanismo de escape deste patógeno (94).

Lastrucci e colaboradores demonstram que macrófagos humanos diferenciados *in vitro* de monócitos CD16+ de pacientes com TB possuem propensão espontânea de gerar um fenótipo anti-inflamatório M2, influenciando negativamente a resposta imune contra o patógeno (95). Inclusive, o Mtb apresenta em sua parede celular um glicolípido fenólico que induz macrófagos residentes do pulmão a secretarem CCL2, assim atraindo monócitos CCR2+ com fenótipo M2 para o sítio de infecção (96). Neste processo, ocorre a transferência bacteriana, culminando na sobrevivência, replicação e disseminação do bacilo (96), e os monócitos CCR2+ serão importantes para translocar bacilos até linfonodos, sem realizar a apresentação antigênica (96). Naquele nicho, as DCs irão realizar a absorção do bacilo e apresentar epítomos do Mtb para células T CD4, evidenciando assim uma complexa rede de interações que visa uma ótima apresentação antigênica (97). Por outro lado, o Mtb possui a capacidade de reduzir a expressão de MHC de classe II (MHC-II) em macrófagos, através da lipoproteína 19-kDa ligante do TLR2, reduzindo assim esta apresentação antigênica (98).

Outros componentes da parede celular do Mtb, como ácido micólico, arabinogalactanos e peptidoglicanos, são reconhecidos por receptores de citotoxicidade natural de células *Natural Killers* (NK), como o NKp44 e TLR2. Desta forma, células NK, que reconhecem essa gama de compostos, tornam-se ativadas e secretam IFN- γ , adquirindo a capacidade de lisar células infectadas com o bacilo (99). Células NK são capazes de ativar macrófagos via secreção de grânulos contendo granzimas e perforinas (81). Durante a infecção do Mtb, neutrófilos também são atraídos para o sítio de infecção nos pulmões a partir de CXCL5, um ligante de CXCR2 (100). Estas células são responsáveis por liberarem uma série de mediadores, como elastase, colagenase e mieloperoxidase, todos agindo contra o patógeno (101). Em neutrófilos, o CD73 limita o influxo destes aos sítios de infecções pulmonares, sem que haja um crescimento bacteriano efetivo (102). O Mtb também é capaz de induzir a necrose dos neutrófilos, através de um fator de virulência da região de diferença 1 (RD-1), gerando o acúmulo de Ca²⁺ e a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (103, 104).

Neutrófilos infectados por Mtb têm a capacidade de induzir a migração de DCs até os linfonodos (105). Uma vez realizada a depleção experimental de neutrófilos, ocorre um aumento progressivo de DCs infectadas por Mtb em pulmões de camundongos, que por sua vez, tem sua taxa de migração para os linfonodos prejudicadas, sugerindo que neutrófilos em processo de apoptose têm um papel fundamental na migração de DCs (105, 106). As DCs reconhecem alguns componentes da parede celular das micobactérias, como a lipoproteína *lprGe* e LAM, ambos pelo receptor *DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) (107, 108). Moléculas do Mtb, como PE27, uma proteína de membrana pertencente à família de proteínas *pp*, consistindo em aproximadamente 10% dos genes codificadores no genoma Mtb, é capazes de induzir a produção de uma série de mediadores pró-inflamatórios em DCs, como IL-12p70, TNF- α , IL-1 β e IL-23p19, todos gerando uma resposta imune adaptativa predominante para os perfis Th1 ou Th17 (109, 110). Novamente, como forma do Mtb evadir o sistema imune através de ManLam, observa-se a indução de IL-10 e a inibição de IL-12, prejudicando a maturação de DCs e a expressão de moléculas coestimulatórias (111).

As DCs possuem um papel fundamental na ativação da imunidade adaptativa, uma vez que são as principais APCs profissionais do sistema imune (45). Esse grupo celular apresenta marcadores, como CD80, CD86, MHC-II e CD11c, relacionados à ativação da imunidade adaptativa e ao controle bacteriano (112). A depleção de DCs CD11c+ prejudica a ativação de células T CD4 durante a infecção por Mtb (112). DCs localizadas no pulmão apresentam elevada expressão de CD11c, e vários níveis de expressão de CD103 após a infecção pelo Mtb (94). As DCs ativadas estão localizadas no parênquima pulmonar em maior concentração, quando comparadas à vasculatura pulmonar (113). As mesmas produzem IL-1 α , TNF- α , IL-1 β , IL-12 e iNOS em franca resposta ao bacilo (94, 106).

DCs maduras migram para os linfonodos através de CCR7, que reconhece o gradiente quimiotático de CCL19 e CCL21 e assim como na presença de IL-12, auxiliam na migração deste grupo celular (62, 114). O Mtb reduz a expressão do gene associado a migração de DCs ASAP1, gerando uma apresentação antigênica deficiente por estas células (115). Hava e colaboradores observaram que o Mtb possui uma notável capacidade de induzir uma expressão rápida de MHC-II, antes dos antígenos do bacilo serem processados pelas DCs (116). Em um evento subsequente, ocorre a interrupção da síntese *de novo* de novas moléculas de MHC-

II, limitando o carreamento de antígenos extracelulares a para apresentação antigênica, assim gerando um processo de maturação mal coordenado (116). Entretanto, as DCs são capazes de realizar alternativamente a apresentação antigênica de compostos lipídicos desta micobacteria via CD1 (116). Como maneira de otimizar a apresentação antigênica nos linfonodos, as DCs secretam antígenos não processados deste patógeno, para serem fagocitados por DCs residentes naqueles nichos, assim potencializando a ativação de células T CD4 *naive* (117).

O Mtb é capaz de gerar o extravasamento do conteúdo do fagolisossomo, via inserção das proteínas ESAT-6 e o CFP-10 na membrana da organela. Por esta razão, estes antígenos imunodominantes entram na via citosólica da apresentação antigênica, sendo carregados em moléculas de MHC de classe I (MHC-I) para serem reconhecidos por linfócitos T CD8 (118). As proteínas da família PE-PGRS do Mtb suprimem a ativação de MHC-I, pois atuam na inibição da degradação de compostos ubiquitinados pelo proteassoma e, conseqüentemente, reduzem a geração de peptídeos antigênicos (119).

Células T CD4 interagem com macrófagos infectados pelo Mtb no sítio de infecção, no intuito de conter a disseminação do bacilo (106). Diferentes populações de células T CD4 expressando o CXCR3 agem para o controle da infecção, possuindo a capacidade de migrar para os parênquimas pulmonares rapidamente (106, 120). Da mesma forma, estas possuem alta capacidade de replicação, expressando CD69 e PD-1. Outros linfócitos T CD4 expressam o CX3CR1 e se localizam na região intravascular pulmonar, apresentando altos níveis de marcadores, como o KLRG1 expressos em células NK, o que indica fenótipo diferenciado terminal ou senescente (120). Em particular, este último grupo celular apesar de produzir quantidades elevadas de IFN- γ , possuem pouca capacidade de migrar para o parênquima pulmonar, reduzindo assim sua capacidade protetiva contra o Mtb (120). Células exercendo migração para os parênquimas pulmonares possuem função mais relevante no controle da carga bacteriana e da disseminação do patógeno, do que as células que são apenas secretoras de IFN- γ na região intravascular pulmonar (64, 106, 120).

Os linfócitos do tipo Th17 desempenham um papel importante em conjunto com aqueles do perfil Th1 no controle do Mtb, pois a ausência de IL-17 promove o aumento da carga bacteriana (121). O perfil Th17 é diferenciado na presença de IL-6, IL-1 β e IL-17, e mantido na presença de IL-23 (122). Este perfil está relacionado ao recrutamento de células do tipo Th1 e neutrófilos para os granulomas com nível

de hipoxia reduzido e para a formação de folículos de células B em infecções tardias (123-126).

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada e controlada, gerando pouca injúria tecidual e relacionado à apresentação antigênica eficiente (45). A apoptose pode ser ativada pela via extrínseca, em que ligantes, como TNF e FAS/CD95, irão iniciar a cascata de apoptose, ou pela via intrínseca, ativada pela mitocôndria (81). Entretanto, o Mtb possui mecanismos de evasão da apoptose, gerando morte celular por necrose, em decorrência de antígenos anti-apoptóticos como PtpA e NuoG, beneficiando a disseminação desta micobactéria (127, 128).

Ao longo da infecção pelo Mtb, NLRs, como o NLRP3 e AIM2, são ativados formando um complexo multiproteico denominado inflamassoma, responsável pela ativação de caspase-1, culminando na geração de IL-1 β e IL-18 bioativas (81). Todavia, o Mtb é capaz de modular negativamente a ativação do inflamassoma, através de proteínas secretadas, como a Zmp1, sendo está relacionada a inibição da ativação da via de caspase-1, conseqüentemente, impedindo a secreção de IL-1 β e IL-18 (129). Estudos evidenciaram que a infecção de macrófagos por Mtb deletado do gene Zmp1, foi capaz de ativar o inflamassoma e conseqüentemente, secretar IL-1 β e IL-18, gerando um maior nível de maturação do fagossomo e redução de carga bacteriana (129).

O Mtb possui uma proteína secretora denominada metiltransferase de DNA (ou Rv2966c) que interage com histonas do genoma do hospedeiro, reorganizando o material genético (130). Assim, este mecanismo interfere na ação protetiva de genes do hospedeiro que codificam moléculas inatas, como a proteína C-reativa, relacionada a ativação do complemento e reconhecimento de patógenos (130). O Mtb também é capaz de subverter a resposta imune do hospedeiro ao seu favor, induzindo a produção de miR99b e miR-125a, estes capazes de inibir a síntese de TNF, maturação do fagolisossomo e produção de moléculas antimicrobianas (57). Em contrapartida, o Mtb induz a produção de miR-223, levando a síntese de CXCL2, CCL3 e IL-6, estas benéficas para o hospedeiro na resposta imune contra o patógeno (57).

Assim, patógenos como o Mtb possuem a fantástica capacidade de evadir o sistema imune de diversas formas, caracterizando sua alta virulência, promovendo sua disseminação pelo hospedeiro e sucesso na infecção. Isso seria um reflexo dos milhares de anos da coevolução patógeno-hospedeiro, ambos se adequando aos diversos mecanismos de escape e defesa mutuamente (4, 98).

1.2 A vacina BCG

A vacina BCG é um imunizante secular que contém um patógeno vivo atenuado, originado de uma cepa selvagem de *M. bovis* (131). Atualmente, esta é a única vacina licenciada e utilizada amplamente ao redor do globo no combate à TB (27). A vacina BCG é preconizada no calendário de vacinação infantil do Programa Nacional de Imunização (33). Esta corresponde ao imunógeno mais amplamente disseminado e aplicado no mundo, apresentando uma boa relação custo-eficácia no processo de prevenção das formas disseminadas e graves da TB em crianças (27).

1.2.1 Histórico da vacina BCG

Em 1900, a TB era responsável por inúmeras mortes. Os franceses Léon Charles Albert Calmette e Jean-Marie Camille Guérin do Instituto Pasteur em Lille, na França, em uma tentativa audaz de frear a disseminação desta enfermidade na Europa, iniciaram o desenvolvimento desta vacina (Figura 8).



Figura 8: Fotografia de aspectos históricos no museu do Instituto Pasteur de Lille, França.
Fonte: Acervo particular do orientador.

Primordialmente, o cultivo da cepa selvagem de *M. bovis* foi realizado em meio de cultura contendo glicerina e batata, sendo a bile de boi adicionada mais tardiamente (131). Este novo método proporcionava uma cultura mais homogênea e desprovida de agregados entre os bacilos presentes na cultura (131). Por sua vez, este composto foi responsável por reduzir a virulência bacteriana, sendo o primeiro passo para o desenvolvimento de uma vacina contra a TB, a partir de um organismo vivo atenuado (131).

Em 1908, foi iniciado o cultivo desta cepa de *M. bovis* causadora de TB em bovinos (>90% de homologia ao Mtb) (132). Em 1913, Calmette e Guérin planejavam iniciar os ensaios de vacinação em gado. Porém, com o surgimento da Primeira Guerra Mundial, os ensaios foram suspensos. Todavia, apesar da ocupação alemã em Lille, o cultivo do *M. bovis* perdurou (131). Em 1919, após 230 subculturas realizadas ao longo de 13 anos, Calmette e Guérin obtiveram uma micobactéria atenuada e desprovida da capacidade de causar TB em animais, como cavalo, gado, coelho ou porquinho-da-índia (131). Com isso, o nome deste imunógeno foi batizado de Bacilo de Calmette e Guérin Bilie, em que tempos depois, o nome Bilie foi omitido, dando origem ao nome atual da vacina BCG (131).

Na Paris de 1921, foi iniciado o primeiro estudo da vacina BCG em humanos. Após o parto, uma mulher foi a óbito por complicações da TB, mas sua criança sadia foi vacinada com uma dose da vacina BCG pela via oral, sem que sequelas fossem observadas após a vacinação. A rota oral foi eleita por Calmette, levando-se em consideração a via natural de infecção pelo *M. bovis* (131). A partir de 1924, milhares de crianças também foram vacinadas e a BCG começou a ser produzida em larga escala, sendo adotada por diversos países europeus, como Espanha e Noruega (131).

Uma vez que a vacina BCG fora distribuída pelo Instituto Pasteur de Paris ao redor do globo, esta foi submetida a diferentes métodos de cultivo variando a sua manufatura e seguindo passagens em tempos distintos, assim culminando em diferentes características microbiológicas, fenotípicas e genotípicas (133). Uma vez que não existiram normas padronizadas por agências reguladoras, houve o surgimento de diferentes subcepas parentais, apresentando diferentes padrões de viabilidade, perfis imunogênicos, reatogenicidade e virulência residual (131, 134). Em 1974, a OMS passou a recomendar que todos os países que produzissem a vacina BCG utilizassem o sistema de controle de qualidade internacional para

minimizar essas diferenças (135). Neste momento, notou-se o embrião de um serviço de controle de qualidade competente e público, com requerimentos para produção da vacina BCG liofilizada, assim como a implantação do sistema de lote-semente (135). Este sistema tinha como finalidade manter um número mínimo de centros de produção e controle da vacina BCG, no intuito de minimizar a geração de novas subcepas, objetivando a padronização dos sistemas produtivos e de controle de qualidade destes imunógenos (135).

1.2.2 Diversidades de cepas da vacina BCG

Todas as cepas atuais da vacina BCG foram derivadas a partir de uma cepa única, denominada Pasteur original (131). Ao longo das diversas passagens seriadas realizadas para obter um patógeno vivo atenuado, houve uma importante deleção da RD-1 no genoma da micobactéria; está crucial para manter a virulência do *M. bovis* (131). Como já dito, a RD-1 codifica proteínas imunodominantes que fazem parte do sistema de secreção ESX-1, como ESAT-6 e CPF-10 (132). Estudos demonstraram que a vacina BCG recombinante com o fragmento deletado do gene RD-1 reinserido em seu genoma, possui um aumento da imunogenicidade, assim como da virulência, entretanto, não é observado aquisição de virulência em sua totalidade. Assim, sugere-se que outros fatores genéticos também influenciam no resultado obtido (132, 136).

As primeiras repartições das cepas filhas obtidas a partir da cepa Pasteur original foram a BCG Russa, obtida em 1924; a cepa BCG Moreau e BCG Tokyo, em 1925; BCG Sweden, em 1926, e a BCG Birkhaug em 1927 (133). Inicialmente, as cepas de BCG foram classificadas e, depois, agrupadas, segundo um padrão característico (133, 137). Via de regra, as três cepas mais antigas e próximas da cepa Pasteur original possuem a RD-2 intacta em seu genoma (133). Por sua vez e dentre estas do Grupo-I, a BCG Moreau apresenta a RD-16 ausente (137). Após 1927, surgiram as cepas de BCG recentes dos Grupos-II a IV, como a BCG Glaxo, BCG Praga e BCG Dinamarquesa (133). Com o passar dos anos, mais de 24 subcepas surgiram e são utilizadas nas campanhas de vacinação em diferentes partes do globo (133, 138).

As cepas são divididas segundo os tandem de duplicação (DU), caracterizados por apresentarem duplicações cromossômicas, em que estas novas regiões podem sofrer mutações, uma vez que as funções básicas são providas pela

outra cópia, gerando, assim, novos fenótipos, e por sua vez, diferentes DUs (139) (Figura 9).

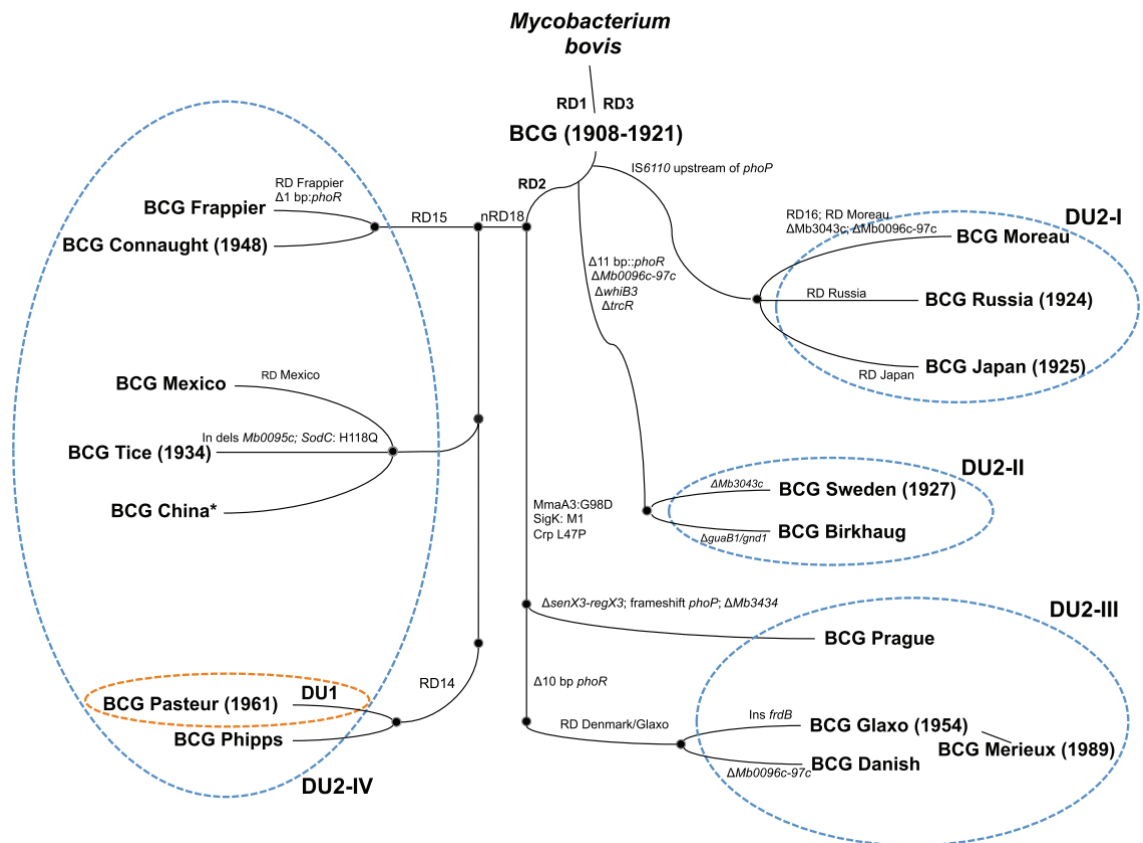


Figura 9: Genealogia das cepas da vacina BCG ao longo dos anos, evidenciando suas Regiões de Deleção (RD) e os grupos identificados com os Tandem de Duplicação (DU).

Fonte: adaptado de (138, 140)

As principais cepas dos lotes-semente utilizadas na atualidade são a BCG Moreau, BCG Dinamarquesa, BCG Glaxo (derivada da BCG Dinamarquesa) e a BCG Pasteur 1173 P2 (cepa liofilizada em 1961, após 1.173 passagens) (133). As vacinas BCG do grupo-I apresentam expressão de antígenos, como MPB64, MPB70 e MPB83, sendo caracterizados como o grupo mais imunogênico. Devido à mutação no gene *SigK*, as cepas BCG dos grupos-II a IV não apresentam esses antígenos supracitados (135, 140, 141). Outros genes, como IS6110, estão presentes em um grupo seletivo de cepas de BCG (DU2-I) e, este gene, possui a região promotora de componentes, como *phoP-phoR*, gerando moléculas imunogênicas, porém ausentes nas demais cepas de BCG (133, 140). Ao longo dos anos, foram evidenciadas outras modificações genéticas nas atuais cepas de BCG, quando comparadas com a cultura Pasteur original, como outras RD e polimorfismos de nucleotídeo único, assim como sequências de inserção e deleção gênicas (133).

As culturas dessas diferentes cepas de BCG ao redor do mundo, propiciaram a aquisição das diferentes características quanto a sua viabilidade, virulência, imunogenicidade e efeitos heterólogos (142). Angelidou e colaboradores compararam as cepas BCG Dinamarquesa, Japonesa, Indiana, Búlgara e Tice, quanto à seu crescimento e resposta imune (142). Assim, as cepas apresentaram diferenças quanto a capacidade de crescimentos em meios de cultura específicos, como 7H9 e 7H11, integridade de parede celular, assim como concentração de RNA (142). Os autores destacaram que a quantidade de colônias viáveis, quantificadas através do CFU, está relacionada com a capacidade de indução de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e G-CSF (142). Em nosso grupo, nós também já evidenciamos diferentes perfis de imunomodulação entre cepas de BCG, comparando BCG Moreau, Dinamarquesa e Pasteur (143), e mais recentemente, a BCG Rússia (144). A BCG Moreau foi capaz de induzir níveis de apoptose elevados em monócitos humanos, quando comparado às demais cepas de BCG em amostras de adultos saudáveis e de cordão umbilical de recém-natos (143). Além disso, a BCG Moreau foi capaz de induzir níveis elevados de citocinas do perfil Th1, como IL-2, TNF- α , GM-CSF e IFN- γ em adultos saudáveis. No entanto, não se encontrou diferenças naquele grupo de amostras de neonatos (143). Em resumo, as diferentes características das cepas da vacina BCG têm o potencial de estimular diferencialmente o sistema imune, sendo este mecanismo potencial para induzir diferentes padrões de proteção relacionados à TB.

1.2.3 A vacina BCG no Brasil

Em 1925, a cepa BCG Moreau chegou ao Brasil após uma viagem atribulada e pouco conhecida, a partir da distribuição mundial feita pelo Instituto Pasteur de Paris (137). Esta cepa foi trazida pelo uruguaio Dr. Júlio Elvio Moreau e deixada sob os cuidados do baiano Dr. Arlindo Raimundo de Assis, no Rio de Janeiro (137). Até 1930, a vacina BCG foi produzida pelo Instituto Vital Brasil, em Niterói (137). Após, houve um convite feito pelo ministro Aaulpho de Paiva para que a produção e experimentos envolvendo a vacina BCG Moreau fossem desenvolvidos pela Liga Brasileira de Combate à TB, atual Fundação Aaulpho de Paiva (FAP). Até o ano de 2017, a FAP desempenhou um papel fundamental na produção e distribuição da vacina BCG Moreau em território nacional, sendo responsável por 5% da produção mundial deste imunógeno, atualmente o país utiliza a cepa BCG russa (137).

Em 1929, o Brasil realizou a vacinação em recém-nascidos com três doses em dias alternados. De 1945 a 1946, Dr. Arlindo de Assis estabeleceu a vacinação recorrente da BCG, em que o recém-nascido era imunizado com uma dose por mês, durante seis meses (137). A racional deste esquema vacinal estaria atrelada principalmente à prevenção de doença nos indivíduos contactantes de pacientes com TB ativa (137). Entretanto, a aplicabilidade deste esquema era falha no âmbito nacional, devido à dificuldade de acompanhamento e repetição das doses de maneira efetiva. A partir de 1947, foi estipulada a imunização de recém-nascidos com apenas uma dose da vacina BCG Moreau por via oral (137).

No Brasil, a via oral foi utilizada até 1968, quando a via intradérmica (ID) foi introduzida. Esta mudança também pode ser explicada pelo acidente ocorrido em Lübeck, na Alemanha (131). Neste triste episódio de 1930, tanto o Dr. Georg Deycke, quanto o Dr. Ernst Altstaedt, foram responsabilizados por vacinarem por via oral e erroneamente, 256 recém-nascidos com uma cepa de Mtb, levando ao óbito 75 destes (131). Da mesma forma, a alegada ausência de resposta imune ao PPD pelo teste cutâneo quando se administra o BCG pela via oral, quando comparada a aplicação pela via ID, fez com que a vacina BCG seja utilizada, desde então, via ID de maneira empírica, sem ensaios clínicos adequados (137).

1.2.4 Eficácia da vacina BCG

Desde o início dos ensaios clínicos, vem sendo proposto que a proteção fornecida pela vacina BCG é limitada (132). Este imunógeno é responsável por proteger crianças contra as formas disseminadas e graves da TB, como a meningite e a miliar. A vacina BCG pode gerar proteção parcial contra a TB pulmonar, variando entre 0 a 80% em crianças. Porém, a mesma falha em conferir esta mesma proteção em adultos (132, 134). Uma hipótese para esta possível falha envolve o estímulo insuficiente das células T CD8 e a duração restrita da memória imunológica (145, 146). Isto poderia ser devido a um estado inadequado de ativação de DCs e de mecanismos de evasão explorados pelo patógeno. Em adição, a persistência contínua da vacina BCG no organismo, após a imunização, poderia induzir anergia ou o esgotamento da resposta imune das células T (147).

A imunidade contra a TB conferida pela vacina BCG se reduz ao longo dos anos (148). A perda da imunidade pode ser explicada pelo contato do indivíduo com NTM, as quais podem gerar uma imunidade prévia, mascarando o efeito da vacina (148). Por conta desse fator, adultos vacinados com o BCG e que foram expostos

anteriormente às NTM, possuem uma resposta imune deficiente aos antígenos vacinais, quando comparados às crianças que ainda não foram expostas ou aos adultos habitantes de países de altas latitudes (132, 148). O contato com NTM previamente a esta vacinação pode inibir a replicação do BCG, devida à existência de uma resposta imune protetora já pré-estabelecida. A replicação do *M. bovis* seria um pré-requisito para o desenvolvimento de uma memória imunológica adequada (149). Além das hipóteses supracitadas, outros fatores mutualmente exclusivos também podem influenciar na geração de imunidade contra a TB, como a variabilidade genética e bioquímica das diferentes cepas, a rota de administração, a dose, a desnutrição, dentre outros (141).

Além da imunidade gerada contra a TB, a vacina BCG induz uma imunidade heteróloga ou fora do alvo, já tendo sido caracterizada por ser uma imunidade inespecífica. A vacina BCG pode prevenir pneumonia, reduzindo o risco de morte por esta enfermidade (150). A mesma também é capaz de gerar imunidade treinada, um tipo de memória imunológica inata, através de reprogramação epigenética, conferindo efeitos benéficos contra patógenos virais, como o SARS-CoV-2 (151). A vacina BCG também é utilizada nos tratamentos para diabetes, asma e esclerose múltipla, assim como também faz parte do processo de imunoterapia para câncer de bexiga, sendo um adjuvante padrão-ouro (152, 153).

1.2.5 Imunologia da vacina BCG

Uma vez realizada a aplicação pela via ID da vacina BCG na região deltóide direita, células residentes da epiderme, como macrófagos e neutrófilos, são recrutadas para o sítio de inoculação (154). Os neutrófilos são os primeiros fagócitos a migrarem para o local, em que, uma vez em contato com a vacina BCG, aumentam sua capacidade de adesão através da modulação de integrinas CD11b e CD18, assim como também aumentam a secreção de IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TGF- β e CCL2 (154). Este último evento acarreta na atração de monócitos para sítio de aplicação da vacina, culminado na diferenciação destes em macrófagos, além de recrutar macrófagos residentes, primando fagócitos de vida longa (154). Uma vez que os neutrófilos recrutem para este sítio fagócitos de vida longa, estes irão reconhecer o imunógeno através de PRRs, como TLR2 ou 4, que, subsequentemente, secretarão mediadores pro-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, e induzirão a proliferação de linfócitos do tipo Th1, ativando a capacidade microbicida dos macrófagos (155).

Os neutrófilos possuem a capacidade de fagocitar o BCG e migrar até os linfonodos, uma vez que estes apresentam CCR7 (156). Lá, as DCs serão capazes de fagocitar esses neutrófilos e, por apresentação cruzada, ativar linfócitos T de modo mais eficiente (154). Isto ocorre, pois aqueles neutrófilos migrantes irão possuir um retardamento no processo de apoptose espontânea, aumentando a ativação de vias relacionadas ao processo de apresentação antigênica. Portanto, os neutrófilos possuem um papel importante no estabelecimento da resposta imune adaptativa frente à vacinação com BCG (154).

As DCs são capazes de reconhecer PAMPS através de diversas moléculas, como CD11b, CD11c, TLR2, TLR4 e CD209 (45). O CD209 é crucial na resposta imune frente a este imunógeno, pois o bloqueio deste leva a uma redução de interação de DCs com o BCG (157). Uma vez que este reconhecimento seja realizado, as DCs se tornam maduras e apresentam um serie de marcadores de ativação, como CD80, CD86, CD40 e MHC-II (157). Por suas vezes, essas DCs maduras secretam IL-1 β , TNF- α e IL-6, polarizando a resposta imune para um perfil pro-inflamatório (45).

De maneira resumida, dois tipos principais de linfócitos T serão primados nos linfonodos: T CD8 e T CD4. Os linfócitos T CD8 apresentam um papel fundamental no controle da carga bacteriana, seja pela ação da degranulação de proteínas citotóxicas e produção de IFN- γ , bem como pela capacidade de induzir apoptose de células infectadas via FasL-Fas (158). Nesta última, células vizinhas serão capazes de eferocitose e procederem na apresentação cruzada, uma maneira mais efetiva de estimular esta imunidade adaptativa (157, 158). Já os linfócitos T CD4, uma vez ativados, podem adquirir perfis Th1 e Th17, estes cruciais em auxiliar na contenção de uma futura infecção por micobactérias. De interesse, a IL-17A ainda possui um papel importante para sustentar a produção de IFN- γ (157). Destarte, outros perfis de linfócitos T podem ainda ser induzidos pela vacina BCG, como linfócitos T regulatórios e CD1-restritos (157).

A vacina BCG é capaz de induzir a produção de anticorpos por células B. Porém, uma vez que o Mtb é um patógeno intracelular, estas ações humorais de caráter vacinal podem ser limitadas (157). Entre 4 e 8 semanas, a vacina BCG é capaz de induzir a secreção de IgM, IgG e IgA (159). Tanto IgM, quanto IgG, são responsáveis pela opsonização do patógeno, impedindo assim que este infecte células quando em ambiente extracelular. Já IgA e IgG são capazes de aumentar a fagocitose de micróbios e medeiam o efeito citotóxico de células T efectoras (157,

159). Após a resposta imune induzida pela vacina BCG, linfócitos B de memória e de vida longa são gerados para combater a infecção mais rapidamente, auxiliando em uma futura infecção por Mtb via anticorpos específicos produzidos de maneira precoce (159).

O BCG morto ainda possui a capacidade de induzir protetividade, mesmo perdendo uma de suas principais características de patógeno vivo atenuado (160). A vacina BCG inativada por irradiação γ foi utilizada como reforço, sendo capaz de promover resposta imune em modelos murinos (160). Através da ativação de linfócitos do tipo Th1, um aumento de proteção foi observado após o desafio com a cepa virulenta HN878 do Mtb (160). A vacina BCG está relacionada à indução de imunidade treinada, em que células da imunidade inata sofrem reprogramações epigenéticas, assim como à respostas contra patógenos não relacionados, evento conhecido como imunidade heteróloga (161). Os monócitos previamente expostos a mesma vacina BCG inativada também foram capazes de secretar IL-6 e TNF- α uma semana após o contato com o imunógeno, via re-estímulo com LPS (162). Ademais, estes monócitos sofreram metilações de histonas na região promotora H3K4, evidenciando assim a imunidade treinada (162). Este mesmo BCG também foi capaz de induzir IL-17, IFN- γ e IL-22, na presença de patógenos, como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, demonstrando o efeito heterólogo da vacina BCG (162).

Adicionalmente, a vacina BCG inativada por calor também foi capaz de ativar o sistema imune, sendo neste caso, um aumento de expressão de TNF- α e IL-10 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (163). Este método de inativização da vacina BCG ainda pareceu induzir resposta imune em macrófagos derivados da linhagem celular da leucemia monocítica aguda humana THP1, com a secreção de IL-6, IL-1 β , TNF- α , MIP-1 α e MIP-1 β (164). A mesma formulação também foi capaz de ativar células NK CD56⁺, induzindo ação antitumoral contra células de câncer de bexiga através da liberação de grânulos (165). Ademais, este BCG também foi capaz de reverter uma reação de hipersensibilidade imediata ou do tipo-I experimental, com redução importante e concomitante da eosinofilia e de IL-5, com aumento de níveis de IFN- γ (166). Esta formulação quando combinada com adjuvante, como L3 Eurocina, foi capaz de gerar imunidade protetora ao nível de célula T e no mesmo patamar que a vacina BCG viva, possuindo ainda a capacidade de induzir IFN- γ , assim como a presença de IgG (167). As DCs, quando em contato com aquela formulação, foram capazes de secretar TNF- α , MCP-1, RANTES e IL-1 β (168). No caso do mesmo sistema, agora em co-cultura com linfócitos T autólogos,

observou-se a capacidade ímpar de induzir a ativação destes últimos, estimulando aumento de ambos perfis Th1 e Th17 (168).

Além da vacina BCG, já foi demonstrado que *M. vaccae* e *M. obuense*, inativadas pelo calor, foram capazes de induzir repostas imunes protetoras através da expressão de TNF- α , IL-12 e IL-1 β por DCs convencionais (cDCs) (169). Por suas vezes, estas últimas foram capazes de induzir a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ secretores de IFN- γ e TNF- α , bem como granzima B (169).

Notoriamente, e mesmo sofrendo processos de inviabilização, a vacina BCG conserva características imunogênicas capazes de eliciar respostas imunes protetoras (170). Provavelmente, mesmo perdendo seu caráter replicativo, os constituintes da parede celular do BCG, como ácidos micólicos, arabinogalactanos e peptidoglicanos, ainda seriam capazes de ativar grupos de células imunes inatas, como as DCs, através da indução de marcadores de ativação, como CD80, CD40, CD86 e CD83, assim como secreção de IL-6, TNF- α e IL-12 p40 (170). Além disso, esses componentes também seriam capazes de induzir genes como IL-1 α , IL-8 e CCL20 (171). Assim, as micobactérias inativadas ainda seriam muito bons adjuvantes, sendo um excelente e clássico exemplo, o adjuvante completo de Freund (170).

Decerto, a inativação por irradiação γ preserva a atividade metabólica deste imunógeno, variando de 37% a 94%, enquanto a inativação por calor apresenta resquício mínimo, ou nenhuma atividade metabólica, dependendo da temperatura de exposição (172). Isso indica que embora perdendo sua capacidade de se replicar por conta da irradiação γ , o metabolismo da BCG continua ativo, sendo capaz de expressar proteínas funcionais. Através de microscopia eletrônica de transmissão, foi possível analisar diferenças importantes entre estes dois métodos acima (172). Como era de se esperar, a inativação por irradiação γ induziu poucas alterações morfológicas, mas a inativação por calor apresentou drásticas alterações, com células parcialmente rompidas (172). Mesmo sofrendo estes processos de inviabilização, Silvia e colaboradores, assim como Kato e colaboradores, demonstraram que este imunógeno foi capaz de inibir o crescimento da linhagem celular T24 (172, 173). Ademais, foi possível observar uma indução de citocinas pelo BCG inativado por calor, indicando a presença de antígenos termo-resistentes e imunogênicos nestas (172). Em contrapartida, o BCG inativado por irradiação γ possuiu a capacidade de induzir a secreção de IL-8, TNF- α e IL-6, em níveis próximos da vacina BCG viva (172).

1.3 As células dendríticas

Em 1973, Ralph Steinman e Zan Conh identificaram pela primeira vez um tipo de leucócito que possui alta heterogeneidade, sendo originado a partir da diferenciação hematopoiética de células da medula óssea (174, 175). Desde então, as DCs vem sendo estudadas, sendo que estas correspondem a cerca de 1% do número total de células do sangue venoso periférico (174). As DCs possuem um papel fundamental na resposta imune do hospedeiro, seja contra um agente infeccioso, ou no estabelecimento de tolerância, formando uma ponte entre as imunidades inata e adaptativa. Por este motivo, as DCs são caracterizadas como as principais APCs do sistema imune, assim sendo capazes de "educar" células T e B de modo antígeno-dependente (174). As DCs podem realizar apresentação antigênica, via CD1, MHC-I ou MHC-II (174). Esta apresentação por MHC-II se dá a partir da fagocitose de antígenos extracelulares, em que estes serão apresentados aos linfócitos T CD4 (45). Em contrapartida, a apresentação antigênica via MHC-I se dá a partir do processamento de antígenos citosólicos, que serão reconhecidos por linfócitos T CD8. Como já mencionado, a apresentação antigênica via CD1 envolve lipídeos e glicolipídios (45, 174).

1.3.1 Migração de células dendríticas

As DCs podem ser classificadas como células migratórias ou residentes do tecido (176). Estas células se encontram em diversos sítios anatômicos, como a pele, tonsilas, fígado, pulmões, linfonodos, dentre outros (45). As DCs apresentam diversas projeções em sua superfície denominadas dendritos, que dão origem ao seu nome, derivado da palavra grega *dendron*, significando árvore (175).

Em um estágio imaturo, essas células são sésseis e possuem grande capacidade fagocítica, através de reconhecimentos de PAMPs. Uma vez reconhecido o agente estranho, a DC se torna ativada, adquirindo capacidade de apresentação antigênica e de migração, através de MHC-II e CCR7, respectivamente (45). Uma vez que um patógeno seja fagocitado, as DCs expressam uma molécula de adesão relacionadas à migração, como a CLEC-2, que

se liga a glicoproteína podoplanina, presente nas células endoteliais linfáticas (177). As DCs possuem também a capacidade de polimerizar monômeros de actina, levando à formação de pseudópodes (178). Em contrapartida, e no lado oposto da célula, ocorre a contração celular dependente de miosina II (178). Deste modo, as DCs conseguem projetar a membrana plasmática a frente e migrar de maneira eficiente (178). O cálcio é caracterizado como um íon fundamental na contração miosina/actina, permitindo assim a migração adequada, na qual a carência deste pode impactar no deslocamento das DCs (179). Assim, uma vez que as DCs realizem a fagocitose, lisossomos em seu citoplasma liberam cálcio que por sua vez, ativa a miosina II, inibindo a capacidade fagocítica da célula e promovendo a capacidade migratória (179).

Desta maneira, DCs são capazes de migrar para os linfonodos, via vasos aferentes (180). Em modelos murinos, ao entrarem em contato com antígenos em tecidos periféricos, foi visto que a migração de DCs aos linfonodos pode levar de 18 a 24 horas (181). Já em um cenário de imunização, por conta do imunizante apresentar o antígeno já processado ou por conta da pressão induzida pela aplicação do imunógeno, a chegada das DCs aos linfonodos ocorre em cerca de minutos (181-183).

Ao serem conduzidas pelos vasos aferentes, as DCs são transportadas passivamente para o seio subcapsular, no interior dos linfonodos (45). Em um evento subsequente, as DCs chegam ao parênquima do linfonodo, graças à quimiotaxia do CCR7 e seus ligantes, onde irá entrar em contato com linfócitos T, localizados na região do paracortex do órgão (45, 184). Células endoteliais linfáticas expressam o ACKR4, que age de maneira antagônica ao CCL21 e CCL19, criando um fluxo contrário para estas células e assim, propiciando a chegada de DCs no paracortex dos linfócitos T (185). Os linfócitos T *naive* alcançam os linfonodos pelos seios medulares (184). Entretanto, uma vez que as DCs colonizam os linfonodos, essas propiciam alterações estruturais, permitindo a migração de linfócitos T *naive* pelos seios subcapsulares (184).

As DCs residentes nos linfonodos, podem mudar suas localizações com a finalidade de realizarem melhor apresentação antigênica aos linfócitos T e, assim, desencadear respostas imunes específicas de acordo com o patógeno, dispensando a presença de DCs migratórias (181). As DCs residentes do paracortex, mesmo tendo sua motilidade baixa, ao se depararem, por exemplo, com uma infecção por vírus da influenza, conseguem se reposicionar na medula aferente (181). De modo a

captar antígenos virais e induzir uma resposta imune celular de maneira precoce, as mesmas ativam linfócitos B de memória, através de linfócitos T foliculares auxiliares (Tfh) (181, 183). Assim, Levin e colaboradores evidenciaram a necessidade de DCs migratórias para a ativação de células Tfh e B, através da formação de centros germinativos a partir da imunização com partículas contendo a proteína p24 do HIV, evidenciando, dessa forma, que a natureza do patógeno irá requerer diferentes grupos de DCs (186).

1.3.2 Heterogeneidade de células dendríticas

As DCs são leucócitos de vida curta e numericamente limitadas a partir do momento em que se encontram nos tecidos linfóides periféricos, sendo desprovidos da capacidade de autorenovação (187). As DCs são originadas a partir de células precursoras da medula óssea CD34+ e sua diferenciação está intimamente relacionada com a citocina Flt3L (187). Em sua ausência, temos uma diminuição do número de DCs e, com a indução desta citocina, foi evidenciado um aumento das populações de DCs (174, 188).

A partir de estímulos específicos, as células CD34+ se diferenciam em progenitores mielóide e linfóide. Uma vez comprometidos com a linhagem mielóide, os precursores podem se diferenciar em pré-DCs e pré-monócitos, que estarão restritos apenas a diferenciação de DCs e monócitos, respectivamente (189). A partir do estímulo de Flt3L, as pré-DCs se diferenciam em progenitores comuns de DCs (CDPs), caracterizadas por serem as precursoras já comprometidas completamente na diferenciação de DCs (189). Finalmente, estas serão diferenciadas nos grupos de DCs convencionais (cDCs) ou de DCs plasmocitoides (pDCs) (189).

Atualmente, as DCs são uma família extremamente heterogênea, sendo dividida em diversos subtipos, de acordo com a expressão de marcadores co-estimulatórios. Os subtipos caracterizam (i) as células imaturas ou maduras; (ii) o perfil de citocinas secretadas; (iii) as funções desempenhadas por estas células e (iv) a característica de serem células residentes, as quais passam sua vida inteira nos linfonodos, ou terem a capacidade de migrar da periferia de órgãos não linfóides para os linfonodos (174, 187). As DCs são classificadas em cDCs (cDC1 e cDC2), pDCs, Células de Langerhans (LC) e DCs-derivadas de monócitos (moDCs), estas últimas conhecidas também como DCs inflamatórias (iDCs) (Figura 10) (174).

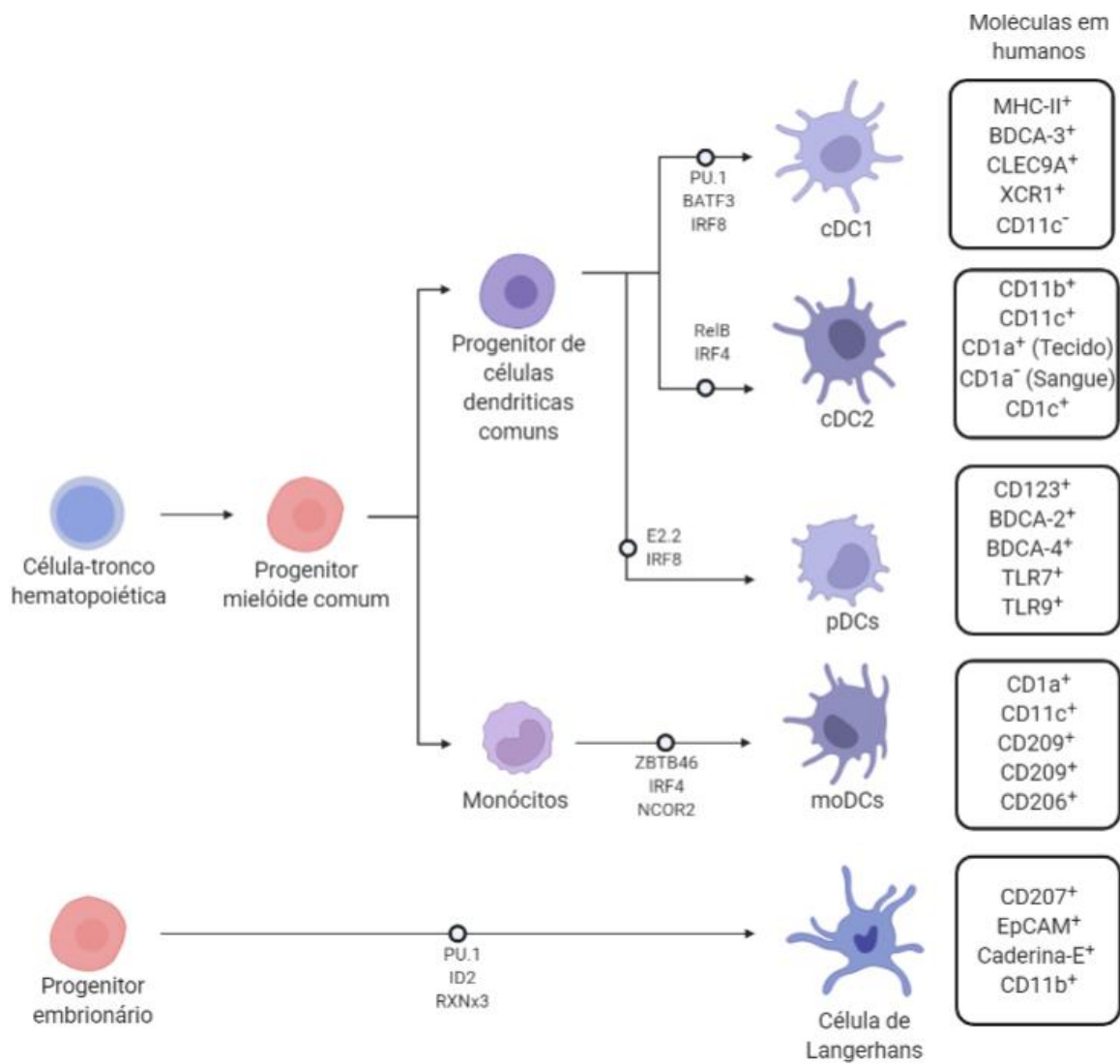


Figura 10: Principais subtipos de células dendríticas e linhagens de progenitores relacionadas em humanos.

Fonte: adaptado de (183, 187, 190). Criado em Biorender.

As cDC1s são um grupo minoritário, quando comparado com as cDC2s, correspondendo a cerca de 1/10 da frequência das DCs circulantes (174). Aquelas estão presentes em diversos sítios anatômicos, como tonsilas, baço, fígado, sangue, linfonodos, dentre outros (174). Este grupo celular apresenta alta expressão de MHC-II e CD141 (BDCA-3), mas baixa expressão de CD11c e ausência de marcadores, como CD14, CD16, CD19, CD209 e CD11b (174, 191). As cDC1s apresentam marcadores exclusivos, como o CLR CLEC9A, relacionado à eferocitose, e capacidade de apresentação cruzada ao linfócitos T (192). Entretanto, a expressão de CLEC9A pode variar, de acordo com o sítio anatômico (192, 193). As cDC1s expressam o XCR1, um marcador específico que se liga à XCL1 e XCL2, estas secretadas por células NK e linfócitos T CD8. De fato, a interação entre estes grupos celulares está relacionada a um papel crucial na imunidade antitumoral (194).

Algumas cDC1s não apresentam a expressão do XCR1, assim caracterizadas por estarem em um estágio imaturo (192). As cDC1s são originadas a partir dos CDPs, diferenciadas para este grupo seletivo a partir de *interferon regulatory factor 8* (IRF8), BATF3 e PU.1, que corroboram para que precursores hematopoiéticos se diferenciem nesse subtipo específico de DCs (187). As cDC1s apresentam uma capacidade única de apresentação cruzada, quando comparada a outros subtipos de DCs (194). Isso se dá pela presença do CLR CLEC9A, pelo pH endossomal específico, que auxilia na degradação de antígenos, e pela gama de proteínas Rab, relacionadas com o tráfego de vesículas intracelulares (194, 195). As cDC1s apresentam um efeito protetor contra infecções virais, através da secreção de IFN- λ , ativação de CTL e geração de linfócito T de memória. Como as pDCs apresentam altos níveis de IFN- λ R, as cDC1s apresentam um papel crucial na ativação daquelas, induzindo a secreção de IFN- α e β e auxiliando na resposta imune antiviral (195, 196).

As cDC2s são uma população principal, caracterizada por apresentarem marcadores, como MHC-II, CD1c, CD11b, CD11c e CD141 (BDCA1), e por serem responsáveis por secretarem níveis elevados de IL-12, IL-6, IL-8 e IL-23 em resposta à ligação de antígenos aos PRRs, como TLR3 e TLR8 (174, 197, 198). As cDC2s podem ser encontradas em órgãos linfóides, como linfonodos, baço e amígdalas, bem como no pulmão (187). Na derme, cDC2s expressam marcadores, como CD1a, que, em conjunto com CD1c, apresenta antígenos glicoproteicos de patógenos, como as micobactérias (199). Embora as cDC2s tenham origem a partir dos CDPs, estas apresentam similaridades imunofenotípicas e funcionais com as moDCs (174).

Os CDPs se diferenciam em cDC2s a partir de fatores de transcrição, como IRF4, KLF4, RelB, entre outros (174). A partir daquelas citocinas supracitadas, seria possível induzir a polarização de linfócitos T *naive* nos perfis Th1 e Th17 (198). As cDC2s podem ainda ser divididas em dois outros subgrupos distintos, mediante a expressão alta de CD5, apresentação de níveis altos de IRF4, TLR3 e CCR7, e tendo como característica principal, a sua alta capacidade de migração e, conseqüentemente, capacidade acentuada de primar linfócitos T *naive* em diversos perfis, como Th1, Th17, Th2 e T regulatórios (200). Em especial, as cDC2s que apresentam baixa expressão de CD5 estão relacionadas estritamente com a polarização para o perfil Th1 (200).

As pDCs são caracterizadas por serem um grupo singular de DCs, apresentando um formato similar de plasmócitos, por conta de seu núcleo

proeminente e presença elevada de retículos endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi (201). Imunofenotipicamente, este perfil celular é caracterizado por apresentar MHC-II, CD123, CD45RA, CD303 (BDCA2) e CD304 (BDCA4) (174). Esse grupo seletivo de DCs é marcado pela sua capacidade ímpar de secretar IFN- α e β a partir do contato com antígenos virais reconhecidos por PRRs, como TLR7 e TLR9 (201). De interesse, as pDCs também são capazes de produzir IFN- λ (202).

Esta notável capacidade de sintetizar diferentes tipos de IFN, caracteriza sua definição atual como células produtoras de IFN naturais (202). Esta aptidão se dá principalmente pela ativação de fatores de transcrição, como IRF5, IRF7 e IRF8 (201). Existe uma plasticidade neste sistema, em que a diferenciação específica em pDCs é dependente de fatores de transcrição, como E2.2, pois a sua deleção nas pDCs maduras, leva a uma mudança de pDCs para cDCs (174).

As pDCs também podem ser divididas em dois subgrupos distintos, pela expressão do marcador CD2. As pDCs CD2^{high} e CD2^{low} possuem a capacidade de secretar IFN- α e granzima B e de ativar linfócitos T *naïve* (203). Todavia, pDCs CD2^{high} possuem a capacidade de primar células T *naïve* de maneira mais eficiente, por conta de secretarem IL-12p40 e expressarem moléculas coestimulatórias, como CD80, quando comparadas à CD2^{low}, induzindo a proliferação de células T e polarização para o perfil Th1 (203). Além de possuírem um papel fundamental na resposta imune inicial contra vírus, as pDCs também apresentam um papel crucial em infecções tardias, mediando a ativação de células T regulatórias pela expressão de IDO, bem como na indução de tolerância imunológica (204, 205).

As LCs são um subtipo de DCs presentes no sistema epitelial e, quando comparadas aos demais subgrupos de DCs, possuem uma característica singular por serem detentoras da capacidade de autorenovação (206). Após injúrias na pele, estas células podem re-estabelecer sua população local também através de monócitos derivados do sangue, que expressam CCR2 e CCR5, auxiliando na migração para os sítios inflamatórios (207). Em um estado estacionário e não-inflamatório, as LCs se encontram associadas a queratinócitos, através de moléculas como E-caderina (207).

As LCs são caracterizadas por apresentarem marcadores específicos, como CD207 e grânulos de Birbeck, este associado com a endocitose e ao tráfico endossomal, relacionado, assim, com a apresentação antigênica. As LCs apresentam ainda outros marcadores, como E-caderina, EpCAM, CD1a, CD1c, MHC-I e MHC-II (208). Embora apresentem diferente ontogenia, as LCs possuem a

capacidade de realizar apresentação cruzada (209). A diferenciação de precursores de medula óssea em LCs é mediada por fatores de transcrição, com PU.1, ID2 e RUNX3 (174). Essas células possuem um papel crucial na vigilância e captação de patógenos situados na epiderme (209). Uma vez que tenham capturado um antígeno, as LCs reduzem a expressão de marcadores, como a E-cardherina, e aumentam a expressão da molécula MHC-II, além de realizarem apresentação de glicoproteínas via molécula CD1, primando células T e polarizando-as para os perfis Th17 e Th22 (187, 209). Uma vez ativadas, as LCs secretam TNF- α , IL-1 β e IL-15, auxiliando na resposta imune contra patógenos invasores da pele (187, 209).

As moDCs ou iDCs são caracterizadas por serem um subtipo seletivo de DCs que surgem a partir de um quadro inflamatório, sendo encontradas em diversas patologias inflamatórias, como asma, artrite reumatóide, dentre outras (210-212). As moDCs são diferenciadas a partir de monócitos circulantes, que por suas vezes, expressam genes como IRF4, NCOR2 e ZBTB46 (187, 213, 214). Imunofenotipicamente, as moDCs expressam CD1a, CD141, CD11c, CD11b, Fc ϵ RI, CD206 e CD209, assim como resquícios de CD14 proveniente da diferenciação obtida a partir de monócitos (187, 215). As moDCs apresentam uma gama de marcadores de ativação, caracterizados por níveis altos de MHC-II, e moléculas coestimulatórias, como CD40, CD86 e CD80, assim como o CCR7, que permite a migração até os linfonodos para a devida apresentação antigênica, a partir do gradiente de CCL19 e CCL20 (174). Em modelos murinos de infecções pelo *Aspergillus fumigatus*, por exemplo, o CCR2 apresentou um papel crucial na migração de moDCs, uma vez que a deleção deste receptor prejudicou a migração dessas células aos linfonodos (216).

Além de secretarem IL-1 β , IL-12, IL-23 e IL-6, as moDCs são caracterizadas pela expressão alta de TNF- α e iNOS, sendo, assim, também conhecidas como TipDCs (DCs produtoras de TNF- α e iNOS), (215, 217). Através do reconhecimento de PAMPs por TLR2, TLR4 e TLR9, observa-se a indução de fatores de transcrição, como MyD88 e NF- κ B, isto levando a uma ação microbicida de moDCs e secreção daquelas citocinas supracitadas, além da ativação de linfócitos T nos linfonodos (215, 218).

As moDCs apresentam um papel crucial em patologias inflamatórias, nas quais estas são responsáveis por polarizar diferentes respostas imunes, como em modelos de dermatites atópicas. Aqui, as moDCs derivam linfócitos T *naive* para um perfil Th1, através da secreção de IL-12 e IL-18 (219). Em quadros de asma, as

moDCs são requeridas em uma proporção maior do que basófilos, para induzirem um perfil Th2 (212). Já em quadros de artrite reumatóide, as moDCs são caracterizadas por expressarem níveis altos de MHC-II, sendo capazes de induzir uma polarização ao perfil Th17 de maneira mais eficiente do que macrófagos, através da secreção de IL-6, IL-1 β e IL-23 (215).

1.3.3 A vacina BCG e células dendríticas

As DCs apresentam um papel fundamental ao entrarem em contato com a vacina BCG, uma vez que são as APCs profissionais do sistema imune. As DCs irão entrar em contato com este imunógeno no sítio de aplicação da vacina, irão realizar o processo de fagocitose, se tornando assim ativadas, e irão migrar até os linfonodos para realizarem a apresentação antigênica aos linfócitos T *naive*, promovendo uma resposta imune protetiva específica (220). Os modelos murinos de vacinação demonstraram que, em contato com o BCG, observa-se a migração de DCs epiteliais com fenótipo CD11b⁺ e EpCAM⁻ (221). No entanto, para conseguirem migrar com sucesso aos linfonodos e primarem linfócitos T *naive*, estas células dependem de IL-1R, TNFR-I e IL-12p40, bem como da molécula adaptadora MyD88 (221).

As DCs se tornam ativadas ao entrarem em contato com o BCG, expressando CD80, CD86, CD83, MHC-II, dentre outros (220, 222). Ao mesmo tempo, esta vacina tem a capacidade de induzir uma vida útil prolongada nas DCs, através da indução de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 e BCL-xL, assim como de NF- κ B. Esta ação de aumento na sobrevivência de DCs, permite com que estas células tenham um contato mais prolongado com a célula T, permitindo desta maneira uma apresentação antigênica mais eficiente (223). Além de moléculas co-estimulatórias, a vacina BCG foi capaz de induzir IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10, RANTES e MCP-1. Todas estas possuem um papel fundamental na modulação da resposta imune adaptativa, induzindo imunidade específica do tipo Th1 contra o Mtb (168).

Ao longo dos últimos anos, a comunidade científica vem desenvolvendo vacinas BCG recombinantes (rBCG), na tentativa de melhorar a resposta imune relacionada à TB (224, 225). Dentre as tentativas e em modelo murino, a deleção da serino protease Hip-1, presente na vacina BCG, levou a uma ativação mais eficiente de DCs, quando comparada a BCG parental. Provavelmente, isso se deu através de uma maior expressão de moléculas, como CD40, CD86 e MHC-II, e secreção de IL-12p40, IL-6, IL-1 β e IL-23, na qual IL-12p40 está relacionada ao perfil Th1, e as

demais, ao perfil Th17 (224). Assim, as DCs que fossem tratadas com essa rBCG, seriam capazes de ativar uma resposta imune mais proeminente de linfócitos dos perfis Th1 e Th17. Ademais, na presença desta rBCG as DCs foram capazes de ativar linfócitos T polifuncionais, capazes de secretar TNF- α , IFN- γ e IL-2, concomitantemente (224).

Szpakowski e colaboradores, demonstram que outra rBCG estimuladora de IL-18 foi capaz de induzir em DCs a expressão de moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86, assim como IL-23, IL-10 e IP-10 (225). Por suas vezes, estas DCs foram detentoras da capacidade de ativar linfócitos T secretores de IFN- γ de maneira mais eficiente, quando comparados a BCG parental (225). Estudos recentes *in vitro* com esta rBCG evidenciaram que DCs carreando este imunógeno foram capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T, diminuindo os níveis de IL-5 e aumentando a produção de IFN- γ em amostras clínicas de indivíduos com quadros atópicos (226). Este evento já foi observado anteriormente em modelos murinos, nos quais DCs carreando a vacina BCG foram capazes de suprimir o perfil Th2 e aumentar os perfis Th1 e T regulatório (227). Proteínas imunogênicas presentes no Mtb, como a bacterioferritina e ESAT-6, foram utilizadas como reforço e foram capazes de elicitar uma melhor resposta imune (103, 228). As DCs em contato com essas proteínas supracitadas foram capazes de promover uma resposta imune mais robusta, induzindo um perfil Th1, linfócitos T efetores e de memória, assim como células NK (103, 228).

Embora a vacina BCG seja um imunógeno secular, assim como a única licenciada na atualidade, a mesma apresenta resquícios de virulência residual que podem comprometer sua eficácia (224). A vacina BCG pode reduzir a expressão de moléculas, como CD209, um importante receptor ligado à fagocitose de DCs, e aquelas moléculas relacionadas à apresentação antigênica, como MHC-II e CD80 (225, 229, 230). Ademais, a vacina BCG foi capaz de reduzir a expressão de IL-12, importante no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra a TB, ao mesmo tempo em que induziu a secreção de IL-10, antagonizando a ação daquela (231).

1.4 Justificativa

Por um lado, a interação *in vitro* entre a vacina BCG e moDCs diferenciadas a partir de monócitos humanos advindos do sangue venoso periférico, vem sendo utilizada em pesquisas envolvendo a resposta imune inicial conferida por esta vacina (168, 222, 223). Por outro lado, a vacina BCG é utilizada para outros fins heterólogos, como um agente de ativação e maturação de DCs em ensaios que visam à utilização deste grupo celular como imunoterapia em alguns tipos de câncer, bem como em ensaios referentes a quadro atópicos (226, 232). Este imunógeno também é capaz de induzir a maior sobrevivência de DCs, visto pelo aumento do nível de moléculas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xl, que, por sua vez, está relacionado a uma apresentação mais duradoura de antígenos aos linfócitos T (223). A BCG apresenta caráter protetivo, mesmo perdendo uma de suas principais características: ser um patógeno vivo atenuado, visto que mesmo inativada por calor ou por irradiação γ , mantém sua capacidade imunogênica. Assim, a ativação de macrófagos e DCs vem sendo evidenciada, estes capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias, e apresentar ação modulatória, direcionando a resposta imune adaptativa (160, 164, 168). Importante, este imunógeno com a viabilidade alterada pode ser promissor como meio de vacinação alternativo aos indivíduos imunocomprometidos (162, 172, 233). A BCG também foi capaz de induzir diversos perfis de resposta imune adaptativa, como Th1, Th17, Th2, e T regulatório (161, 234, 235). Entretanto, já foi evidenciado que a proteção limitada da vacina BCG pode estar relacionada com a falha no desenvolvimento de células de memória duradouras (TCM e TEM), o que por sua vez pode estar relacionado com a ativação insuficiente de DCs, decorrente de um processo de uma apresentação antigênica deficitária (146, 224). Assim, faz-se necessário entender os mecanismos imunes que levam à ativação de DCs de acordo com a viabilidade deste imunógeno. Ademais, é de suma importância averiguar o papel de DCs na apresentação antigênica e os mecanismos que possam potencializar esta apresentação antigênica, bem como a secreção de citocinas que estão estritamente relacionadas à indução de perfis diferenciados de linfócitos T, após contato com a vacina BCG.

Neste contexto, este projeto visa validar um protocolo *in vitro* para avaliação da vacina BCG utilizando DCs humanas, bem como compreender melhor a resposta imune inicial *in vitro* em humanos, no intuito de tentar identificar os mecanismos específicos que poderiam conferir proteção contra a TB. Neste cenário, evidencia-se

a necessidade de um melhor entendimento de como as DCs se comportam *in vitro* na presença da vacina BCG, analisando receptores e citocinas que propiciam a comunicação entre as imunidades inata e adaptativa.

A hipótese deste estudo é que **a vacina BCG Moreau, nos seus diferentes aspectos de viabilidades, induz *in vitro* alterações diferenciadas de marcadores imunofenotípicos e de secreção de citocinas em moDCs e macrófagos humanos.**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar *in vitro* a maturação e a ativação de moDCs e macrófagos humanos a partir do tratamento com diferentes variáveis da vacina BCG Moreau.

2.2 Objetivos Específicos

- Adaptar um protocolo de geração *in vitro* de moDCs e macrófagos e;
- Avaliar *in vitro* a maturação e ativação de moDCs e macrófagos humanos com diferentes variáveis da vacina BCG Moreau por ensaios de imunofenotipagem e de dosagem de citocinas pro- e anti-inflamatórias e;
- Estudar o efeito da modulação das moDCs e macrófagos pela vacina BCG Moreau no perfil da resposta imune em linfócitos T autólogos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biossegurança

Os reagentes e amostras clínicas necessários para a realização desta dissertação foram manuseados respeitando as normas e precauções de acordo com as boas práticas laboratoriais. Ademais, experimentos foram realizados em cabine de segurança biológica 2-A1, respeitando as normas de precauções na manipulação de material biológico, assegurando desta forma a segurança das amostras e dos indivíduos relacionados à manipulação desta. Quando possível, descartes biológicos foram previamente descontaminados e autoclavados.

3.2 Considerações éticas

Os indivíduos participantes deste projeto de pesquisa foram brevemente esclarecidos sobre o mesmo de maneira clara e concisa. Em um evento subsequente, foi requerido aos indivíduos a assinatura espontânea do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para se tornarem participantes da pesquisa. Este projeto conta com aprovações dos conselhos de ética em pesquisa (CEP) da FIOCRUZ/IOC, sob número CAAE:35775014.0.0000.5248, e do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), sob número CAAE:357750145.0.0000.5258.

3.3 População estudada

As amostras clínicas obtidas foram oriundas de doações espontâneas e voluntárias do serviço de hemoterapia do HUCFF/UFRJ, sob a política de doação anônima. Os indivíduos participantes deste projeto, caracterizados pelo anonimato apresentaram idade maior que 18 anos e menor que 69 anos e não exibiram nenhum tipo de enfermidade pregressa, como HIV, HTLV, diabetes, hepatites, sífilis e Doença de Chagas. Informações adicionais sobre os doadores são confidenciais ao HUCFF. Parte das amostras desse estudo foram utilizadas antes da pandemia de COVID-19 (N=8) e a outra posterior a este período pandêmico (N=2).

3.4 Obtenção de amostras

Amostras de sangue venoso periférico de indivíduos adultos sadios foram obtidas por venopunção, em que neste processo cerca de 400 mL de sangue foram coletados em bolsas de sangue contendo citrato de sódio. Em um evento subsequente, as bolsas de sangue foram submetidas a separação do concentrado de hemácias e o produto excedente, conhecido como “*buffy-coat*”, contendo aproximadamente 50 mL de volume celular e rico em leucócitos, foi utilizado como amostra deste estudo. Estes procedimentos supracitados são realizados de forma rotineira e padronizada no HUCFF/UFRJ.

3.5 Separação de células mononucleares de sangue periférico

A obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi realizada através do método de diferença de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich®). O concentrado leucocitário foi diluído em PBS (Sigma-Aldrich®) na proporção de 1:1 em tubos cônicos do tipo *Falcon* de 50 mL (Corning®, Nova York, EUA). Em um evento posterior, foi adicionado lentamente o gradiente de densidade de Ficoll® na proporção de 1:2 (densidade 1077 g / mL) e centrifugado a 400xG por 25 minutos em temperatura ambiente (TA) (Eppendorf 5702R®, Hamburgo, Alemanha). As PBMCs presentes na forma de anel foram coletadas e transferidas para tubos cônicos do tipo *Falcon* de 15 mL (Corning®, Nova York, EUA). Após esse processo, as amostras permaneceram a 4°C. Posteriormente, as PBMCs foram lavadas de duas a três vezes com PBS (a 350 g por 7 min) e ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) para contagem e aferição da viabilidade celular, através de uma solução corante de azul de trypan (Sigma-Aldrich®) na diluição de 9 partes de Tripan para 1 de suspensão celular, utilizando para contagem uma câmara de Neubauer (Sigma-Aldrich®).

3.6 Purificação de monócitos e linfócitos T

As PBMC purificadas foram incubadas por 15 minutos a 4°C, com microesferas magnéticas revestidas por anticorpos anti-CD14 (MACS, Miltenyi Biotec®). Posteriormente, as células foram lavadas com uma solução MACS *Buffer*, contendo 10% BSA, 0,5M de EDTA e PBS (Miltenyi Biotec®). Subsequentemente, as células foram transferidas para uma coluna do tipo LS de separação magnética (Miltenyi Biotec®) acoplada no magneto MidiMACS™ (Miltenyi Biotec®), no qual as células CD14⁺ foram enriquecidas por *seleção positiva*, uma vez que as microesferas ficam retidas no magneto. Desta maneira, um grau elevado de purificação de monócitos foi obtido, como observado em estudos anteriores do nosso grupo (236).

Adicionalmente, células T autólogas foram obtidas a partir da purificação dos monócitos, por seleção negativa, em que foi coletado o eluido rico em linfócitos. Posteriormente, as células T foram congeladas em meio próprio de congelamento na concentração de 90% de SFB e 10% de DMSO. Estas foram armazenadas em nitrogênio líquido, em uma densidade celular de 1×10^7 células / mL (225).

3.7 Diferenciação de monócitos em moDCs e macrófagos

Os monócitos obtidos a partir da purificação foram cultivados em placas de 24 poços ou em tubos de polipropileno (Falcon®), na concentração de 3×10^6 /mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB (Vitrocell Embriolife®, Campinas, Brasil), L-glutamina (2 mM), tampão HEPES (10 mM) e 0,1 mg/mL de estreptomicina. Nessas condições, para a diferenciação de macrófagos, as células foram mantidas por seis dias, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Já as células que se diferenciaram em moDCs foram cultivados em garrafas (SPL®) ou em tubos de polipropileno (Falcon®), na concentração de 3×10^6 /mL, na presença de rh-GM-CSF e rh-IL-4 (PeproTech®, NJ, USA) em uma concentração de 500 UI (236, 237) e em meio cultura RPMI 1640, suplementado como indicado acima. As células foram incubadas por seis dias em estufa a 37°C e a 5% de CO₂.

3.8 Obtenção das variáveis da vacina BCG Moreau

Neste estudo, foram utilizados lotes da vacina BCG Moreau em diferentes condições. Como vacina viva, **(i)** o BCG liofilizado e reconstituído com PBS foi gentilmente cedido pela Fundação Atauilpho de Paiva (FAP,RJ); **(ii)** já alíquotas de BCG vivo e congelado foram gentilmente doadas pelo pesquisador Dr. Milton O. Moraes (IOC-Fiocruz). Na condição de inviabilização, procederemos com **(iii)** irradiação- γ ionizante, em que as ampolas FAP reconstituídas foram submetidos a 10 kGy (Acéletron- Acelétrica Comércio e Representação Ltda., RJ) (172) e a partir do lote irradiado, **(iv)** alíquotas também foram aquecidas (100°C por 3 minutos) e resfriadas (20° C por 3 minutos), sendo este ciclo repetido três vezes, no intuito de destruir moléculas da superfície do bacilo (164). Finalmente, **(v)** a BCG da FAP foi autoclavada, sendo exposta a 121°C por 30 minutos (163). LPS (Sigma-Aldrich®) foi usado a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como controle positivo. Todas as condições da vacina BCG supracitadas possuem uma concentração de $6,5 \times 10^6/\text{mL}$, com exceção de (ii), que foi utilizada a $10 \times 10^6/\text{mL}$. As interações *in vitro* com as células humanas, tanto macrófagos quanto moDCs ocorreram por 24 horas, na multiplicidade de infecção de 2:1 e na ausência de antibióticos, em que as células foram encubadas durante este período em estufa a 37°C e a 5% de CO₂.

3.9 Cultivos das diferentes variáveis da vacina BCG Moreau

Os cultivos da vacina BCG com suas diferentes condições de viabilidade foram realizados em meio de cultura LJ. Obtido a partir da base comercial Merck®, este meio é suplementado com glicerol e suspensão de ovos batidos, estes adicionados antes do processo de espessamento. Posteriormente o meio LJ é distribuído em 15 mL em tubos de ensaio 25 x 200 mm (238). Em um evento subsequente, ocorre o processo de coagulação da albumina, durante a esterilização do meio gerando um meio sólido. Posteriormente, as variáveis citadas no item anterior foram incubadas neste meio durante o período de 3 a 4 semanas (238). Este procedimento foi realizado apenas no intuito de averiguar se cada variável atende ao seu propósito de crescimento ou não, de acordo com os processos de inviabilização descritos no item anterior. Este processo foi possível graças ao auxílio da Dra. Maria Esther de Magalhães Machado Tônus (INCQS-FIOCRUZ).

3.10 Co-culturas de moDCs-lifócitos T e macrófagos-linfócitos T

Após o período de 24 horas de interação nas diferentes condições acima, moDCs ou macrófagos foram co-cultivados com linfócitos T autólogos, na proporção 1:1 durante 48 horas (239-241). Para isso, linfócitos T autólogos são descongelados no dia da co-cultura, em banho-maria a 37°C até os cristais de gelo serem dissolvidos. Posteriormente essas células descongeladas são ressuspensas em RPMI com SFB 10% e realizado a centrifugação para em um evento subsequente ser avaliado a viabilidade celular pela contagem na câmara Neubauer. Este experimento foi realizado em quadruplicata.

3.11 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Após o tempo final de incubação com os devidos estímulos, as células não estimuladas (controle negativo, e aquelas tratadas com as diferentes variáveis da vacina BCG ou com LPS, sejam provenientes de monoculturas ou co-culturas, foram centrifugadas a 350 g por 7 minutos em temperatura ambiente (TA), sendo seus respectivos sobrenadantes separados e congelados a -80°C. Macrófagos e moDCs em uma densidade celular de 5×10^5 foram lavados com tampão de lavagem específico para citometria de fluxo (PBS com 0,01% de azida sódica e 0,1% de BSA), doravante denominado de tampão FACS. Após, as células foram incubadas com 2µl de soro caprino (CECAL/FIOCRUZ), no intuito de inibir posteriores ligações inespecíficas, e incubados por 10 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram submetidas a marcação de superfície, com anticorpos monoclonais conjugados anti-humanos, descritos na Tabela 1.

Já a marcação intracelular foi realizada para a detecção de TLR2 e TLR4, feita pela técnica de coloração intracitoplasmática *in house*. Brevemente, as células foram fixadas com PFA a 4% durante 10 minutos em TA e protegidas da luz. Após serem lavadas com PBS, as células foram então permeabilizadas pela adição de 2 ml de uma solução de saponina (1 mL de solução Hank's + 99 mL de PBS, suplementado com 0,1% de saponina e 0,05% de azida sódica). Após lavagens com esta solução por centrifugação, a marcação com anticorpos monoclonais conjugados anti-TLR2 e anti-TLR4 humano foi realizada.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais anti-humano com seus respectivos fluorocromos e suas especificações para a marcação de macrófagos e moDCs.

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marca
CD14	HCD14	PE-DAZZLE	Biolegend®
CD80 (B7-1)	2D10	FITC	Biolegend®
CD40	5C3	APC.CY-7	Biolegend®
HLA-DR (MHC-II)	L243	ALEXA FLUOR® 647	Biolegend®
CD284 (TLR-4)	HTA125	PE	Biolegend®
CD86 (B7-2)	IT2.2	ALEXA FLUOR®488	Biolegend®
CD83	HBB15e	APC.CY-7	Biolegend®
CD197 (CCR7)	G043H7	ALEXA FLUOR® 647	Biolegend®
CD282 (TLR-2)	11G7	PE	Invitrogen®
CD11c	3.9	FITC	Biolegend®
CD1a	HI149	APC	Biolegend®
CD209 (DC-SIGN)	9E9A8	PE	Biolegend®

*PE: Ficoeritrina, FITC: Isotiocianato de fluoresceína, APC: Alofocianina.

Quanto aos linfócitos T, estes foram lavados com tampão FACS e incubados com 2µl soro de cabra por 10 minutos a 4°C. Após, as células foram submetidas a marcação de superfície, com anticorpos monoclonais conjugados anti-humanos e descritos na Tabela 2. Já as marcações intranucleares do fator de transcrição FoxP3 e de IFN-γ, foram realizadas seguindo as instruções do fabricante (Biolegend®).

Tabela 2: Anticorpos monoclonais anti-humano com seus respectivos fluorocromos e suas especificações para marcação de linfócitos T.

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marca
IFN-γ	25723.11	FITC	BD®
CD69	L78	PE	BD®
CD4	SK3	PerCP.Cy5.5	BD®
CD8	RPA-T8	BV650	BD®
CD4	M-A251	PE-Cy5	Biolegend®
CD25	M-A251	PE	Biolegend®
FOXP3	206D	ALEXA FLUOR®488	Biolegend®

Posteriormente e em todos os procedimentos, houve a incubação das células por 20 minutos a 4°C, em local desprovido de luz. Após a incubação, as células passaram por duas lavagens com tampão FACS e foram ressuspensas em 150µl de PFA a 1% durante 30 minutos. Finalmente, as células foram lavadas e ressuspensas em 150µl de tampão FACS.

Para evitar uma sobreposição de cores devido à semelhança entre os fluorocromos, três painéis distintos foram feitos, relacionados a marcação de macrófagos e moDCs, e dois painéis distintos, relacionados a linfócitos T. A diluição de todos os anticorpos foi de 1:40.

3.12 Leitura no citofluorímetro e estratégia de regiões

As amostras foram adquiridas no citofluorímetro CytoFLEX (Beckman Coulter, EUA) da Plataforma Multiusuário de Citometria de fluxo do IOC/FIOCRUZ. Um total de 10.000 eventos foram obtidos nas regiões de interesses pelo programa CytExpert (Beckman Coulter®, Califórnia, EUA). As marcações simples para a realização da compensação, com finalidade de evitar a sobreposição de fluorocromos, foram realizadas a partir de microesferas de calibração comercial (OneComp eBeads, eBioscience®, California, EUA). A análise dos experimentos foi feita a partir do programa Flowjo 10 (TreeStar®, Oregon, EUA).

Em um primeiro momento, a característica morfológica das amostras celulares foi analisada a partir do gráfico de *dotplot*, com os parâmetros de complexibilidade/granulosidade (*Side Scatter*, SSC) e tamanho celular (*Forward Scatter*, FSC). Dessa forma, a partir de uma região feita na população de células com morfologia monocítica, as moDCs foram evidenciadas em histogramas pela positividade para CD209, enquanto para os macrófagos foi considerado o CD14. Dentro destas duas populações específicas, os demais marcadores fenotípicos foram avaliados através de histograma, sendo estes CD80 (B7-1), MHC-II, CCR7, CD86 (B7-2), CD1a, CD11c, CD83, CD40, TLR-2 e TLR-4 (Figura 11). Desta forma, foi possível realizar uma análise comparativa dos dois grupos celulares, avaliando a expressão dessas moléculas e observando a diferença entre o controle negativo, o controle positivo e as demais variáveis de interesse.

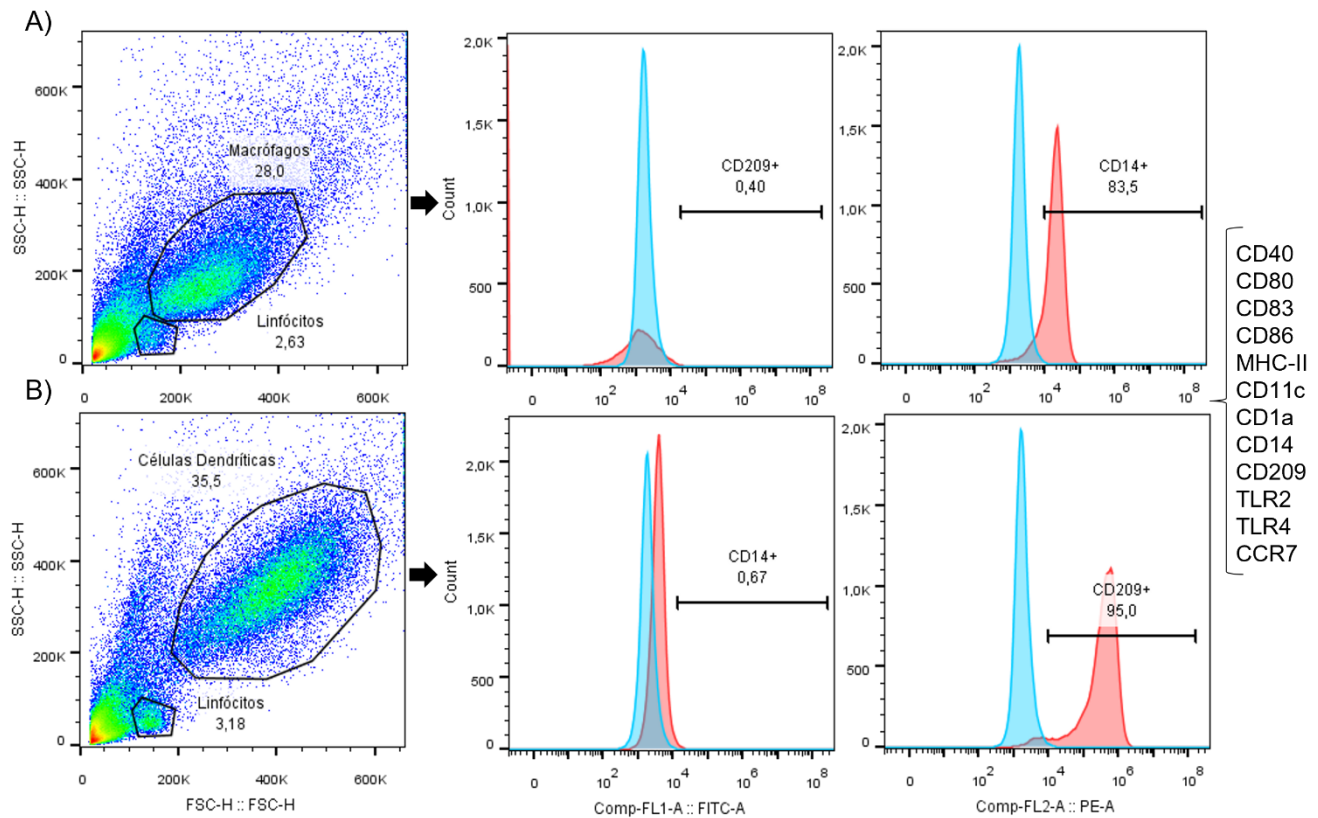


Figura 11: Gráficos representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo para macrófagos (A) e moDCs (B). É feito um gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) característico da população estudada. Para macrófagos é feito um histograma de CD14 enquanto em moDCs um histograma de CD209. Por fim, dentro dessas populações positivas foi feito um histograma dos marcadores destacados a direita.

Por suas vezes, os linfócitos T, coincubados com moDCs ou macrófagos, foram identificados primeiramente e morfologicamente, através do gráfico de *dotplot* por SSC e FSC. Em seguida, histogramas de linfócitos T positivos para CD8 e CD4 foram realizados. Dentro destas duas populações linfocíticas, *dotplots* dos marcadores FoxP3+CD25+, assim como de IFN- γ +CD69+, foram analisados (227, 239, 242) (Figura 12). Por fim, a porcentagem de células positivas para cada marcador, assim como a Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) dos grupos celulares estudados, foram agrupadas para subsequente análise estatística.

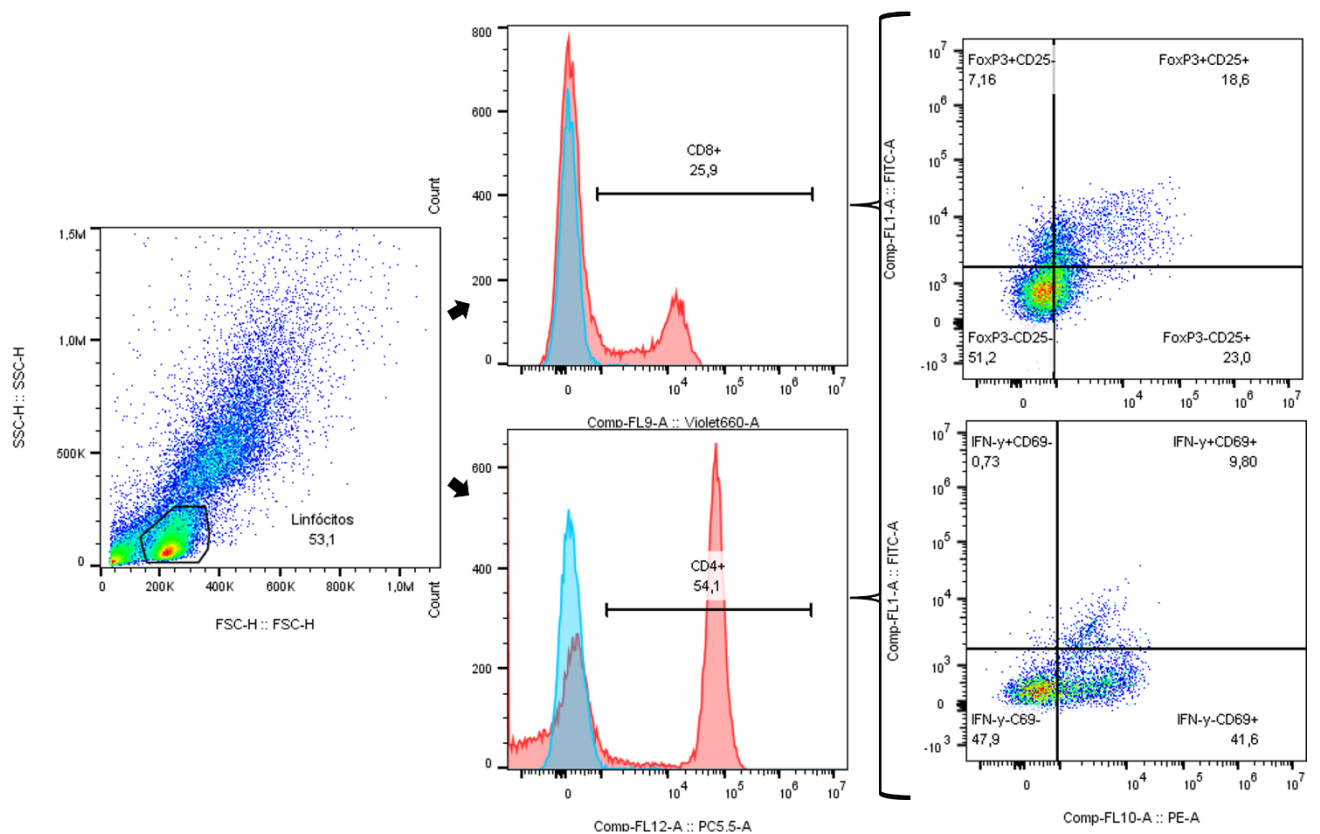


Figura 12: Gráficos representativos de estratégia de análise dos dados em citometria de fluxo de co-cultura de macrófagos e moDCs com linfócitos T. É feito um gráfico de tamanho (FSC) por granulidade (SSC) característico da população estudada. Posteriormente é feito um histograma de CD8 e um histograma de CD4. Por fim, dentro dessas populações positivas foi feito um *dotplot* dos marcadores FoxP3+CD25+ e IFN- γ +CD69.

3.13 Detecção de citocinas

Os sobrenadantes armazenados a -80°C foram descongelados para dosagem de citocinas, por meio da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando-se kits comerciais para detecção de IL-1 α , IL-18, IL-1 β , IL-10, TNF- α (R&D Systems®, Minnesota, EUA), IL-12, IL-6, IL-15 (eBioscience®, EUA) e MCP-1 (PreproTech®, EUA), seguindo as instruções dos respectivos fabricantes. Posteriormente, as amostras foram lidas no leitor de microplacas (SpectraMax M2—Molecular Devices®, Califórnia, EUA) disponível na plataforma multiusuário do IOC-Fiocruz, em comprimento de onda de 450nm. As curvas padrões utilizadas, são demonstradas pelos limites de mínimos e máximos de detecção dos ensaios de ELISA estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 3: Limites de detecção de citocinas mensurados por ELISA

Citocinas	Limite Min-Max. (pg/mL)
IL-1 α	7,8-500
IL-18	93-6000
IL-1 β	3,9-250
IL-10	31,2-2000
TNF- α	15,6-1000
IL-12	4-500
IL-6	2-200
IL-15	20-2,500
MCP-1	8-1000

3.14 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos foram feitas usando o teste U de Mann Whitney, assim como o teste de Tukey's. Os resultados foram expressos como média \pm SEM para cada grupo (GraphPad InStat 8.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivo das diferentes variáveis da vacina BCG Moreau

A quantidade de bacilos viáveis na vacina BCG é essencial para a sua efetividade e é também um instrumento valioso na verificação da uniformidade da sua produção (238). A contagem de colônias no meio sólido LJ é recomendada pela OMS para a determinação do número de unidades viáveis do BCG. Com isso, o procedimento de avaliação das condições de viabilidade da vacina BCG Moreau foi realizado, sendo elas: (i) a BCG viva da FAP, (ii) a BCG viva congelada, (iii) a BCG inativada por irradiação, (iv) a BCG inativada por irradiação e aquecimento e, (v) a BCG inativada por autoclavagem. Para o controle e a segura utilização dessas variáveis, os cultivos de micobactérias foram realizados em meio de cultura LJ para permitir sua aferição (Figuras 13 e 14).

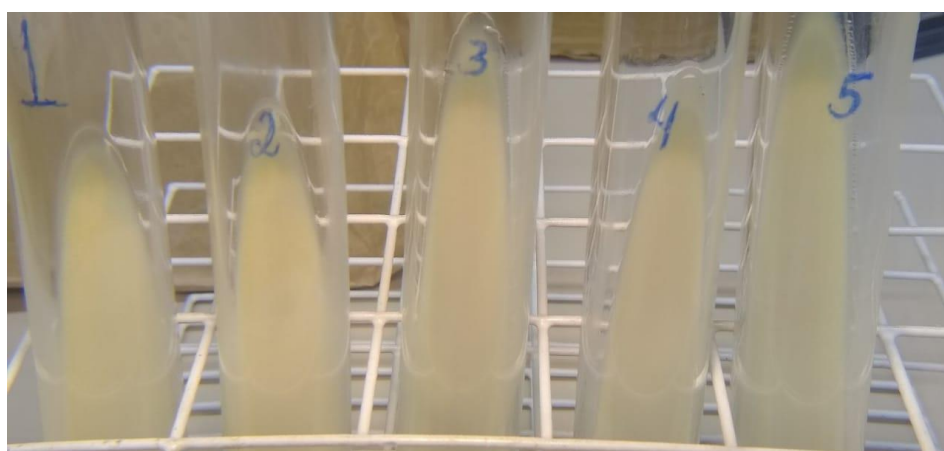


Figura 13: Culturas da vacina BCG Moreau em diferentes condições de viabilidade. Tubo 1: BCG da FAP. Tubo 2: BCG congelada. Tubo 3: BCG irradiada. Tubo 4: BCG irradiada e aquecida. Tubo 5: BCG autoclavada.

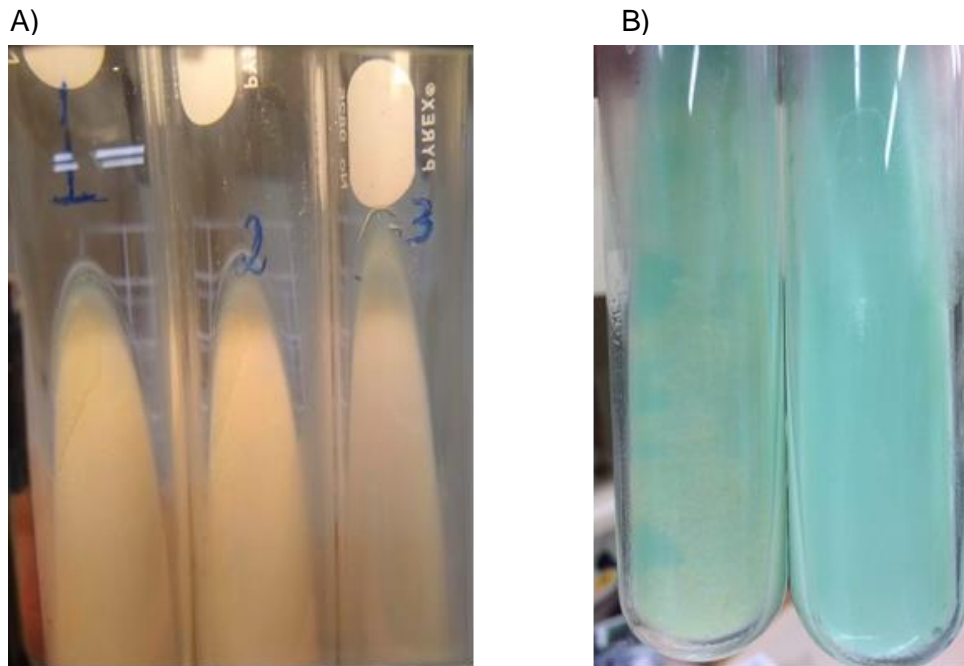


Figura 14: Culturas da vacina BCG Moreau em diferentes condições de viabilidade. A) Tubos 1 e 2 (viáveis) e tubo 3 (inativada). B) Tubo 2 (viável) e tubo 3 (inativada).

Após as respectivas variáveis da vacina BCG serem cultivadas entre 3 a 4 semanas em meio LJ (243), somente aquelas viáveis (BCG FAP e BCG congelada) apresentaram algum crescimento (Figura 14 A). Visualmente, as colônias foram observadas na forma característica de um tapete por confluência, que foi somente presente naquelas amostras das duas variáveis viáveis. Por outro lado, nas demais variáveis inativadas, não se observou qualquer crescimento (Figuras 13 e 14 B). Apesar da imagem na qual houve o crescimento bacteriano sugerir uma coloração amarelada por observação direta, na realidade o tapete apresentou coloração normal, ou seja, com pigmentação esbranquiçada a bege, bem típica das colônias de BCG (244). Quanto aos demais tubos, o meio de cultura LJ apresentou coloração característica verde, evidenciando falta de crescimento.

4.2 Purificação de Monócitos

A purificação é uma etapa crucial para a diferenciação adequada de grupos celulares, uma vez que a interação com outros perfis celulares pode interferir no resultado final devido à competição pelas citocinas e interação entre os grupos celulares (236). Assim, os monócitos frescos foram purificados e enriquecidos neste estudo, através de uma seleção positiva (Figura 15). Todas as amostras utilizadas

neste estudo tiveram a sua reprodutibilidade checada quanto a esta etapa de purificação (Figura 16).

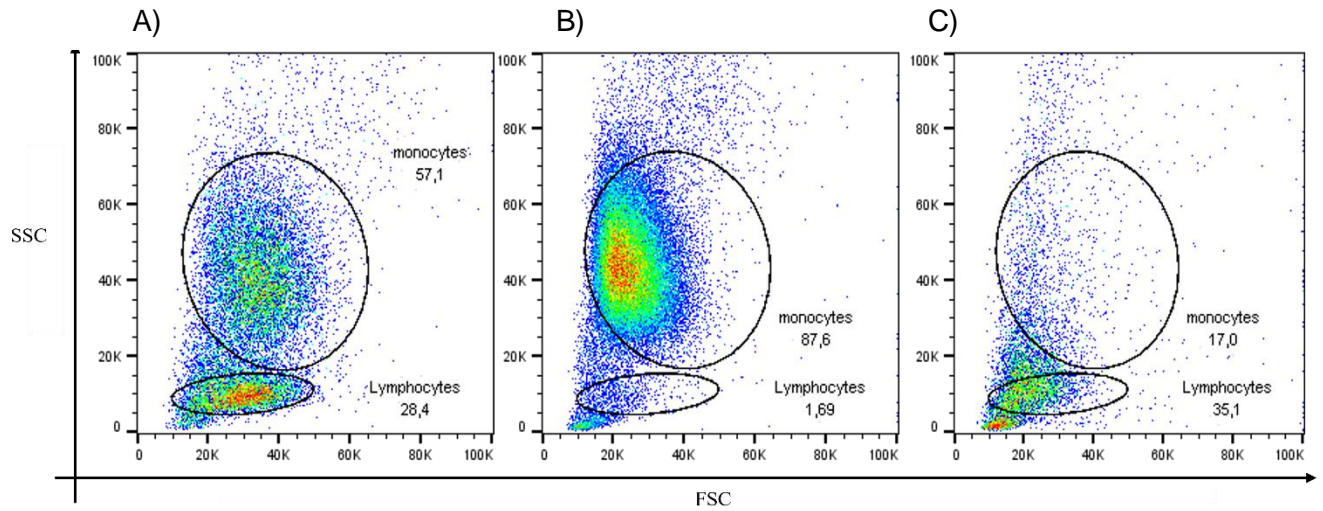


Figura 15: Perfis morfológicos representativos do processo de purificação de monócitos por microesferas magnéticas CD14+. A) Células advindas do processo de separação de PBMCs por gradiente de densidade, realizada anteriormente a purificação dos monócitos. B) Células advindas após processo de purificação dos monócitos, a partir de PBMCs. C) Eluido obtido após o processo de purificação dos monócitos.

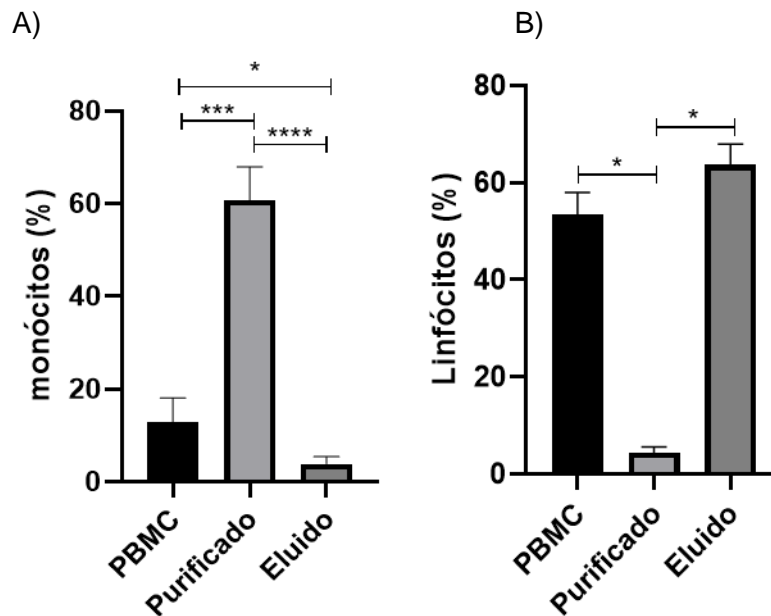


Figura 16: Porcentagem de monócitos e linfócitos após purificação celular por beads magnéticas CD14+. A) Porcentagem de monócitos obtidos do processo de enriquecimento de PBMCs, purificação com beads magnéticas ou eluído, após processo de purificação. B) Porcentagem de linfócitos nas mesmas condições que A. (N=10).

4.3 Análise da frequência de populações de moDCs e macrófagos *in vitro* a partir de diferentes moléculas de superfície e intracelulares após estímulo com BCG

Em um momento inicial, foi realizado um protocolo para a obtenção *in vitro* de moDCs e macrófagos a partir de monócitos enriquecidos, protocolos já realizados e validados, baseado em um estudo prévio (236). Neste, monócitos foram diferenciados tanto em macrófagos quanto moDCs, cultivados em tubos de polipropileno separadamente e posteriormente realizado a infecção com diferentes viabilidades da vacina BCG Moreau (Figura 17). Todavia, ao utilizar este protocolo para mensurar por imunofenotipagem a modulação *in vitro* de receptores celulares, o controle negativo, apresentando apenas estas APCs sem nenhum tipo de estímulo prévio, se mostrou elevado na sua grande maioria, seja em moDC ou macrófagos. Deste forma, e com o intuito de reduzir os níveis de ruído observado, outro protocolo alternativo de diferenciação *in vitro* de monócitos em moDCs e macrófagos foi realizado (239). Em que neste moDCs foram cultivadas em garrafas de cultura e macrófagos em placas de 24 poços (Figura 17), em que é possível visualizar o produto celular final após 6 dias de cultura por microscopia ótica (Anexo 1). Embora não seja possível diferenciar estes grupos fenotipicamente por este método, é possível visualizar morfologias distintas. Todavia, novamente os valores mensurados por imunofenotipagem de receptores de ativação se mostraram elevados do controle negativo, mesmo com novas amostras ensaiadas, e virtualmente semelhantes àqueles valores obtidos no protocolo proposto inicialmente. Por conta disso dessa semelhança de ambos os protocolos apresentarem valores similares, e após uma análise comparativa, unificou-se cada resultado obtido, tanto dos dois protocolos em moDC, quanto em macrófagos, segundo as duas metodologias empregadas (dados não mostrados).

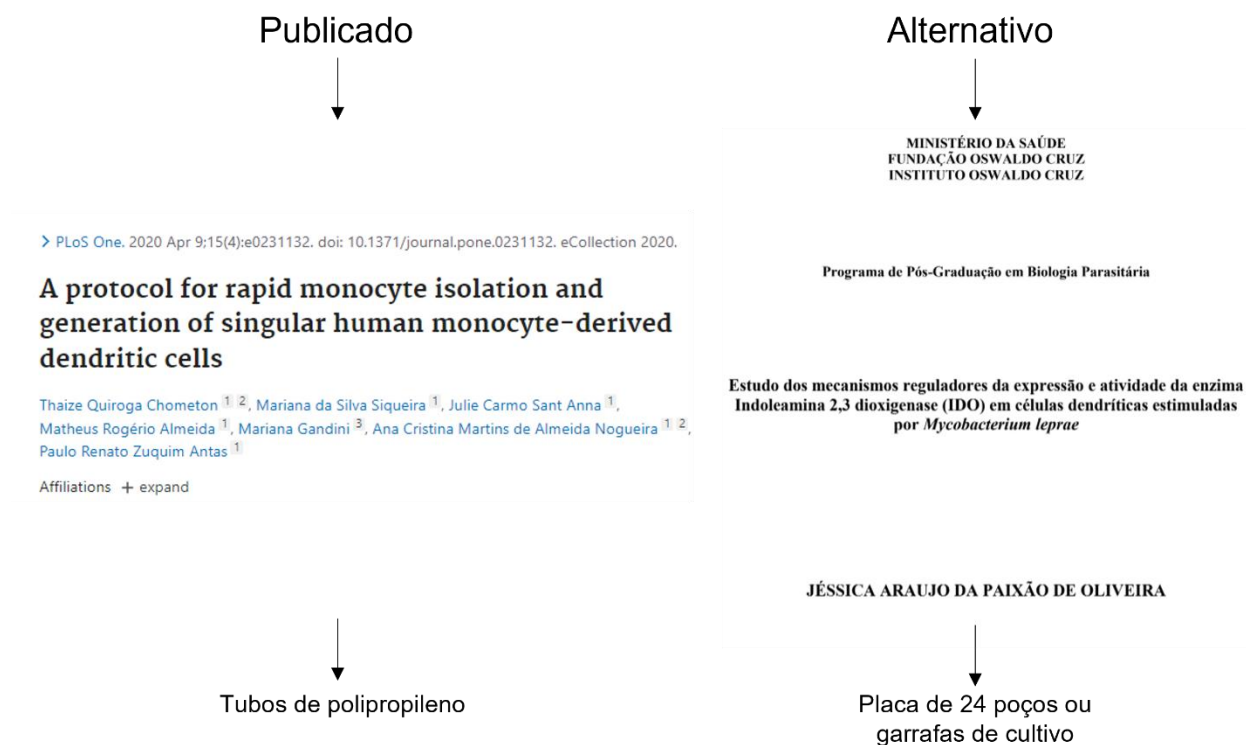


Figura 17: Trabalhos em que se foi baseado os protocolos de cultivos dos grupos celulares utilizados neste projeto.

Após testes das condições de viabilidade da vacina BCG Moreau e a padronização dos ensaios de diferenciação daqueles dois grupos celulares, este estudo teve como proposta fazer uma análise *in vitro* imunofenotípica de marcadores característicos em APCs, sendo eles os constitutivos (CD1a, CD11c, CD14 e MHC-II), bem como os co-estimulatórios induzidos (CD80, CD86 e CD209) (245), frente à infecção com a BCG. As expressões de outras moléculas de superfície, como CD83, CD40 e CCR7, foram também avaliadas, bem como os PRR intracelulares, TLR-2 e TLR-4. As análises destes receptores, foram avaliadas a partir das populações positivas para CD209 (moDCs) ou CD14 (macrófagos) (Figura 18).

Assim, o percentual de células CD1a não apresentou nenhuma alteração significativa, seja com LPS, ou com quais quer variáveis da vacina BCG, tanto em moDCs quanto em macrófagos diferenciados (Figura 18 A).

Já a expressão de CD11c diminuiu significativamente a porcentagem nas moDCs, nas variáveis BCG FAP ($p < 0.0325$) e BCG irradiada ($p < 0.0152$) (Figura 18 B). Em contrapartida, nos macrófagos este receptor foi significativamente reduzido nas variáveis BCG FAP ($p < 0.0012$) e BCG inviabilizados por irradiação ($p < 0.0364$), irradiação e aquecida ($p < 0.0265$) e autoclavagem ($p < 0.0189$) (Figura 18 B).

Para as moléculas co-estimulatórias, ambos grupos celulares não tiveram qualquer tipo de modulação significativa em relação ao CD80 (Figura 18 C). Porém, o CD86 apresentou uma aumento significativa ($p < 0.0372$) nas porcentagens de moDCs na presença de LPS, enquanto macrófagos apresentaram uma redução significativa ($p < 0.0325$) na presença do BCG irradiado/aquecido (Figura 18 D).

O CD83 apresentou uma redução significativa na porcentagem de macrófagos, contudo apenas na presença dos BCG inviabilizadas: BCG irradiada ($p < 0.0466$), irradiada/aquecida ($p < 0.0406$) e autoclavada ($p < 0.0270$) (Figura 18 E).

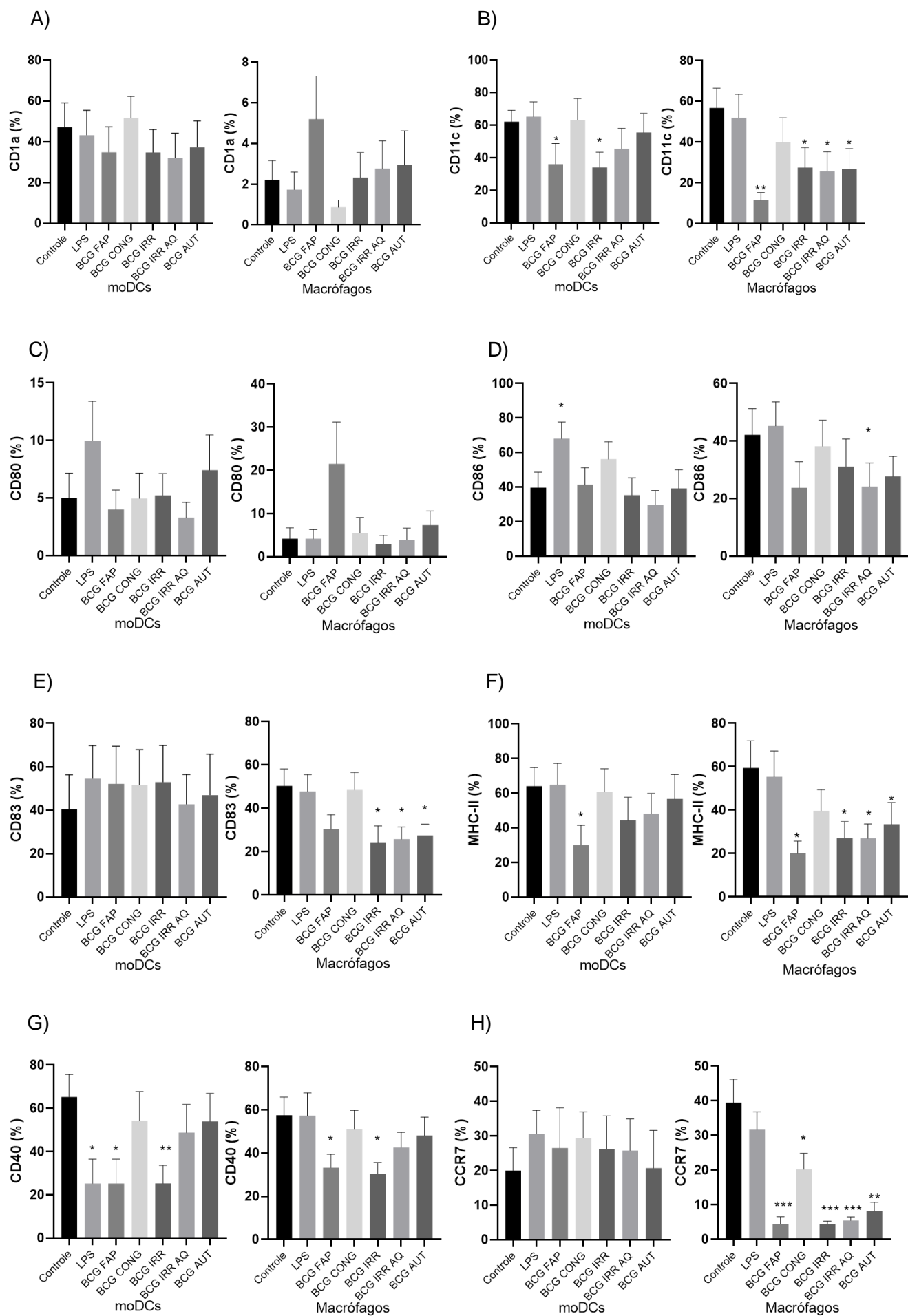
A vacina BCG viva da FAP alterou negativamente e significativamente, em macrófagos ($p < 0.0103$) e moDCs ($p < 0.0230$), a porcentagem de células expressando MHC-II (Figura 18F); todavia, a presença dos BCG inviabilizados nas culturas de macrófagos também reduziram a porcentagem de células expressando este marcador de forma significativa, sendo a BCG irradiada ($p < 0.0415$), irradiada aquecida ($p < 0.0469$) e autoclavada ($p < 0.0325$) (Figura 18F).

O CD40 reduziu significativamente seus níveis de expressão na presença de LPS apenas em moDCs, ($p < 0.0152$), enquanto as vacinas BCG viva da FAP e BCG irradiada reduziram significativamente estes níveis tanto em macrófagos ($p < 0.0418$; $p < 0.0413$) quanto em moDCs ($p < 0.0152$; $p < 0.0088$), respectivamente (Figura 18 G).

Finalmente, as porcentagens de macrófagos expressando o CCR7 apresentaram uma redução significativa nas variáveis BCG FAP ($p < 0.0006$), BCG congelada ($p < 0.0367$) e também com os BCG inviabilizados, sendo a BCG irradiada ($p < 0.0003$), irradiada/aquecida ($p < 0.0005$) e autoclavada ($p < 0.0012$) (Figura 18 H).

Quanto aos PRR, embora o TLR2 não tenha apresentado modulação significativa em ambos os grupos celulares (Figura 18 I), o TLR-4 apresentou redução apenas na presença do BCG irradiado ($p < 0.0364$) em macrófagos (Figura 18 J).

Nas DCs, o CD209 é característico deste grupo celular (236). Com isso, porcentagens de moDCs expressando este receptor apresentaram uma redução significativa na presença da vacina BCG viva da FAP ($p < 0.0023$) e dos BCG inviabilizados, sendo a BCG irradiada ($p < 0.0040$), irradiada/aquecida ($p < 0.0023$) e autoclavada ($p < 0.0023$) (Figura 18 K). Por outro lado, o CD14 é característico de monócitos/macrófagos e estes apresentaram uma redução significativa com aquelas mesmas variáveis acima, sendo BCG FAP, ($p < 0.0132$), irradiada ($p < 0.0071$), irradiada/aquecida ($p < 0.0101$) e autoclavada ($p < 0.0256$) (Figura 18 K).



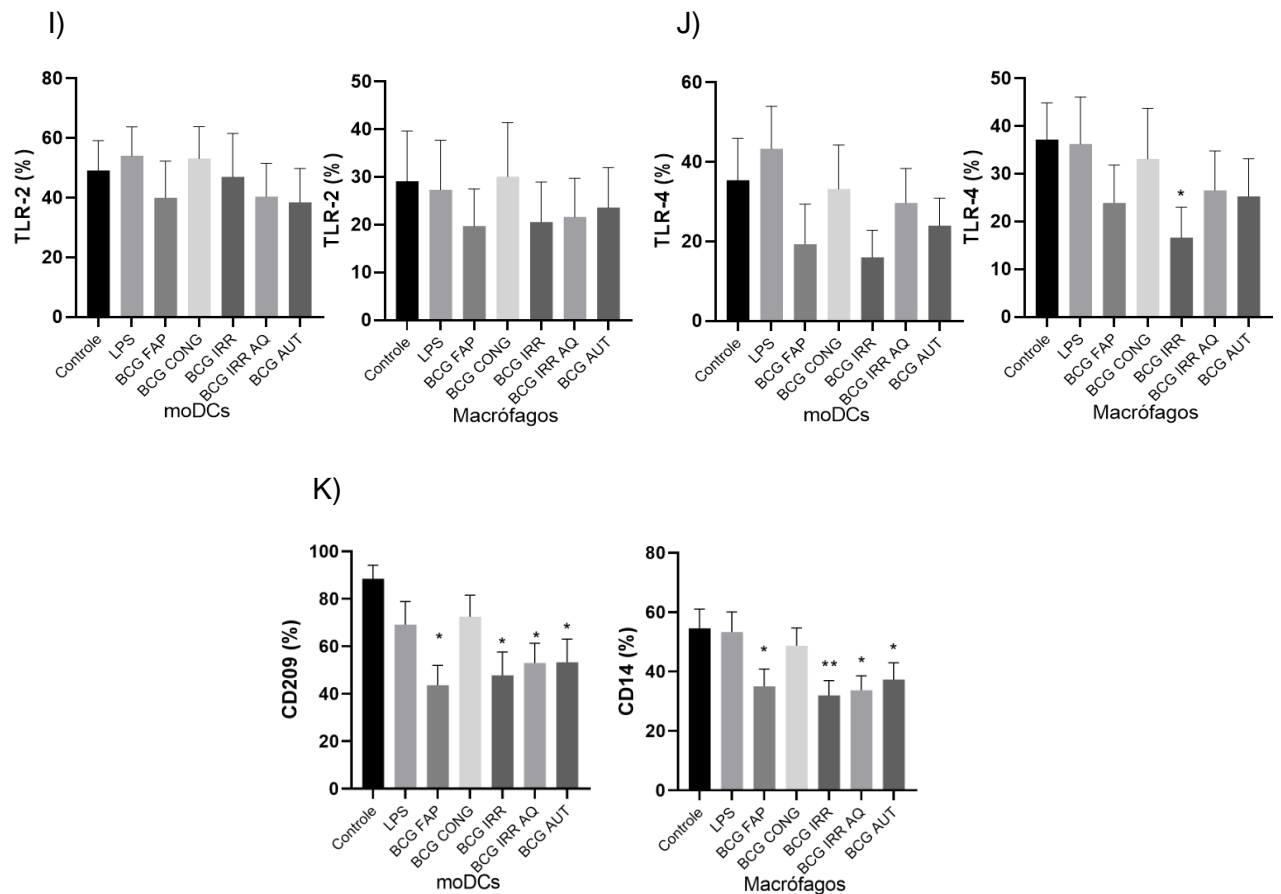


Figura 18: Expressão de moléculas de superfície e intracelulares em macrófagos e moDCs diferenciados a partir de PBMCs de doadores adultos sadio e estimulados com BCG (N=10). As moDCs e os macrófagos foram estimulados com LPS ou infectados com as diferentes condições da vacina BCG Moreau por 24h e o percentual de células expressando CD1a (A), CD11c (B), CD80 (C), CD86 (D), CD83 (E), MHC-II (F), CD40 (G), CCR7 (H), TLR-2 (I) e TLR-4 (J), bem como CD14 em macrófagos e CD209 em moDCs (K), foi detectado por citometria de fluxo. Células sem estímulo foram usadas como Controle. LPS: Controle positivo; BCG FAP; BCG congelada; BCG irradiada; BCG irradiada aquecida e; BCG autoclavada. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$.

4.4 Modulação da expressão *in vitro* das moléculas de superfície e intracelular em moDCs e macrófagos

Aqui, novamente utilizando a análise *in vitro* imunofenotípica de marcadores característicos em APCs, a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de cada molécula avaliada no item 4.3 foi agora mensurada. Nesta abordagem, a expressão de cada marcador foi avaliada por célula.

Em moDCs, o CD1a reduziu significativamente ($p < 0.0240$) seu MFI quando em contato com o BCG autoclavado (Figura 19 A). Já o CD11c apresentou um aumento significativo ($p < 0.0467$) de MFI quando as moDCs entraram em contato com o BCG congelado (Figura 19 B).

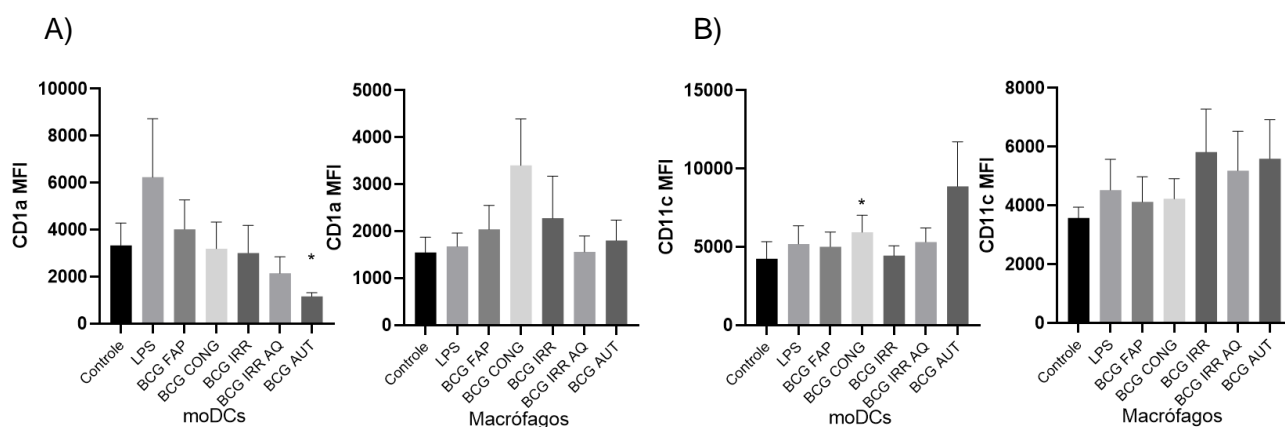
No que tange as moléculas co-estimulatórias, o LPS induziu um aumento significativo ($p < 0.0313$) no MFI de CD80 apenas em macrófagos (Figura 19 C), sendo que o mesmo modulou este aumento significativo ($p < 0.0416$) em CD86, agora apenas em moDCs (Figura 19 D).

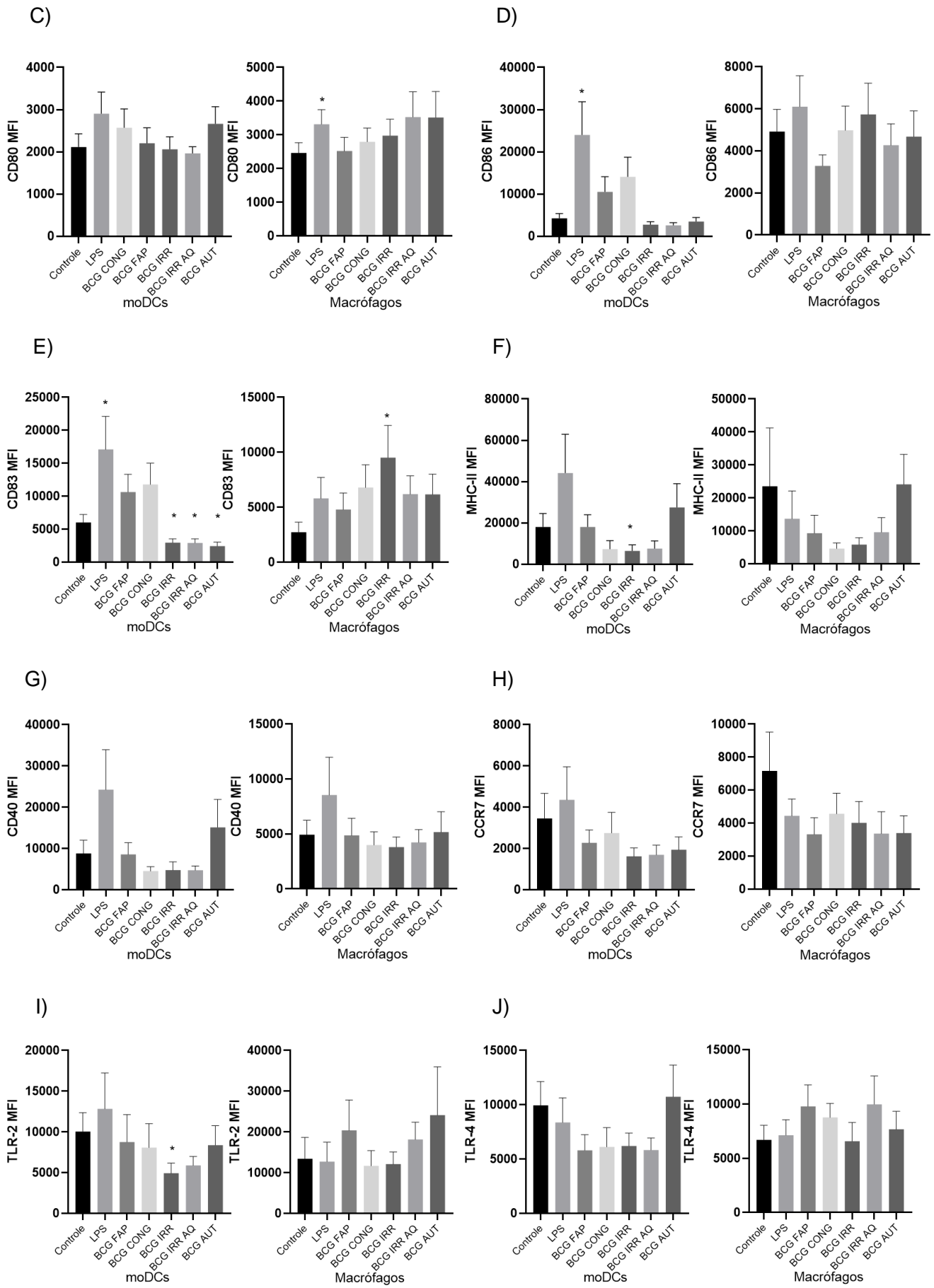
No caso de CD83, uma modulação positiva e significativa ($p < 0.0217$) no MFI das moDCs estimuladas com LPS foi observada. Porém, nestas mesmas células também se notou uma redução significativa com os BCG inviabilizados, sendo a BCG irradiada ($p < 0.0351$), irradiada/aquecida ($p < 0.0439$) e autoclavada ($p < 0.0277$) (Figura 19 E). Já em macrófagos, uma modulação positiva ($p < 0.0180$) de MFI ocorreu apenas quando estes entraram em contato com a BCG irradiada (Figura 19 E).

O MHC-II apresentou uma redução significativa ($p < 0.0464$) do MFI apenas quando moDCs entraram em contato com a BCG irradiada (Figura 19 F). O MFI de TLR2 nas moDCs apresentou uma redução significativa ($p < 0.0273$) em contato com a BCG irradiada (Figura 19 I).

Finalmente, o CD209 apresentou uma redução de MFI importante na presença de BCG irradiada e BCG irradiada/aquecida ($p < 0.0338$; $p < 0.0356$) (Figura 19 K). Já o CD14, nos macrófagos, apresentou uma redução significativa no contato com todas os BCG inviabilizados, sendo a BCG irradiada ($p < 0.0379$), irradiada/aquecida ($p < 0.240$) e autoclavada ($p < 0.0163$) (Figura 16 K).

Os marcadores CD40, CCR7 e TLR4 não tiveram qualquer tipo de modulação da MFI (Figuras G, H e J).





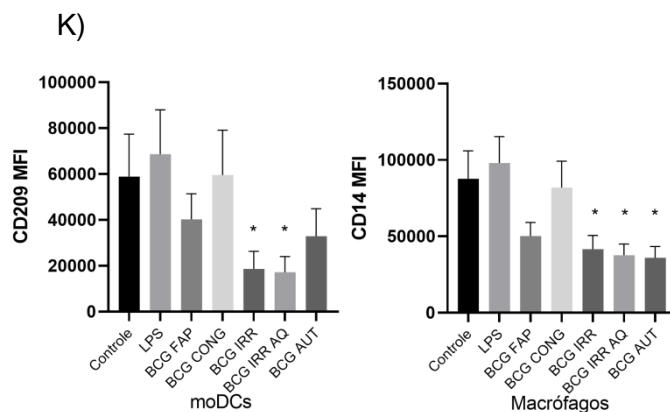


Figura 19: Expressão de moléculas de superfície e intracelulares em macrófagos e moDCs diferenciados a partir de PBMCs de doadores adultos saudáveis e estimulados com BCG por meio de citometria de fluxo medidas por MFI (N=10). As moDCs e os macrófagos foram estimulados com LPS ou infectados com as diferentes condições da vacina BCG Moreau por 24h e foi mensurado o MFI de células expressando CD1a (A), CD11c (B), CD80 (C), CD86 (D), CD83 (E), MHC-II (F), CD40 (G), CCR7 (H), TLR-2 (I) e TLR-4 (J), bem como CD14 em macrófagos e CD209 em moDCs (K), por citometria de fluxo. Células sem estímulo foram usadas como Controle. LPS: Controle positivo; BCG FAP; BCG congelada; BCG irradiada; BCG irradiada aquecida e; BCG autoclavada. *p< 0.05, ** p< 0.005.

4.5 Secreção *in vitro* de citocinas pró e anti-inflamatórias por moDCs e macrófagos

Considerando-se a importância das DCs e macrófagos na imunidade adquirida pela sua eficiente apresentação profissional de antígenos e estímulo na produção de citocinas ligadas à imunidade celular, a presença de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-18, IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-6, IL-15 e MCP-1), bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, nos sobrenadantes das culturas de APCs foi mensurada e comparada. Contudo não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes estímulos (Figuras 20).

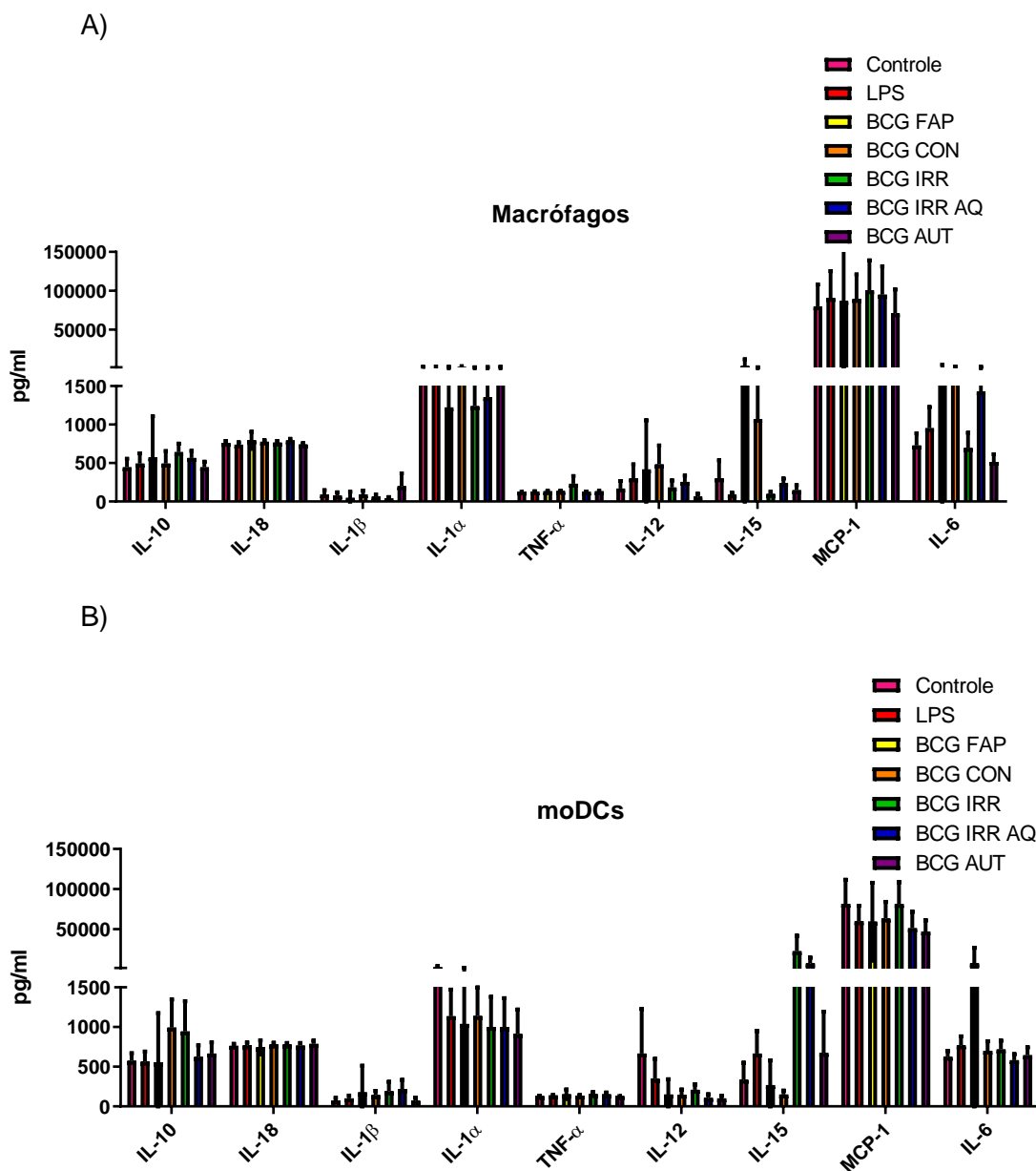


Figura 20: Secreção de citocinas dosadas por ELISA no sobrenadante de macrófagos (A) ou moDCs (B) estimuladas com BCG. Em ambos os perfis, foram avaliados as citocinas IL-10, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-12, IL-15, MCP-1, IL-6. (N=8).

4.6 Avaliação preliminar de perfis linfocitários após interação com moDCs e macrófagos infectados com a vacina BCG Moreau

Uma vez que moDC e macrófagos mostraram regular *in vitro* uma variedade de marcadores imunofenotípicos importantes, como evidenciado nos itens 4.3 e 4.4, seria interessante entender como essas APCs e seus receptores cognatos induziriam a modulação de linfócitos T. Com isso, foi realizado um único experimento piloto para que pudessemos elucidar preliminarmente como a vacina BCG, em suas

diferentes condições de viabilidade, poderiam modular a resposta imune. Como controles, foi realizado a co-cultura de APCs com linfócitos T e como controle positivo esta co-cultura em contato com LPS. Esses linfócitos autólogos foram obtidos a partir do eluído de PBMCs após o processo de purificação (Figura 16 B), sendo assim congelados até o dia de se realizar a co-cultura.

Assim, as moDCs pré-estimuladas com LPS e em co-cultura com linfócitos totais pareceram induzir uma polarização para um perfil de células T TCD4 regulatórias, sendo possível observar uma percentual significativamente maior de células expressando Foxp3+CD25+, quando comparadas com ambos BCG irradiado/aquecido e BCG autoclavado ($p < 0.0468$; $p < 0.0040$, respectivamente) (Figura 21 A). Por sua vez, a vacina BCG congelada apresentou um aumento significativo deste perfil de células T regulatórias, quando comparada a vacina BCG viva da FAP e ao BCG irradiado ($p < 0.0032$; $p < 0.0061$, respectivamente) (Figura 21 A). Em contrapartida, a vacina BCG viva da FAP apresentou um aumento significativo ($p < 0.0195$) no compartimento T regulatório, quando comparada ao BCG irradiado (Figura 21 A).

Já em relação aos linfócitos TCD4 em co-cultura com os macrófagos também pré-estimulados com LPS, novamente pode ser observado o surgimento deste perfil T regulatório. Assim, foi possível observar um aumento significativo ($p < 0.0013$) deste perfil celular, quando comparado ao BCG irradiado (Figura 21 A). Já o BCG congelado apresentou um aumento significativo, quando comparado a vacina BCG viva da FAP e ao BCG irradiado/aquecido ($p < 0.0363$; $p < 0.0050$, respectivamente) (Figura 21 A). Da mesma maneira que o BCG congelado, a vacina BCG viva da FAP apresentou um aumento significativo ($p < 0.0001$) deste compartimento T regulatório, quando comparado ao BCG irradiado/aquecido (Figura 21 A). Por fim, o BCG autoclavado demonstrou um aumento significativo em comparação com ao BCG irradiado e ao BCG irradiado/aquecido ($p < 0.0060$; $p < 0.0426$, respectivamente) (Figura 21 A).

A presença de um perfil regulatório nas células TCD8 em contato com esses dois grupos de APCs também foi averiguada. Com isso, em linfócitos TCD8 em co-cultura com as moDCs pré-infectadas com a vacina BCG viva da FAP, um aumento significativo no compartimento T regulatório foi observado, quando comparados as demais variáveis da vacina BCG, sendo a BCG congelada ($p < 0.0002$), irradiada ($p < 0.0215$), irradiada/aquecida ($p < 0.0001$) e autoclavada ($p < 0.0001$) (Figura 21 B). Por sua vez, o BCG congelado induziu um aumento significativo deste perfil celular

regulatório, quando comparado ao BCG irradiado/aquecido e ao BCG autoclavado ($p < 0.0050$; $p < 0.0021$, respectivamente) (Figura 21 B). Já o BCG autoclavado induziu um aumento significativo ($p < 0.0144$) no compartimento T regulatório, em relação ao BCG irradiado/aquecido (Figura 21 B). Quando os linfócitos T CD8 ficaram em co-cultura com os macrófagos, foi possível observar um aumento significativo do compartimento T regulatório na presença da vacina BCG viva FAP, quando comparado ao controle negativo e ao BCG autoclavado ($p < 0.0203$; $p < 0.0024$, respectivamente) (Figura 21 B). Finalmente, foi possível observar também um aumento significativo ($p < 0.0038$) deste perfil celular regulatório no BCG irradiado/aquecido, quando comparado ao BCG autoclavado (Figura 21 B).

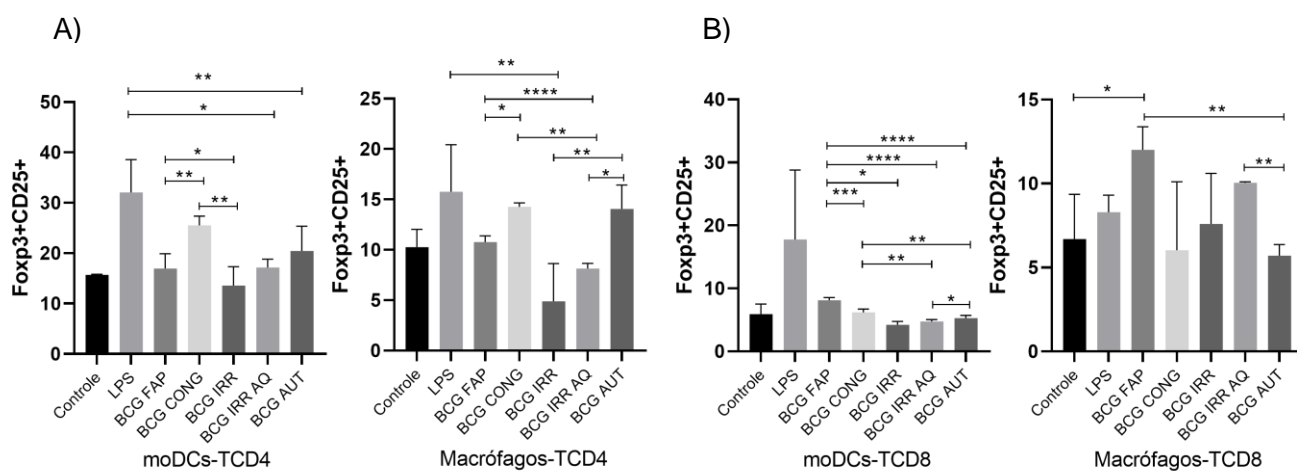


Figura 21: Expressão de moléculas de ativação linfocitária por meio de citometria de fluxo (N=1, quadruplicata). A) Gráfico da expressão de Fopx3 e CD25 em linfócitos TCD4 em co-cultura com moDCs e macrófagos de doadores adultos saudáveis, sendo as variáveis controle negativo, estimulado com LPS ou infectadas com as diferentes condições da vacina BCG Moreau. B) Gráfico da expressão de Fopx3 e CD25 em linfócitos TCD8 em co-cultura com moDCs e macrófagos em condições semelhantes de A. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Em paralelo a presença de linfócitos T regulatórios, a detecção de linfócitos polarizados para o perfil Th1 também foi realizada, ou seja, células que detêm a capacidade de secretar grandes níveis de IFN- γ (219). De modo geral, a presença deste perfil linfocitário tanto em linfócitos TCD4, quanto em linfócitos TCD8, foi observada em ambas co-culturas com APCs, .

Um aumento significativo na porcentagem de células com o perfil Th1 advindas da co-cultura com moDCs foi detectado na presença da vacina BCG viva da FAP, quando comparado ao controle negativo ($p < 0.0179$), ao BCG irradiado ($p < 0.0022$) e ao BCG irradiado/aquecido ($p < 0.0313$) (Figura 22 A). Contrariamente, naquelas co-culturas de macrófagos com linfócitos T CD4, não foi possível observar qualquer tipo de modulação (Figura 22 A). Por sua vez, os linfócitos T CD8 quando co-cultivados com moDCs pré-incubadas com LPS, tiveram um aumento significativo

($p < 0.0256$) na porcentagem células com o perfil Th1, quando comparados ao BCG autoclavado (Figura 22 B). Quando estes linfócitos TCD8 foram agora co-cultivados com os macrófagos pré-incubados com o BCG irradiado/aquecido, aqueles tiveram um aumento significativo ($p < 0.0106$) do perfil Th1, na comparação com o controle negativo (Figura 22 B). Por fim, observou-se também um aumento significativo ($p < 0.0010$) do perfil Th1 na condição de pré-incubados com o vacina BCG viva da FAP, em relação ao BCG congelado, assim como um aumento significativo ($p < 0.0015$) na condição de pré-incubação com o BCG autoclavado na comparação com o LPS (Figura 22 B).

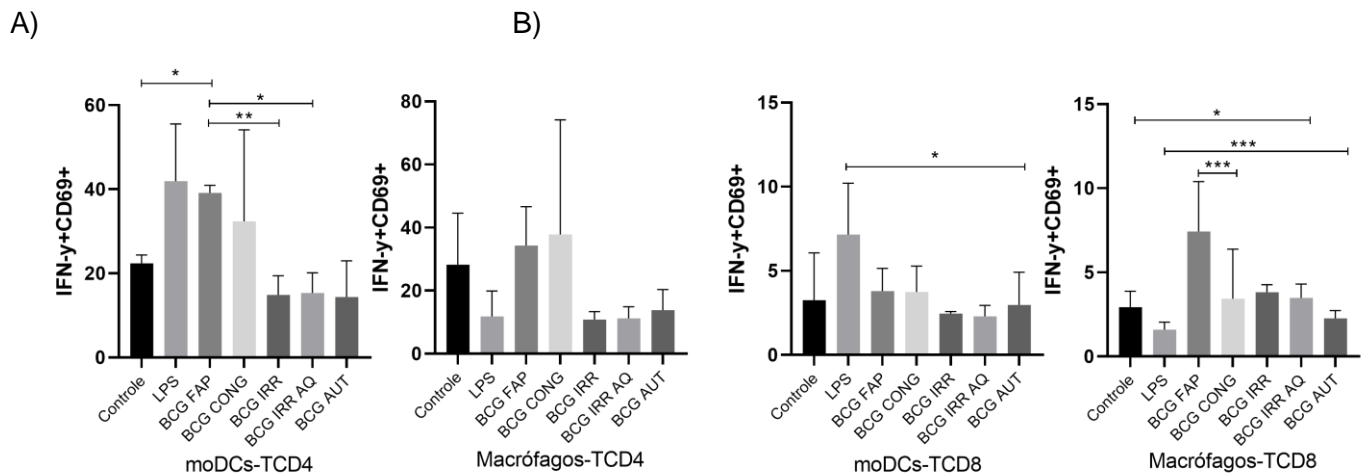


Figura 22: Expressão de moléculas de ativação linfocitária por meio de citometria de fluxo (N=1, quadruplicata). A) Gráfico da expressão de IFN- γ e CD69 em linfócitos TCD4 em co-cultura com moDCs e macrófagos de doadores adultos saudáveis, sendo as variáveis controle negativo, estimulado com LPS ou infectadas com as diferentes condições da vacina BCG Moreau. B) Gráfico da expressão de IFN- γ e CD69 em linfócitos TCD8 em co-cultura com moDCs e macrófagos em condições semelhantes de A. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$.

5 DISCUSSÃO

Este projeto de pesquisa teve como proposta principal validar um ensaio *in vitro* para a maturação e a ativação de moDCs e macrófagos humanos, a partir da infecção com diferentes variáveis da vacina BCG Moreau. Assim, a hipótese prevalente foi que a vacina BCG Moreau nos seus padrões de viabilidade, induzem *in vitro* alterações de marcadores imunofenotípicos e de secreção de citocinas em moDCs e macrófagos humanos. Com isso, buscou-se averiguar em modelo *in vitro* os diferentes mecanismos imunológicos em indivíduos vacinados com a BCG que poderiam mostrar caminhos distintos a se pavimentar para o melhor entendimento de efeitos protetores contra a TB.

A literatura descreve que a vacina BCG vem sendo utilizada como forte adjuvante de ativação e maturação de moDCs (232). Neste estudo, como modo de avaliar a ativação de moDCs, foram comparados diferentes padrões de viabilidade da vacina BCG Moreau. Inicialmente, aquelas variáveis visando a inviabilização foram idealizadas para o modo comparativo (controle negativo) nos experimentos de avaliação de maturação dos tipos celulares estudados. Entretanto, os processos de inviabilização (irradiação γ , aquecimento ou autoclavação) aparentaram-se incapazes de eliminar sítios antigênicos deste imunógeno, fato evidenciado pela literatura (160, 169, 172). Neste presente estudo, foi possível observar o crescimento das BCGs da FAP e congelada. Segundo a Farmacopeia Brasileira, as variáveis viáveis de BCG da FAP e congelada apresentaram viabilidade adequada e caráter replicativo, o que permite que formem colônias rugosas espreiadas (244). O mesmo não ocorre com outras variáveis inativadas, uma vez que a vacina BCG irradiada perdeu seu caráter replicativo, porém, manteve sua parede celular intacta, já evidenciado a partir de microscopia eletrônica observado na literatura (172). Por outro lado, a vacina BCG irradiada e aquecida e a vacina BCG autoclavada perderam a capacidade de se replicar devido à exposição às altas temperaturas (80°C e 120°C, respectivamente). Essa diferença se deve ao fato da inativação por irradiação γ preservar a vacina BCG dos danos estruturais majoritários, e embora através desse método o imunógeno perca seu caráter replicativo por conta de danos a nível de DNA, o BCG ainda apresenta atividade metabólica, com variância de 37% a 94% por conta da permanência de genes que promovem a síntese de proteínas funcionais (172, 246). Por sua vez, a vacina BCG ao ser

submetida à altas temperaturas, tem sua parede celular rompida (172). Portanto, o BCG irradiado apresenta atividade metabólica, e aquele BCG aquecido, tem seu conteúdo citoplasmático exposto. Neste último, é observado na literatura que os fragmentos da parede celular deste imunógeno na forma de antígenos termosensíveis demonstraram ter sítios antigênicos eficientes para desencadear uma resposta imune protetora (164, 172). A vacina BCG, segunda a literatura, seja viva ou inativada, é capaz de induzir a maturação de moDCs e macrófagos, assim como a secreção de citocinas (164, 168, 169). Da mesma forma, a literatura evidencia que este imunógeno sofrendo inviabilização foi capaz de induzir a expressão de moléculas de superfície, como CD1a, CD80, CD86, CD40 e MHC-II (245, 247).

Para a obtenção de moDCs e macrófagos humanos para se realizar a interação com os diferentes padrões de viabilidades da vacina BCG, o método de purificação de monócitos por seleção positiva através de microesferas magnéticas a partir de amostras de PBMCs, foi realizado. Este procedimento vem se mostrando de suma importância para a diferenciação adequada de moDCs e macrófagos, e vem sendo bem estabelecido e padronizado, através de estudo pregresso de nosso grupo (236). Através daquele estudo, mostramos que a obtenção de monócitos frescos circulantes, de modo mais rápido e eficiente do que outros processos comparativos, foi possível, preservando-se ainda uma alta viabilidade celular e sendo ideal para uma diferenciação finalística para moDCs ou macrófagos de maneira mais eficiente (236). A existência de linfócitos em contato primário com monócitos poderia levar a uma diferenciação de macrófagos e células dendríticas alterados, uma vez que a interação célula a célula influenciaria em uma diferenciação ótima (236). Daquele estudo, ainda ficou pendente uma validação *a posteriori* do protocolo proposto, utilizando coortes distintas.

A partir dos mononucleares CD14+ advindos de sangue venoso periférico humano fresco e mediante incubação *in vitro* com rhIL-4 e rhGM-CSF, os monócitos purificados diferenciam-se em moDCs em cerca de 6 dias (236). Por sua vez, estas adquirem a expressão de CD209, um marcador amplamente estabelecido e característico deste grupo celular, podendo coexpressar resquícios de CD14, um outro marcador pan monócitos/macrófagos (187, 236). Já foi descrito que tanto IL-4, quanto GM-CSF, apresentam papel crucial para a diferenciação de moDCs (248). A IL-4 impede a diferenciação de monócitos para macrófagos, através da inibição da produção de M-CSF e redução de seu receptor (248). Além disso, a IL-4 garante a expressão de CD116 e CD131, que são primordiais para a diferenciação de

monócitos em moDCs, além de proporcionar maior tempo de sobrevivência das DCs (248, 249). Estudos demonstraram que na ausência de IL-4, o GM-CSF consegue gerar apenas DCs CD1a+ (250). Assim, diferentes concentrações destas citocinas podem propiciar o surgimento de perfis distintos de moDCs (250, 251), ao passo que os longos períodos de cultivo com as mesmas em excesso, podem acarretar em moDCs com menor potencial imunogênico (252). Por suas vezes, os monócitos/macrófagos apresentam elevada expressão de CD14 e ausência de CD209, sendo o perfil característico deste grupo celular (82). Neste estudo, embora tenhamos usado monócitos cultivados com SFB e sem adição de M-CSF, apenas para controle em experimentos de diferenciação de moDCs, não sendo de interesse, nesse caso, avaliar a diferenciação dos monócitos em macrófagos, não comprovamos que os monócitos era realmente diferenciados em macrófagos maduros.

O processo de adesão das APCs pode não ser absolutamente essencial para a atividade de apresentação de antígenos, porém esse processo de adesão se mostra necessário quanto à secreção de citocinas (253). Naquele nosso estudo, o processo de adesão foi fundamental para a secreção de IL-8 e MIP-1, pois ambos foram prontamente induzidos por macrófagos infectados com BCG nas placas de 24 poços, mas não em suspensão nos tubos de polipropileno. Paralelamente, a linhagem celular humana THP1 mostrou que nenhuma monocina foi regulada diferencialmente quando aquelas células permaneceram aderidas em placas de 24 poços ou em suspensão nos tubos de polipropileno, independentemente do estímulo empregado. No entanto, o próprio processo de adesão induziu a secreção espontânea de IL-1 β e IL-8, e a infecção com BCG não alterou este cenário (253).

No presente estudo, o cultivo de moDCs e macrófagos foi inicialmente realizado em tubos de polipropileno, conforme já estabelecido por nós em protocolo previamente publicado (236). Além disso, em outro estudo demonstramos que não houve diferença significativa na alta expressão de CD209 e na baixa expressão de CD14, quando utilizamos métodos de diferenciação diferentes de moDCs, tanto em tubos de polipropileno, quanto em placas de 24 poços (253). Entretanto, no presente estudo ao avaliarmos marcadores de ativação de moDCs, como CD40, CD83 e MHC-II, estes se encontram em níveis elevados no controle negativo, em DCs e macrófagos não estimulados. Na tentativa de minimizar este resultado, uma adaptação daquele protocolo inicial, quanto ao método de cultivo de moDCs e macrófagos, foi realizada. Assim, as células agora foram diferenciadas em garrafas,

seguindo protocolo alternativo também estabelecido por nosso grupo (239). Todavia, ao final, todos os mesmos marcadores imunofenotípicos continuaram apresentando seus níveis elevados no controle negativo, assim não mostrando nenhuma diferença em relação ao protocolo publicado (236). As moDCs são descritas também como iDCs. Estas são originadas de precursores monocíticos a partir de um quadro de infecção (174). De acordo com Balan e colaboradores, as moDCs expressam níveis basais altos de moléculas coestimulatórias e de ativação, como MHC-II, corroborando com os níveis altos dos controles negativos achados neste estudo (174). Também já foi demonstrado que as DCs apresentam níveis basais altos de MHC-II no modelo murino (254).

Por ser um excelente adjuvante, a vacina BCG é descrita amplamente como uma apropriada ativadora de DCs, culminando assim na expressão aumentada de moléculas coestimulatórias e de ativação, como MHC-II, CD86, CD83, bem como indutora de IL-12p40, IL-6 e IL-1 β (220, 224). Todavia, este imunógeno pode ser um fraco agente ativador, induzindo um perfil regulatório em DCs. A vacina BCG foi vista ser capaz de reduzir níveis de moléculas importantes da ativação da imunidade adaptativa, como MHC-II, ao mesmo tempo que não induz aumentos expressivos nos níveis de moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86 (103, 230, 255). Assim, um dos grandes desafios na avaliação de tais marcadores em DCs, seria a alta variabilidade individual em coortes de diferentes doadores, caso também evidenciado por Murray e colaboradores (256).

No presente estudo, o CD1a foi visto estar constitutivamente presente em moDCs, sendo este um marcador típico deste tipo celular (187). Em contrapartida, o CD1a constitutivo se apresenta com baixa expressão em macrófagos (187, 257). O CD1a está relacionado com a apresentação antigênica, sendo estruturalmente homólogo ao MHC-II por também formar heterodímero com a subunidade β -2-microglobulina (169). Uma vez que as micobactérias apresentam sua parede celular rica em lipídeos e seus derivados, este tipo de apresentação antigênica para células T $\gamma\delta$ é notória, pois possui um papel crucial na resposta imune contra patógenos desta família (169). Ao utilizar a análise de MFI, pode-se observar neste estudo uma redução importante de CD1a na presença do BCG autoclavado, sugerindo que, em contato com conteúdo antigênico citoplasmático deste imunógeno, deva estar ocorrendo uma modulação deste marcador. Um estudo já mostrou que as DCs CD1+ são também capazes de realizar apresentação antigênica às células T com TCR restrito (258). Desta forma, as DCs ativam linfócitos T CD8 secretores de IFN- γ

(Th1) em contato com a vacina BCG viva, enquanto que em contato com o BCG inativado por calor, esta ativação não foi evidente (258). Provavelmente, este evento se dá pelo mecanismos de evasão da vacina BCG via virulência residual, em que produtos lipídicos deste imunógeno escapam do fagolisossoma e alcançam o meio citoplasmático (258). Desta forma, os lipídeos micobacterianos entram em contato com lisossomas ou endossomas que contenham as moléculas de CD1a ou CD1b nascentes, respectivamente, permitindo assim a subsequente apresentação antigênica (258, 259).

O CD11c está presente em macrófagos e DCs, reconhecendo partículas opsonizadas ligadas a fragmentos de iC3b, assim como reconhecem moléculas de adesão, como ICAM-1 e ICAM-2 (260). No presente estudo, esse marcador apresentou níveis reduzidos em ambos os grupos de APCs em contato com a vacina BCG, seja viável ou inativada. Desta forma, tendo as suas moléculas de adesão reduzidas, sugere-se que ambos os grupos celulares passam a apresentar um caráter migratório. Entretanto, moDCs apresentaram apenas esta redução em contato com o imunógeno viável, ou aquele com sua parede celular íntegra, enquanto macrófagos apresentam essa redução sem distinção do método de inviabilização. Por consequência, corroboramos e sugerimos aqui que as moDCs são APC com caráter mais seletivo (224). Interessantemente, as DCs CD11c⁻ já foram caracterizadas por apresentarem baixos níveis de marcadores, como MHC-II, CD40, CD80, CD86 e CD83. Todavia, uma vez em contato com mediadores pró inflamatórios, como TNF- α , este quadro pode ser revertido (261). Em contraste, os níveis basais de DCs CD11c⁺ tem um papel crucial na dinâmica do granuloma causado pelo Mtb, já sendo descrito que estas potentes APCs podem ser encontradas no interior daquela estrutura, assim como em sua periferia (71).

O MHC-II é primordial para que ocorra uma apresentação antigênica adequada e, quando acoplado ao peptídeo específico, um complexo trimolecular é reconhecido pelo TCR (45). No presente estudo, a expressão de MHC-II teve uma redução importante em ambos os grupos celulares. Entretanto, mas uma vez as moDCs pareceram interagir apenas com o imunógeno em seu estado viável, ou seja, apresentando sua estrutura íntegra, confirmando seu perfil como APCs mais seletivas. Enquanto isso, macrófagos mostraram uma redução de MHC-II tanto na vacina BCG viva, quanto também naquelas inativadas, independentemente do método empregado (224). A vacina BCG foi capaz de reduzir a expressão de MHC-II, possivelmente porque essa vacina é capaz de impedir a ligação do lisossomo

com o fagossomo em macrófagos e DCs, reduzindo a formação de peptídeos necessários para a ativação de células T (230). Em macrófagos, já foi visto que este imunógeno anula a atividade de v-ATPases responsáveis por importar prótons para o fagossomo, inibindo a acidificação e mantendo o pH neutro, impedindo assim a sua degradação (262). Neste fagossomo, a proteína catepsina-D não clivada é encontrada, está sendo responsável pela degradação de peptídeos, levando assim a uma apropriada apresentação antigênica (262). Além disso, a vacina BCG possui a capacidade de ativar a ubiquitina ligase MARCH-1, que é responsável por marcar moléculas de MHC-II, sendo degradadas por proteassomas em um evento subsequente (255). Como medida para reverter esse quadro, os PAMPs ligantes de TLR7 e TLR9 induzem uma redução de MARCH-1, prevenindo assim a degradação do MHC-II e levando a uma apresentação antigênica eficiente (230). Por conta desta redução de MHC-II, já foi hipotetizado que estas moDCs adquirem um perfil de DCs tolerogênico (263). Assim, as DCs podem apresentar tanto alta, como baixa expressão de MHC-II e moléculas coestimulatórias (263), tendo ação antagônica aos linfócitos T efetores (264). Em contrapartida, a literatura demonstra que a vacina BCG foi capaz de induzir a expressão de MHC-II (224, 265). Murray e colaboradores demonstraram que os BCGs vivos ou inativados por calor apresentaram uma regulação na expressão de MHC-II e de moléculas coestimulatórias (256).

As DCs são ativadas no contato com LPS, passando a expressar CD83 (266). Com relação a este marcador, no presente estudo, o CD83 reduziu sua expressão em macrófagos e moDCs, quando ambas APCs entram em contato com os BCG inativados. Porém, esse fato foi visto apenas em macrófagos, quanto avaliado pelo percentual celular, enquanto em moDCs, a redução ocorreu avaliando-se a MFI. Todavia, apesar de macrófagos apresentarem uma redução de CD83 quando em contato com o BCG irradiado, ao se avaliar a expressão unitária por células deste marcador, o mesmo se encontrou aumentado. Igualmente, estudos já mostraram uma maior expressão de CD83 frente a vacina BCG, assim como de CD80, CD86 e IL-12 (267, 268). Novamente, o CD83 possui um papel fundamental na inibição de outra ubiquitina ligase, a MARCH-8, uma enzima similar a MARCH-1 (269). Assim, a inibição de MARCH-8 pelo CD83 promove aumento de expressão de MHC-II, permitindo a correta ativação de linfócitos T CD4 (269).

No presente estudo, entretanto, faltou averiguar se esta redução de CD83 induzida pela vacina BCG, poderia estar correlacionada com aquela redução das moléculas de MHC-II. No que tange esta diminuição de expressão *in vitro* do CD83

em nosso modelo de estudo, outra eventual possibilidade seria a ocorrência de liberação de sua forma solúvel (270). O sCD83 tem função imunossupressora, sendo capaz de reduzir os níveis de expressão de MHC-II, ligar-se a TLR4 induzindo a produção de IL-10, assim como de impedir a maturação de DCs (270, 271). Um estudo recente em modelo de transplante de córnea demonstrou que sCD83 foi capaz de induzir expansão de DCs e macrófagos tolerogênicos, criando, desta maneira, um microambiente permissivo a maior sobrevivência do enxerto (272). Assim, estudos subsequentes são requeridos para um melhor entendimento do papel de sCD83 na infecção com a vacina BCG.

O CD40 é um marcador crucial para a ativação celular. Ao se ligar ao seu cognato CD40L presente em linfócitos, DCs e macrófagos recebem um *feedback* positivo para expressarem maiores níveis de MHC-II, assim como moléculas coestimulatórias (45). Ao ativarem os linfócitos T CD8 pela via CD40-CD40L, as DCs induzem a secreção de perforina e IFN- γ , tanto com a vacina BCG viva, quanto inativada por calor (247). Todavia, no presente estudo foi visto que a vacina BCG viva ou inativada por irradiação- γ , induziu uma redução de CD40, tanto em moDCs quanto em macrófagos. Esta redução pode estar relacionada aos demais marcadores estudados e relacionados com a apresentação antigênica. Alternativamente, e assim como o CD83 após a ativação, o CD40 pode ser convertido em sua forma solúvel (273). Destarte, estudos subsequentes são requeridos para se averiguar o papel de sCD40 na infecção com a vacina BCG.

Neste estudo, a vacina BCG por si só não foi capaz de induzir o aumento de CD40, assim reduzindo a capacidade de sua apresentação antigênica, embora existam outros estudos que mostrem o contrário (247, 274, 275). Nesse nosso estudo, deve ser realçado que as DCs estão em monocultura e sem prévios estímulos exógenos. Porém, já foi descrito que o estímulo prévio de DCs com IFN ou ligantes de TLR antes da infecção pela vacina BCG, pode aumentar a expressão de moléculas coestimulatórias, assim como a produção de IL-2 e IL-12, auxiliando em uma melhor ativação da imunidade adaptativa (230, 276). Ademais, a co-cultura de DCs com linfócitos T, pode proporcionar maior expressão de moléculas coestimulatórias, uma vez que essas irão favorecer o contato célula a célula, além de aumentar os níveis de IFN- γ , IL-17 e IL-10 produzidos por linfócitos, estes capazes de gerar um *feedback* para as DCs, tornando-as melhores APCs (224, 225, 277). Contrariamente e em um estudo pregresso, nós observamos uma baixa modulação de marcadores fenotípicos das moDCs na presença de linfócitos

autólogos, embora tenha sido observada uma diminuição semelhante da expressão desses marcadores em macrófagos, e essa etapa ocorreu de forma antígeno-dependente (253). Quando os linfócitos autólogos foram adicionados aos tubos de polipropileno, houve reduções simultâneas em todos os marcadores de superfície das APCs, chegando a cerca de 30 vezes para CD209, quando moDCs foram infectadas com a vacina BCG.

Neste estudo, foi averiguado que macrófagos apresentaram níveis constitutivos elevados de CCR7 e, ao entrarem em contato com a vacina BCG, tanto viva da FAP, quanto as inativadas, os mesmos, mas não as moDCs, apresentam uma redução expressiva do marcador, sugerindo que os macrófagos perdem sua capacidade migratória, alterando sua fenotipagem para se tornarem células residentes do tecido (278, 279). Além disso, existem estudos que mostraram uma redução de CCR7 na presença da vacina BCG, diminuindo a sua capacidade migratória (71). Em clara contradição, Murray e colaboradores demonstram que as DCs em contato com a vacina BCG, seja viva ou inativada por calor, aumentaram os níveis de CCR7, independente da viabilidade do imunógeno (256). Outros estudos já evidenciam o aumento de mRNA para CCR7 em DCs durante a infecção pela vacina BCG (280, 281). Certamente, mais estudos são necessários para tentar resolver esta questão.

O TLR2 e TLR4 são PRRs cruciais na resposta imune contra componentes bacterianos, reconhecendo compostos como LAM, peptidoglicanos e proteína de choque térmico de Mtb (88). Uma vez reconhecendo estes compostos, fatores intracelulares, como NF- κ B, induzem a expressão de moléculas como MHC, CD80 e CD86 (282). A proteína ligante de TLR4 bacterioferritina B do Mtb (Rv3841) foi mostrada ser capaz de induzir a produção de IL-12, TNF- α e IL-12p70 (283). Assim, esses PRRs mostram ser cruciais na resposta imune frente à vacina BCG. Após contato com a vacina BCG, os PRR aumentam a capacidade de DCs de expressar moléculas, como MHC-II (230). Embora o TLR2 em moDCs e o TLR4 em macrófagos apresentem uma redução importante na presença do BCG irradiado, este imunógeno tem o poder de ativar células imunes por outros PRRs, como TLR7 e TLR9 (230). Por sua vez, o Mtb apresenta estas mesmas estruturas que reduzem a expressão de MHC-II em macrófagos. Hipoteticamente, a vacina BCG poderia estar atuando de maneira semelhante no engajamento de TLR2 ou TLR4, via estruturas imunossupressoras (255, 284). Estudos demonstram que a vacina BCG

induz a formação de corpos lipídicos em macrófagos, pela via TLR2 e NF- κ B, induzindo uma regulação negativa na ativação destas células imunes (285).

Neste estudo, a vacina BCG foi vista ser capaz de reduzir a expressão de CD209 em moDCs. Este marcador foi também evidenciado ser uma porta de entrada da vacina BCG, bem como do Mtb em DCs, promovendo a sobrevivência destes (225). Por outro lado, a redução de CD209 pode estar relacionada com uma capacidade diminuída de fagocitose pelas DCs (225, 286). Já em macrófagos, o CD14 atua como um co-receptor para o TLR4 visando o reconhecimento destes antígenos (287). Assim, macrófagos CD14⁺ na presença da vacina BCG, apresentaram maiores níveis de moléculas coestimulatórias, como CD86, evidenciado assim sua importância no reconhecimento e na ativação celular (288).

Este estudo também mostrou que a presença de sítios antigênicos na vacina BCG, mesmo está passando por métodos de inativização, ainda são capazes de induzir respostas imunes *in vitro*. Estudos anteriores mostraram que a vacina BCG induziu a produção de IL-1 β , IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-15 (154, 168, 224, 240). A ativação de DCs por micobactérias inativadas já foi evidenciada: cDCs induziram a ativação de células T $\gamma\delta$, através de IL-1 β e TNF- α , polarizando este tipo celular para o perfil Th1 (169). A vacina BCG inativada por calor e combinada com adjuvante, como L3 Eurocina, foi capaz de gerar imunidade protetiva ao nível de célula T, no mesmo patamar que a vacina BCG viva, possuindo a capacidade de induzir IFN- γ (289). Estudos demonstraram que a vacina BCG inativada por irradiação- γ e utilizada como reforço, foi capaz de controlar a carga bacteriana, assim como reduzir injúrias patológicas desencadeadas pelo Mtb, além de induzir um perfil de células Th1 (160).

Devido ao seu efeito heterólogo, a vacina BCG é um importante alvo no tratamento de alergia e demais patologias relacionadas às hipersensibilidades do sistema imune (290). Assim, a vacina BCG possui a capacidade de reduzir quadros atópicos (277). As DCs secretam IL-10, está apresentando um papel essencial na redução da inflamação das vias aéreas naquele contexto atópico, pelo auxílio na ativação de células T regulatórias (290). Na vacina BCG, a IL-10 tem um papel antagônico ao da IL-12, inibindo sua produção, além de estar relacionada com a expressão reduzida de MHC-II (157, 230). Em contrapartida, estudos demonstraram que a ativação de APCs através de ligantes de TLR reduzem os níveis de IL-10 e induzem um perfil mais inflamatório, como o Th1 (230). Os macrófagos infectados com a vacina BCG, apresentam um aumento da expressão de MCP-1, além de

outros mediadores pró-inflamatórios (288). Decerto, a MCP-1 é responsável pela quimiotaxia de macrófagos ao sítio de infecção (291). Junto com IL-12, a IL-18 possui um papel crucial na indução do perfil Th1. Estudos demonstraram que rBCGs capazes de produzir IL-18 induzem a maturação de DCs e a ativação de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-23 (225).

Neste estudo, tendo em vista a necessidade de melhor entendimento da resposta imune conferida pela vacina BCG, surgiu a necessidade de realizar um experimento preliminar com linfócitos T autólogos, no intuito de tentar elucidar como estes linfócitos reagiriam em contato com APCs. Mesmo com a limitação de apenas um experimento, moDCs e macrófagos foram capazes de induzir em linfócitos T CD4 e T CD8, um perfil regulatório. Neste cenário, a vacina BCG viva da FAP apresentou uma capacidade superior, quando comparada aos BCG inativados. Em outro estudo, a vacina BCG foi capaz de induzir resposta imunes antitumorais, via células T regulatórias com um fenótipo PD-L1⁺, durante o tratamento de pacientes com câncer de bexiga (235). Assim, após a vacinação com BCG, observou-se uma grande concentração deste grupo celular na urina de pacientes com este tipo de câncer, este fato podendo influenciar na dinâmica do tumor (235). Estudos demonstraram que a vacina BCG após processo de liofilização prolongada, foi capaz de induzir pDCs à secretarem altos níveis de IL-10, e assim promover a ativação de células T regulatórias com um fenótipo CD25⁺Foxp3⁺, além de reduzir fatores transcricionais relacionados as outras respostas imunes adaptativas, como GATA-3 e ROR γ t, que estão relacionados aos perfis Th2 e Th17, respectivamente (292). Intrigantemente, a ativação de células T regulatórias não reduziu a ativação do perfil Th1, via fator de transcrição T-Bet (292). Por sua vez, a capacidade de controle do crescimento bacteriano após o desafio com uma cepa virulenta de Mtb foi observada (292). Outros estudos já evidenciaram a sinergia destes perfis de resposta imune induzida pela vacina BCG (227). No modelo murino, a vacina BCG foi capaz de modular as células T regulatórias com um fenótipo CD25⁺Foxp3⁺, através da indução de IL-10 em DCs (227). Concomitantemente, o imunógeno induziu um infiltrado inflamatório de neutrófilos no lavado broncoalveolar destes camundongos, sendo este um indicador de aumento do perfil Th1 (227).

Cada vez mais, os linfócitos TCD8 regulatórios vem sendo descritos. Porém, a interação deste grupo celular com a vacina BCG ainda possui uma escassez de estudos. Por suas vezes, os linfócitos T CD8 regulatórios apresentam uma maior expressão de genes responsáveis por induzir um fenótipo pro-apoptótico e de

proliferação restrita, como Bim, tornando assim a imunoterapia limitada (293). Neste estudo, a co-cultura de APCs e linfócitos T CD8 regulatórios tiveram diferenças importantes entre os grupos. Já foi visto que os linfócitos TCD8 regulatórios com um fenótipo CD25⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ são ativados na presença da vacina BCG (294). Similarmente e em modelo murino, as DCs expressando o receptor imunossupressor LkB1 foram capazes de regular a ativação tanto de linfócitos TCD4, quanto de TCD8 regulatórios (295, 296).

Neste estudo, embora ambos moDCs e macrófagos tenham mostrado capacidade reduzida de modulação dos marcadores relacionados à ativação celular, estas APCs em contato com ambos os linfócitos TCD4 e TCD8 aumentaram a expressão de CD69⁺ e IFN- γ ⁺ linfocitário, em uma clara modulação para o perfil Th1. Assim, a vacina BCG foi capaz de gerar uma resposta imune de perfil Th1, que é conhecida pela sua efetividade contra patógenos intracelulares (103). O CD69 é caracterizado como um marcador relacionado à ativação celular recente, sendo o IFN- γ , uma marca registrada deste perfil celular (103, 161). Em contato com a vacina BCG através destas APCs, e quando comparada ao Mtb, as células T CD4 secretam níveis superiores de IFN- γ (161). Estudos vem demonstrando o papel importante de rBCG no aumento da capacidade de apresentação antogênica de DCs, assim como uma resposta imune mais eficiente, em relação aos perfis Th1 e Th17, sendo a rBCG capaz de gerar uma patologia menos grave, com redução de carga micobacteriana (224, 297). Ademais, e mesmo passando por processos de inviabilização, como irradiação γ , a vacina BCG foi vista conseguir induzir ativação de linfócitos T CD4 polifuncionais produtores de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , reduzindo os níveis de carga bacteriana (160). Baseado nos dois perfis linfocitários comparados, células T regulatórias apresentaram maior modulação entre as variáveis da vacina BCG Moreau quando comparado ao perfil Th1.

De forma unificada, o presente estudo demonstrou a necessidade de estudos adicionais referentes à vacina BCG Moreau. Este imunógeno apresentou *in vitro* um perfil heterogêneo na modulação dos marcadores fenotípicos de ativação das APCs, com resultados referentes à co-cultura com linfócitos T muito promissores. Experimentos adicionais são necessários para um melhor entendimento de como a imunidade adaptativa protege frente a vacina BCG.

6 CONCLUSÕES

- Após verificação de dois protocolos de diferenciação celular de APCs, foi validado aquele protocolo alternativo de diferenciação in vitro de moDCs e macrófagos e unificado com o protocolo já publicado;
- Tanto as variáveis viáveis quanto inativadas da vacina BCG Moreau induziram uma resposta imune heterogênea, modulando diferentes marcadores imunofenotípicos de ativação em macrófagos e moDCs. Todavia as variáveis da vacina BCG Moreau não impactaram significativamente a produção de citocinas em moDCs e macrófagos;
- Tanto as variáveis viáveis quanto inativadas da vacina BCG Moreau induziram uma resposta imune linfocitária, que foi marcado por uma expansão dos perfis Th1 e Th-regulatório.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos achados obtidos neste estudo, tem-se com perspectivas de desdobramentos:

1) Expandir *in vitro* e por imunofenotipagem o ensaio de ativação via cocultura de moDCs/linfócitos T e macrófagos/linfócitos T com diferentes viabilidades da vacina BCG Moreau;

2) Padronizar e avaliar um ensaio de cinética para dosagem de citocinas pro e anti-inflamatórias frente a diferentes viabilidades da vacina BCG Moreau via cocultura de moDCs/linfócitos T e macrófagos/linfócitos T;

3) Estudar a morte celular (apoptose) *in vitro* em moDCs induzida pelas variáveis da vacina BCG e;

4) Checar *in vitro* e por imunofenotipagem a geração de macrófagos maduros diferenciados CD68+ usando M-CSF.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antas PR, Pedro TQ, Santiago EA, Lima JR, Silva FC, Melca LA, et al. Human neonates display altered ex vivo monokine production related to healthy adults. *Immunology letters*. 2016;170:64-7.
2. Yan H, Hale J, Jaffray J, Li J, Wang Y, Huang Y, et al. Developmental differences between neonatal and adult human erythropoiesis. 2018;93(4):494-503.
3. Koch R. An Address on Bacteriological Research. *British medical journal*. 1890;2(1546):380-3.
4. Donoghue HD. Paleomicrobiology of Human Tuberculosis. *Microbiology spectrum*. 2016;4(4).
5. Pósa A, Maixner F, Sola C, Bereczki Z, Molnár E, Masson M, et al. Tuberculosis infection in a late-medieval Hungarian population. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2015;95 Suppl 1:S60-4.
6. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*. 2018;26(6):555-6.
7. Willcocks S, Wren BW. Shared characteristics between *Mycobacterium tuberculosis* and fungi contribute to virulence. *Future microbiology*. 2014;9(5):657-68.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica: Elsevier Health Sciences*; 2017.
9. Ogwang S, Mubiri P, Bark CM, Joloba ML, Boom WH, Johnson JL. Incubation time of *Mycobacterium tuberculosis* complex sputum cultures in BACTEC MGIT 960: 4weeks of negative culture is enough for physicians to consider alternative diagnoses. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2015;83(2):162-4.
10. Kalscheuer R, Palacios A, Anso I, Cifuentes J, Anguita J. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. 2019;476(14):1995-2016.
11. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(10):620-30.
12. Ghazaei C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2018;23:63.
13. Bekierkunst A. Acute granulomatous response produced in mice by trehalose-6,6-dimycolate. *Journal of bacteriology*. 1968;96(4):958-61.
14. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular microbiology*. 2008;69(1):164-74.
15. Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(13):2879-88.
16. Nigou J, Gilleron M, Rojas M, García LF, Thurnher M, Puzo G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes and infection*. 2002;4(9):945-53.
17. Hook JS, Cao M, Weng K. *Mycobacterium tuberculosis* Lipoarabinomannan Activates Human Neutrophils via a TLR2/1 Mechanism Distinct from Pam(3)CSK(4). 2020;204(3):671-81.
18. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature reviews Microbiology*. 2018;16(4):202-13.

19. Bañuls AL, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*. 2015;64(11):1261-9.
20. Jang J, Becq J, Gicquel B, Deschavanne P, Neyrolles O. Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli. *Trends in microbiology*. 2008;16(7):303-8.
21. VanderVen BC, Huang L, Rohde KH, Russell DG. The Minimal Unit of Infection: Mycobacterium tuberculosis in the Macrophage. *Microbiology spectrum*. 2016;4(6).
22. Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, et al. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis. *Nature genetics*. 2013;45(2):172-9.
23. Supply P, Brosch R. The Biology and Epidemiology of Mycobacterium canettii. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1019:27-41.
24. OMS. Global health estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. 2018.
25. Mathema B, Andrews JR, Cohen T, Borgdorff MW, Behr M, Glynn JR, et al. Drivers of Tuberculosis Transmission. *The Journal of infectious diseases*. 2017;216(suppl_6):S644-s53.
26. Kozińska M, Augustynowicz-Kopeć E. The incidence of tuberculosis transmission among family members and outside households. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2016;84(5):271-7.
27. OMS. Global Tuberculosis Report 2021 – Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. 2021. p. 57.
28. Hopkins J. Global Map of Coronavirus. Johns Hopkins University & Medicina. 2022.
29. OMS. Global Tuberculosis Report 2020 – Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. 2020:232.
30. OMS. The end TB strategy - Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. 2014:30.
31. Ramírez-Lapausa M, Menéndez-Saldaña A, Noguero-Asensio A. [Extrapulmonary tuberculosis]. *Revista española de sanidad penitenciaria*. 2015;17(1):3-11.
32. Loddenkemper R, Lipman M, Zumla A. Clinical Aspects of Adult Tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;6(1):a017848.
33. Saúde Md. Boletim Epidemiológico - Tuberculose 2021. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2022:44.
34. Campelo TA, Cardoso de Sousa PR, Nogueira LL, Frota CC, Antas PR. Corrigendum: Revisiting the methods for detecting Mycobacterium tuberculosis: what has the new millennium brought thus far? *Access microbiology*. 2022;4(1):000294.
35. Topley WWC. Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity 1990.
36. Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular biology reports*. 2020;47(5):4065-75.
37. Arora D, Dhanashree B. Utility of smear microscopy and GeneXpert for the detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. *Germes*. 2020;10(2):81-7.
38. Collee JG, Mackie TJ, McCartney JE. Mackie & McCartney practical medical microbiology: Harcourt Health Sciences; 1996.
39. Siqueira RC, Oréface F. Potencial do teste IGRA (Interferon Gama Release Assay) para o diagnóstico de tuberculose ocular. Revisão e análise comparativa com o teste tuberculínico cutâneo (PPD). *Revista Brasileira de Oftalmologia*. 2019;78:202-9.
40. Organization WH. The use of lateral flow urine lipoarabinomannan assay (LF-LAM) for the diagnosis and screening of active tuberculosis in people living with HIV: policy guidance. World Health Organization, 2015 9241509635.

41. Bjerrum S, Schiller I, Dendukuri N, Kohli M, Nathavitharana RR, Zwerling AA, et al. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in people living with HIV. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2019;10(10):Cd011420.
42. Connelly JT, Andama A, Grant BD, Ball A, Mwebe S, Asege L, et al. Field evaluation of a prototype tuberculosis lipoarabinomannan lateral flow assay on HIV-positive and HIV-negative patients. 2021;16(7):e0254156.
43. Rabahi MF, Silva JLRd, Ferreira ACG, Tannus-Silva DGS, Conde MB. Tratamento da tuberculose. *Jornal brasileiro de pneumologia*. 2017;43:472-86.
44. Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(11):691-702.
45. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*: Elsevier Brasil; 2018.
46. Fennelly KP, Jones-López EC. Quantity and Quality of Inhaled Dose Predicts Immunopathology in Tuberculosis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:313.
47. Bussi C, Gutierrez MG. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS microbiology reviews*. 2019;43(4):341-61.
48. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(1):39-47.
49. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological reviews*. 2015;264(1):182-203.
50. Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, et al. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature*. 2014;505(7482):218-22.
51. Cambier CJ, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J, Ramakrishnan L. Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. 2017;47(3):552-65.e4.
52. Onwueme KC, Vos CJ, Zurita J, Ferreras JA, Quadri LE. The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Progress in lipid research*. 2005;44(5):259-302.
53. Duclos S, Diez R, Garin J, Papadopoulou B, Descoteaux A, Stenmark H, et al. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *Journal of cell science*. 2000;113 Pt 19:3531-41.
54. Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5437-42.
55. Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, Schlegel B, Brinkmann V, Kaufmann SH, et al. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cellular microbiology*. 2008;10(7):1530-45.
56. Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, et al. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*. 2007;130(1):37-50.
57. Guler R, Brombacher F. Host-directed drug therapy for tuberculosis. *Nature chemical biology*. 2015;11(10):748-51.
58. Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence: virulent Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(6):3707-16.
59. Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, et al. Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature immunology*. 2009;10(8):899-906.

60. Repasy T, Lee J, Marino S, Martinez N, Kirschner DE, Hendricks G, et al. Intracellular bacillary burden reflects a burst size for *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):e1003190.
61. Huang L, Nazarova EV, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: Bacterial Fitness within the Host Macrophage. *Microbiology spectrum.* 2019;7(2).
62. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *The Journal of experimental medicine.* 2008;205(1):105-15.
63. Chackerian AA, Alt JM, Perera TV, Dascher CC, Behar SM. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and immunity.* 2002;70(8):4501-9.
64. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiology spectrum.* 2019;7(4).
65. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal immunology.* 2011;4(3):271-8.
66. Silva Miranda M, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clinical & developmental immunology.* 2012;2012:139127.
67. Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *The Journal of experimental medicine.* 2003;198(5):705-13.
68. Via LE, Lin PL, Ray SM, Carrillo J, Allen SS, Eum SY, et al. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infection and immunity.* 2008;76(6):2333-40.
69. Marakalala MJ, Raju RM, Sharma K, Zhang YJ, Eugenin EA, Prideaux B, et al. Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized. *2016;22(5):531-8.*
70. Gideon HP, Phuah J, Myers AJ, Bryson BD, Rodgers MA, Coleman MT, et al. Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004603.
71. Harding JS, Rayasam A, Schreiber HA, Fabry Z, Sandor M. *Mycobacterium*-Infected Dendritic Cells Disseminate Granulomatous Inflammation. *Scientific reports.* 2015;5:15248.
72. Orme IM, Robinson RT, Cooper AM. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature immunology.* 2015;16(1):57-63.
73. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Horwitz MA, Sher A, Germain RN. Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas. *Immunity.* 2011;34(5):807-19.
74. Schreiber HA, Harding JS, Altamirano CJ, Hunt O, Hulseberg PD, Fabry Z, et al. CONTINUOUS REPOPULATION OF LYMPHOCYTE SUBSETS IN TRANSPLANTED MYCOBACTERIAL GRANULOMAS. *European journal of microbiology & immunology.* 2011;1(1):59-69.
75. Schreiber HA, Harding JS, Hunt O, Altamirano CJ, Hulseberg PD, Stewart D, et al. Inflammatory dendritic cells migrate in and out of transplanted chronic mycobacterial granulomas in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121(10):3902-13.
76. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infection and immunity.* 2003;71(12):7099-108.
77. Chee CB, Sester M, Zhang W, Lange C. Diagnosis and treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Respirology (Carlton, Vic).* 2013;18(2):205-16.

78. Barry CE, 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(12):845-55.
79. Marais BJ, Lönnroth K, Lawn SD, Migliori GB, Mwaba P, Glaziou P, et al. Tuberculosis comorbidity with communicable and non-communicable diseases: integrating health services and control efforts. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(5):436-48.
80. Toossi Z. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(8):1146-55.
81. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & molecular immunology*. 2017;14(12):963-75.
82. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *Journal of leukocyte biology*. 2012;92(6):1177-86.
83. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, et al. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(7):987-99.
84. Brooks MN, Rajaram MV, Azad AK, Amer AO, Valdivia-Arenas MA, Park JH, et al. NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG in human macrophages. *Cellular microbiology*. 2011;13(3):402-18.
85. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007;27(4):549-59.
86. Juárez E, Carranza C, Hernández-Sánchez F, León-Contreras JC, Hernández-Pando R, Escobedo D, et al. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to Mycobacterium tuberculosis in humans. *European journal of immunology*. 2012;42(4):880-9.
87. Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, et al. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(22):20961-7.
88. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical & developmental immunology*. 2011;2011:405310.
89. Kleinnijenhuis J, Joosten LA, van de Veerdonk FL, Savage N, van Crevel R, Kullberg BJ, et al. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1beta production by Mycobacterium tuberculosis. *European journal of immunology*. 2009;39(7):1914-22.
90. Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J, et al. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(6):4074-82.
91. Killick KE, C NC, O'Farrelly C, Hokamp K, MacHugh DE, Harris J. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cellular microbiology*. 2013;15(9):1484-95.
92. Botha T, Ryffel B. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(6):3110-8.
93. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, Amaral EP, Barber DL, Gonzales J, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*. 2014;511(7507):99-103.
94. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, Caspar P, et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary

- myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity*. 2011;35(6):1023-34.
95. Lastrucci C, Bénard A, Balboa L, Pingris K, Souriant S, Poincloux R, et al. Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell research*. 2015;25(12):1333-51.
96. Khan A, Singh VK, Hunter RL, Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *Journal of leukocyte biology*. 2019;106(2):275-82.
97. Samstein M, Schreiber HA, Leiner IM, Susac B, Glickman MS, Pamer EG. Essential yet limited role for CCR2⁺ inflammatory monocytes during *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell priming. *eLife*. 2013;2:e01086.
98. Goldberg MF, Saini NK, Porcelli SA. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology spectrum*. 2014;2(5).
99. Esin S, Counoupas C, Alicino A, Brancatisano FL, Maisetta G, Bottai D, et al. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. *Scandinavian journal of immunology*. 2013;77(6):460-9.
100. Nouailles G, Dorhoi A, Koch M, Zerrahn J, Weiner J, 3rd, Faé KC, et al. CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(3):1268-82.
101. Dallenga T, Schaible UE. Neutrophils in tuberculosis--first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? *Pathogens and disease*. 2016;74(3).
102. Petit-Jentreau L, Jouvion G, Charles P, Majlessi L, Gicquel B, Tailleux L. Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Deficiency in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Mice Enhances Neutrophil Recruitment. *Infection and immunity*. 2015;83(9):3666-74.
103. Marongiu L, Donini M, Toffali L, Zenaro E, Dusi S. ESAT-6 and HspX improve the effectiveness of BCG to induce human dendritic cells-dependent Th1 and NK cells activation. *PloS one*. 2013;8(10):e75684.
104. Corleis B, Korbel D, Wilson R, Bylund J, Chee R, Schaible UE. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cellular microbiology*. 2012;14(7):1109-21.
105. Blomgran R, Ernst JD. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4⁺ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(12):7110-9.
106. Mayer-Barber KD, Barber DL. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(12).
107. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, et al. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(1):121-7.
108. Carroll MV, Sim RB, Bigi F, Jäkel A, Antrobus R, Mitchell DA. Identification of four novel DC-SIGN ligands on *Mycobacterium bovis* BCG. *Protein & cell*. 2010;1(9):859-70.
109. Kim WS, Kim JS, Cha SB, Kim SJ, Kim H, Kwon KW, et al. *Mycobacterium tuberculosis* PE27 activates dendritic cells and contributes to Th1-polarized memory immune responses during in vivo infection. *Immunobiology*. 2016;221(3):440-53.
110. Choi HG, Kim WS, Back YW, Kim H, Kwon KW, Kim JS, et al. *Mycobacterium tuberculosis* RpfE promotes simultaneous Th1- and Th17-type T-cell immunity via TLR4-dependent maturation of dendritic cells. *European journal of immunology*. 2015;45(7):1957-71.
111. Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a

- negative signal delivered through the mannose receptor. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2001;166(12):7477-85.
112. Tian T, Woodworth J, Sköld M, Behar SM. In vivo depletion of CD11c+ cells delays the CD4+ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2005;175(5):3268-72.
113. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, Beura L, James BR, Taylor JJ, et al. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nature protocols*. 2014;9(1):209-22.
114. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1805-15.
115. Curtis J, Luo Y, Zenner HL, Cuchet-Lourenço D, Wu C, Lo K, et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with variants in the ASAP1 gene encoding a regulator of dendritic cell migration. *Nature genetics*. 2015;47(5):523-7.
116. Hava DL, van der Wel N, Cohen N, Dascher CC, Houben D, León L, et al. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(32):11281-6.
117. Srivastava S, Ernst JD. Cell-to-cell transfer of *M. tuberculosis* antigens optimizes CD4 T cell priming. *Cell host & microbe*. 2014;15(6):741-52.
118. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluittsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129(7):1287-98.
119. Koh KW, Lehming N, Seah GT. Degradation-resistant protein domains limit host cell processing and immune detection of mycobacteria. *Molecular immunology*. 2009;46(7):1312-8.
120. Sakai S, Kauffman KD, Schenkel JM, McBerry CC, Mayer-Barber KD, Masopust D, et al. Cutting edge: control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subset of lung parenchyma-homing CD4 T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2014;192(7):2965-9.
121. Gopal R, Monin L, Slight S, Uche U, Blanchard E, Fallert Junecko BA, et al. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004099.
122. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009;31(2):331-41.
123. Khader SA, Guglani L, Rangel-Moreno J, Gopal R, Junecko BA, Fountain JJ, et al. IL-23 is required for long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* and B cell follicle formation in the infected lung. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2011;187(10):5402-7.
124. Domingo-Gonzalez R, Das S, Griffiths KL, Ahmed M, Bambouskova M, Gopal R, et al. Interleukin-17 limits hypoxia-inducible factor 1 α and development of hypoxic granulomas during tuberculosis. *JCI insight*. 2017;2(19).
125. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunology*. 2007;8(4):369-77.
126. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008;41(2):79-83.

127. Poirier V, Bach H, Av-Gay Y. Mycobacterium tuberculosis promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 α . *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(42):29376-85.
128. Velmurugan K, Chen B, Miller JL, Azogue S, Gurses S, Hsu T, et al. Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog*. 2007;3(7):e110.
129. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, et al. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell host & microbe*. 2008;3(4):224-32.
130. Sharma G, Upadhyay S, Srilalitha M, Nandicoori VK, Khosla S. The interaction of mycobacterial protein Rv2966c with host chromatin is mediated through non-CpG methylation and histone H3/H4 binding. *Nucleic acids research*. 2015;43(8):3922-37.
131. Luca S, Mihaescu T. History of BCG Vaccine. *Maedica*. 2013;8(1):53-8.
132. Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life sciences*. 2020;252:117594.
133. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1019:155-69.
134. Barreto ML, Pereira SM, Ferreira AA. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. *Jornal de pediatria*. 2006;82(3 Suppl):S45-54.
135. Milstien JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bulletin of the World Health Organization*. 1990;68(1):93-108.
136. Bottai D, Frigui W, Clark S, Rayner E, Zelmer A, Andreu N, et al. Increased protective efficacy of recombinant BCG strains expressing virulence-neutral proteins of the ESX-1 secretion system. *Vaccine*. 2015;33(23):2710-8.
137. Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LR. BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(5):459-65.
138. Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Scientific reports*. 2015;5:15443.
139. Suzuki DT, Griffiths AJ. *An introduction to genetic analysis*: WH Freeman and Company.; 1976.
140. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(13):5596-601.
141. Antas PR. Crucial requirement for standardization during the development of novel recombinant BCG vaccines: Does the corresponding substrain background matter? *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2016;12(12):3099-102.
142. Angelidou A, Conti MG, Diray-Arce J, Benn CS, Shann F, Netea MG, et al. Licensed Bacille Calmette-Guérin (BCG) formulations differ markedly in bacterial viability, RNA content and innate immune activation. *Vaccine*. 2020;38(9):2229-40.
143. Ponte C, Hacker M, Moraes M, Castello-Branco L, Silva F, Antas P. The patterns of in vitro cell-death and inflammatory cytokines induced by distinct BCG vaccine strains are differentially induced in human mononuclear cells. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018;14(1):28-35.
144. Silva A, Ponte C, Antas PRZ. What a difference a strain makes! *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2019;23(7):874.
145. Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet*. 2010;375(9731):2110-9.

146. Kaufmann SH. Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity. *Trends in immunology*. 2012;33(7):373-9.
147. Lozza L, Farinacci M, Faé K, Bechtle M, Stäber M, Dorhoi A, et al. Crosstalk between human DC subsets promotes antibacterial activity and CD8+ T-cell stimulation in response to bacille Calmette-Guérin. *Eur J Immunol*. 2014;44(1):80-92.
148. Dockrell HM, Smith SG. What Have We Learnt about BCG Vaccination in the Last 20 Years? *Frontiers in immunology*. 2017;8:1134.
149. Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, et al. Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infection and immunity*. 2002;70(2):672-8.
150. Stensballe LG, Sørup S, Aaby P, Benn CS, Greisen G, Jeppesen DL, et al. BCG vaccination at birth and early childhood hospitalisation: a randomised clinical multicentre trial. *Archives of disease in childhood*. 2017;102(3):224-31.
151. Basak P, Sachdeva N, Dayal D. Can BCG vaccine protect against COVID-19 via trained immunity and tolerogenesis? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2021;43(3):e2000200.
152. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *The Journal of urology*. 1976;116(2):180-3.
153. Yamazaki-Nakashimada MA, Unzueta A, Berenise Gámez-González L, González-Saldaña N, Sorensen RU. BCG: a vaccine with multiple faces. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2020;16(8):1841-50.
154. Suttman H, Lehan N, Böhle A, Brandau S. Stimulation of neutrophil granulocytes with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. *Infection and immunity*. 2003;71(8):4647-56.
155. Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(2):277-86.
156. Beauvillain C, Cunin P, Doni A, Scotet M, Jaillon S, Loiry ML, et al. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood*. 2011;117(4):1196-204.
157. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Immune Responses to Bacillus Calmette-Guérin Vaccination: Why Do They Fail to Protect against Mycobacterium tuberculosis? *Frontiers in immunology*. 2017;8:407.
158. Murray RA, Mansoor N, Harbacheuski R, Soler J, Davids V, Soares A, et al. Bacillus Calmette Guerin vaccination of human newborns induces a specific, functional CD8+ T cell response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(8):5647-51.
159. Sebina I, Cliff JM, Smith SG, Nogaro S, Webb EL, Riley EM, et al. Long-lived memory B-cell responses following BCG vaccination. *PloS one*. 2012;7(12):e51381.
160. Cha SB, Kim WS, Kim JS, Kim H, Kwon KW, Han SJ, et al. Repeated Aerosolized-Boosting with Gamma-Irradiated Mycobacterium bovis BCG Confers Improved Pulmonary Protection against the Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis Strain HN878 in Mice. *PloS one*. 2015;10(10):e0141577.
161. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LA, Jacobs C, et al. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *Journal of innate immunity*. 2014;6(2):152-8.
162. Arts RJ, Blok BA, Aaby P, Joosten LA, de Jong D, van der Meer JW, et al. Long-term in vitro and in vivo effects of γ -irradiated BCG on innate and adaptive immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2015;98(6):995-1001.
163. Moreira J, Aragão-Filho WC, Barillas SG, Barbosa SM, Pedroza LA, Condino-Neto A. Human leucocytes response to viable, extended freeze-drying or heat-killed Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. *Scandinavian journal of immunology*. 2012;75(1):96-101.

164. Sousa-Vasconcelos Pda S, Seguin Wda S, Luz Ede S, Pinho RT. Pattern of cytokine and chemokine production by THP-1 derived macrophages in response to live or heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Moreau strain. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):809-13.
165. Estes G, Aguiló N, Julián E, Ashiru O, Ho MM, Martín C, et al. Natural Killer Anti-Tumor Activity Can Be Achieved by In Vitro Incubation With Heat-Killed BCG. *Frontiers in immunology*. 2021;12:622995.
166. Major T, Wohlleben G, Reibetanz B, Erb KJ. Application of heat killed *Mycobacterium bovis*-BCG into the lung inhibits the development of allergen-induced Th2 responses. *Vaccine*. 2002;20(11-12):1532-40.
167. Haile M, Schröder U, Hamasur B, Pawlowski A, Jaxmar T, Källenius G, et al. Immunization with heat-killed *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) in Eurocine L3 adjuvant protects against tuberculosis. *Vaccine*. 2004;22(11-12):1498-508.
168. Zhang X, Li S, Luo Y, Chen Y, Cheng S, Zhang G, et al. *Mycobacterium bovis* and BCG induce different patterns of cytokine and chemokine production in dendritic cells and differentiation patterns in CD4+ T cells. *Microbiology (Reading, England)*. 2013;159(Pt 2):366-79.
169. Fowler DW, Copier J, Wilson N, Dalgleish AG, Bodman-Smith MD. *Mycobacteria* activate $\gamma\delta$ T-cell anti-tumour responses via cytokines from type 1 myeloid dendritic cells: a mechanism of action for cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(4):535-47.
170. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6883-90.
171. Ishii K, Kurita-Taniguchi M, Aoki M, Kimura T, Kashiwazaki Y, Matsumoto M, et al. Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy. *Immunology letters*. 2005;98(2):280-90.
172. Secanella-Fandos S, Noguera-Ortega E, Olivares F, Luquin M, Julián E. Killed but metabolically active *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin retains the antitumor ability of live bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of urology*. 2014;191(5):1422-8.
173. Kato T, Bilim V, Yuuki K, Naito S, Yamanobe T, Nagaoka A, et al. Bacillus Calmette-Guerin and BCG cell wall skeleton suppressed viability of bladder cancer cells in vitro. *Anticancer research*. 2010;30(10):4089-96.
174. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *International review of cell and molecular biology*. 2019;348:1-68.
175. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*. 1973;137(5):1142-62.
176. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(4):653-60.
177. Acton SE, Astarita JL, Malhotra D, Lukacs-Kornek V, Franz B, Hess PR, et al. Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity*. 2012;37(2):276-89.
178. Fritz-Laylin LK, Lord SJ. WASP and SCAR are evolutionarily conserved in actin-filled pseudopod-based motility. 2017;216(6):1673-88.
179. Sáez PJ, Sáez JC, Lennon-Duménil AM, Vargas P. Role of calcium permeable channels in dendritic cell migration. *Current opinion in immunology*. 2018;52:74-80.
180. Weber M, Hauschild R, Schwarz J, Moussion C, de Vries I, Legler DF, et al. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6117):328-32.

181. Woodruff MC, Heesters BA, Herndon CN, Groom JR, Thomas PG, Luster AD, et al. Trans-nodal migration of resident dendritic cells into medullary interfollicular regions initiates immunity to influenza vaccine. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(8):1611-21.
182. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, Mebius RE, et al. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity*. 2009;30(2):264-76.
183. Krishnaswamy JK, Alsén S, Yrlid U, Eisenbarth SC, Williams A. Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2169.
184. Braun A, Worbs T, Moschovakis GL, Halle S, Hoffmann K, Bölter J, et al. Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nature immunology*. 2011;12(9):879-87.
185. Ulvmar MH, Werth K, Braun A, Kelay P, Hub E, Eller K, et al. The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes. 2014;15(7):623-30.
186. Levin C, Bonduelle O, Nuttens C, Primard C, Verrier B, Boissonnas A, et al. Critical Role for Skin-Derived Migratory DCs and Langerhans Cells in T(FH) and GC Responses after Intradermal Immunization. *The Journal of investigative dermatology*. 2017;137(9):1905-13.
187. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. 2018;154(1):3-20.
188. Anandasabapathy N, Breton G, Hurley A, Caskey M, Trumpfheller C, Sarma P, et al. Efficacy and safety of CDX-301, recombinant human Flt3L, at expanding dendritic cells and hematopoietic stem cells in healthy human volunteers. *Bone marrow transplantation*. 2015;50(7):924-30.
189. Lee J, Zhou YJ, Ma W. Lineage specification of human dendritic cells is marked by IRF8 expression in hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. 2017;18(8):877-88.
190. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends in immunology*. 2016;37(12):855-65.
191. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(11):6037-46.
192. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity*. 2017;46(3):504-15.
193. Schreiber G, Klinkenberg LJ, Cruz LJ, Tacke PJ, Tel J, Kreutz M, et al. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood*. 2012;119(10):2284-92.
194. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Blees H, Cabeza-Cabrerizo M, Sammicheli S, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*. 2018;172(5):1022-37.e14.
195. Chiang MC, Tullett KM, Lee YS, Idris A, Ding Y, McDonald KJ, et al. Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *European journal of immunology*. 2016;46(2):329-39.
196. Alexandre YO, Ghilas S, Sanchez C, Le Bon A, Crozat K, Dalod M. XCR1+ dendritic cells promote memory CD8+ T cell recall upon secondary infections with *Listeria monocytogenes* or certain viruses. *The Journal of experimental medicine*. 2016;213(1):75-92.
197. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, Steinfeld S, Facciotti F, Guarini P, et al. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*. 2013;122(6):932-42.
198. Leal Rojas IM, Mok WH, Pearson FE, Minoda Y, Kenna TJ, Barnard RT, et al. Human Blood CD1c(+) Dendritic Cells Promote Th1 and Th17 Effector Function in Memory CD4(+) T Cells. *Frontiers in immunology*. 2017;8:971.

199. Van Rhijn I, Ly D, Moody DB. CD1a, CD1b, and CD1c in immunity against mycobacteria. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;783:181-97.
200. Yin X, Yu H, Jin X, Li J, Guo H, Shi Q, et al. Human Blood CD1c⁺ Dendritic Cells Encompass CD5^{high} and CD5^{low} Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2017;198(4):1553-64.
201. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity*. 2019;50(1):37-50.
202. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology*. 2004;5(12):1219-26.
203. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu CI, Glaser C, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(11):6815-23.
204. Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(10):3431-9.
205. Dasgupta S, Erturk-Hasdemir D, Ochoa-Reparaz J, Reinecker HC, Kasper DL. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. *Cell host & microbe*. 2014;15(4):413-23.
206. Price JG, Idoyaga J, Salmon H, Hogstad B, Bigarella CL, Ghaffari S, et al. CDKN1A regulates Langerhans cell survival and promotes Treg cell generation upon exposure to ionizing irradiation. *Nature immunology*. 2015;16(10):1060-8.
207. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology*. 2006;7(3):265-73.
208. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and cell biology*. 2010;88(4):387-92.
209. Banchereau J, Thompson-Snipes L, Zurawski S, Blanck JP, Cao Y, Clayton S, et al. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood*. 2012;119(24):5742-9.
210. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, Luche H, Ardouin L, Grégoire C, et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(4):1751-60.
211. Campbell IK, van Nieuwenhuijze A, Segura E, O'Donnell K, Coghil E, Hommel M, et al. Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF- κ B1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(9):5468-77.
212. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(10):2097-111.
213. Satpathy AT, Kc W, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, et al. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(6):1135-52.
214. Sander J, Schmidt SV, Cirovic B, McGovern N, Papantonopoulou O, Hardt AL, et al. Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity*. 2017;47(6):1051-66.e12.
215. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2013;38(2):336-48.

216. Hohl TM, Rivera A, Lipuma L, Gallegos A, Shi C, Mack M, et al. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell host & microbe*. 2009;6(5):470-81.
217. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 2003;19(1):59-70.
218. Serbina NV, Kuziel W, Flavell R, Akira S, Rollins B, Pamer EG. Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity*. 2003;19(6):891-901.
219. Novak N, Valenta R, Bohle B, Laffer S, Haberstick J, Kraft S, et al. FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(5):949-57.
220. Thurnher M, Ramoner R, Gastl G, Radmayr C, Böck G, Herold M, et al. *Bacillus Calmette-Guérin* mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *International journal of cancer*. 1997;70(1):128-34.
221. Bollampalli VP, Harumi Yamashiro L, Feng X, Bierschenk D, Gao Y, Blom H, et al. BCG Skin Infection Triggers IL-1R-MyD88-Dependent Migration of EpCAM^{low} CD11b^{high} Skin Dendritic cells to Draining Lymph Node During CD4⁺ T-Cell Priming. *PLoS Pathog*. 2015;11(10):e1005206.
222. Morel C, Badell E, Abadie V, Robledo M, Setterblad N, Gluckman JC, et al. *Mycobacterium bovis* BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice. *European journal of immunology*. 2008;38(2):437-47.
223. Kumar P, John V, Gupta A, Bhaskar S. Enhanced survival of BCG-stimulated dendritic cells: involvement of anti-apoptotic proteins and NF-κB. 2018;7(6).
224. Bizzell E, Sia JK, Quezada M, Enriquez A, Georgieva M, Rengarajan J. Deletion of BCG Hip1 protease enhances dendritic cell and CD4 T cell responses. *Journal of leukocyte biology*. 2018;103(4):739-48.
225. Szpakowski P, Biet F, Loch C, Paszkiewicz M, Rudnicka W, Druszczyńska M, et al. Dendritic Cell Activity Driven by Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG Producing Human IL-18, in Healthy BCG Vaccinated Adults. *Journal of immunology research*. 2015;2015:359153.
226. Kowalewicz-Kulbat M, Szpakowski P. Decrease of IL-5 Production by Naive T Cells Cocultured with IL-18-Producing BCG-Pulsed Dendritic Cells from Patients Allergic to House Dust Mite. 2021;9(3).
227. Ahrens B, Gruber C, Rha RD, Freund T, Quarcoo D, Awagyan A, et al. BCG priming of dendritic cells enhances T regulatory and Th1 function and suppresses allergen-induced Th2 function in vitro and in vivo. *International archives of allergy and immunology*. 2009;150(3):210-20.
228. Choi S, Choi HG, Back YW, Park HS, Lee KI, Gurmessa SK. A Dendritic Cell-Activating Rv1876 Protein Elicits *Mycobacterium Bovis* BCG-Prime Effect via Th1-Immune Response. 2021;11(9).
229. Manickam A, Sivanandham M. *Mycobacterium bovis* BCG and purified protein derivative-induced reduction in the CD80 expression and the antigen up-take function of dendritic cells from patients with cervical cancer. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2011;159(2):413-7.
230. Bakhru P, Sirisaengtaksin N, Soudani E, Mukherjee S, Khan A, Jagannath C. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. *Cellular immunology*. 2014;287(1):53-61.

231. Gagliardi MC, Teloni R, Giannoni F, Pardini M, Sargentini V, Brunori L, et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(1):106-13.
232. Bol KF, Aarntzen EH, Pots JM, Olde Nordkamp MA, van de Rakt MW, Scharenborg NM, et al. Prophylactic vaccines are potent activators of monocyte-derived dendritic cells and drive effective anti-tumor responses in melanoma patients at the cost of toxicity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2016;65(3):327-39.
233. Noguera-Ortega E, Rabanal RM, Secanella-Fandos S, Torrents E, Luquin M, Julián E. γ Irradiated Mycobacteria Enhance Survival in Bladder Tumor Bearing Mice Although Less Efficaciously than Live Mycobacteria. *The Journal of urology*. 2016;195(1):198-205.
234. Keyser A, Troudt JM, Taylor JL, Izzo AA. BCG sub-strains induce variable protection against virulent pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection, with the capacity to drive Th2 immunity. *Vaccine*. 2011;29(50):9308-15.
235. Chevalier MF, Schneider AK, Cesson V, Dartiguenave F, Lucca I, Jichlinski P, et al. Conventional and PD-L1-expressing Regulatory T Cells are Enriched During BCG Therapy and may Limit its Efficacy. *European urology*. 2018;74(5):540-4.
236. Chometon TQ, Siqueira MDS, Sant Anna JC, Almeida MR, Gandini M, Martins de Almeida Nogueira AC. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. 2020;15(4):e0231132.
237. Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai zasshi = Japanese journal of leprosy : official organ of the Japanese Leprosy Association*. 2001;70(1):15-24.
238. Tonus MEDMM. Controle do ensaio de viabilidade da vacina BCG. 2005.
239. Oliveira J. Estudo dos mecanismos reguladores da expressão e atividade da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em células dendríticas estimuladas por Mycobacterium leprae. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz. 2017.
240. Martino A, Casetti R, Poccia F. Enhancement of BCG-induced Th1 immune response through Vgamma9Vdelta2 T cell activation with non-peptidic drugs. *Vaccine*. 2007;25(6):1023-9.
241. de Oliveira Fulco T, Andrade PR, de Mattos Barbosa MG, Pinto TG, Ferreira PF, Ferreira H, et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. *Infection and immunity*. 2014;82(9):3968-78.
242. Sajiki Y, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Nakamura H, Kato Y, et al. A TLR7 agonist activates bovine Th1 response and exerts antiviral activity against bovine leukemia virus. *Developmental and comparative immunology*. 2021;114:103847.
243. Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, Gismondo MR, Bono L, Gesu G, et al. Multicenter comparison of ESP Culture System II with BACTEC 460TB and with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(5):1378-81.
244. Brasileira F. Farmacopeia Brasileira - Produtos Biológicos. 2019;6° edição.
245. Sato PK. Estudo de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidiodomicose: expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas: Universidade de São Paulo; 2010.
246. Dubensky TW, Jr., Skoble J, Lauer P, Brockstedt DG. Killed but metabolically active vaccines. *Current opinion in biotechnology*. 2012;23(6):917-23.
247. Tsunetsugu-Yokota Y, Tamura H, Tachibana M, Ogata K, Honda M, Takemori T. Selective expansion of perforin-positive CD8+ T cells by immature dendritic cells infected with live Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria. *Journal of leukocyte biology*. 2002;72(1):115-24.

248. Menetrier-Caux C, Thomachot MC, Alberti L, Montmain G, Blay JY. IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells. *Cancer research*. 2001;61(7):3096-104.
249. Markowicz S, Engleman EG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(3):955-61.
250. Conti L, Cardone M, Varano B, Puddu P, Belardelli F, Gessani S. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. *European journal of immunology*. 2008;38(3):750-62.
251. Gogolak P, Rethi B, Szatmari I, Lanyi A, Dezso B, Nagy L, et al. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma. *Blood*. 2007;109(2):643-52.
252. Schreiber G, Tel J, Sliopen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, et al. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2010;59(10):1573-82.
253. Santos DO, Coelho JG, Neri ECL, Souza IdCC, Ponte CGG, Antas PRZ. The differential in vitro presentation of *Mycobacterium leprae* antigens by human dendritic cells is determined by the mechanism of host cell adhesion. 2016.
254. Jiang L, Liu G, Ni W, Zhang N, Jie J, Xie F, et al. The Combination of MBP and BCG-Induced Dendritic Cell Maturation through TLR2/TLR4 Promotes Th1 Activation In Vitro and Vivo. 2017;2017:1953680.
255. Khan A, Bakhru P, Saikolappan S, Das K, Soudani E, Singh CR, et al. An autophagy-inducing and TLR-2 activating BCG vaccine induces a robust protection against tuberculosis in mice. 2019;4:34.
256. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(1):338-44.
257. Chin LS. Avaliação da ativação linfocitária por diferentes combinações de células apresentadoras de antígenos. Dissertação [Mestrado em Imunologia] - Universidade de São Paulo. 2010.
258. Kawashima T, Norose Y, Watanabe Y, Enomoto Y, Narazaki H, Watari E, et al. Cutting edge: major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guérin is mediated by CD1 molecules. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(11):5345-8.
259. Sugita M, Grant EP, van Donselaar E, Hsu VW, Rogers RA, Peters PJ, et al. Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity*. 1999;11(6):743-52.
260. Sadhu C, Ting HJ, Lipsky B, Hensley K, Garcia-Martinez LF, Simon SI, et al. CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(6):1395-403.
261. Kohrgruber N, Halanek N, Gröger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, et al. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;163(6):3250-9.
262. Singh CR, Moulton RA, Armitige LY, Bidani A, Snuggs M, Dhandayuthapani S, et al. Processing and presentation of a mycobacterial antigen 85B epitope by murine macrophages is dependent on the phagosomal acquisition of vacuolar proton ATPase and in situ activation of cathepsin D. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(5):3250-9.
263. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in immunology*. 2013;4:82.
264. Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, Munguía R, Bajaña S, Meraz-Ríos MA, et al. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive

- cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2010;184(4):1765-75.
265. Farinacci M, Weber S, Kaufmann SH. The recombinant tuberculosis vaccine rBCG Δ ureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Vaccine*. 2012;30(52):7608-14.
266. Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *The Biochemical journal*. 2005;385(Pt 1):85-93.
267. Kim KD, Lee HG, Kim JK, Park SN, Choe IS, Choe YK, et al. Enhanced antigen-presenting activity and tumour necrosis factor-alpha-independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Immunology*. 1999;97(4):626-33.
268. Liu E, Law HK, Lau YL. BCG promotes cord blood monocyte-derived dendritic cell maturation with nuclear Rel-B up-regulation and cytosolic I kappa B alpha and beta degradation. *Pediatric research*. 2003;54(1):105-12.
269. von Rohrscheidt J, Petrozziello E. Thymic CD4 T cell selection requires attenuation of MHCII turnover in cortical epithelial cells through CD83. 2016;213(9):1685-94.
270. Lin W, Buscher K, Wang B, Fan Z, Song N, Li P, et al. Soluble CD83 Alleviates Experimental Autoimmune Uveitis by Inhibiting Filamentous Actin-Dependent Calcium Release in Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1567.
271. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, et al. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(12):1813-21.
272. Peckert-Maier K, Schönberg A. Pre-incubation of corneal donor tissue with sCD83 improves graft survival via the induction of alternatively activated macrophages and tolerogenic dendritic cells. 2022;22(2):438-54.
273. Giunta B, Rezai-Zadeh K, Tan J. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2010;9(2):149-55.
274. Hamilton CA, Mahan S, Entrican G, Hope JC. Interactions between natural killer cells and dendritic cells favour T helper1-type responses to BCG in calves. *Veterinary research*. 2016;47(1):85.
275. Li J, Fu L, Wang G, Subbian S, Qin C, Zhao A. Unmethylated CpG motif-containing genomic DNA fragment of *Bacillus calmette-guerin* promotes macrophage functions through TLR9-mediated activation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *Innate immunity*. 2020;26(3):183-203.
276. El-Sahrigy SAF, Rahman A, Samaha DY, Mohamed NA, Saber SM, Talkhan HA, et al. The influence of interferon- β supplemented human dendritic cells on BCG immunogenicity. *Journal of immunological methods*. 2018;457:15-21.
277. Kim YJ, Kim HJ, Kang MJ, Yu HS, Seo JH, Kim HY, et al. *Bacillus Calmette-Guérin* Suppresses Asthmatic Responses via CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells and Dendritic Cells. *Allergy, asthma & immunology research*. 2014;6(3):201-7.
278. Biagioli M, Carino A. The Bile Acid Receptor GPBAR1 Regulates the M1/M2 Phenotype of Intestinal Macrophages and Activation of GPBAR1 Rescues Mice from Murine Colitis. 2017;199(2):718-33.
279. Giffoni de Carvalho JT, Henao Agudelo JS, Baldivia DDS, Carollo CA, Silva DB, de Picoli Souza K, et al. Hydroethanolic stem bark extracts of *Stryphnodendron adstringens* impair M1 macrophages and promote M2 polarization. *Journal of ethnopharmacology*. 2020;254:112684.
280. Anis MM, Fulton SA, Reba SM, Liu Y, Harding CV, Boom WH. Modulation of pulmonary dendritic cell function during mycobacterial infection. *Infection and immunity*. 2008;76(2):671-7.

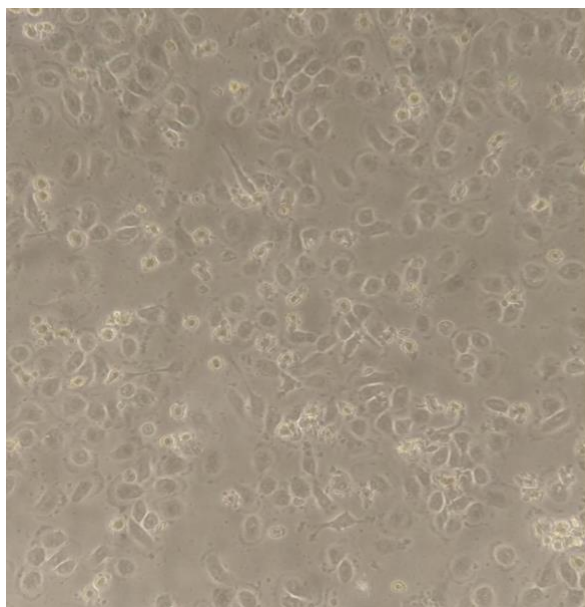
281. Sanarico N, Colone A, Grassi M, Speranza V, Giovannini D, Ciaramella A, et al. Different transcriptional profiles of human monocyte-derived dendritic cells infected with distinct strains of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Clinical & developmental immunology*. 2011;2011:741051.
282. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in immunology*. 2005;17(4):313-8.
283. Choi S, Choi HG, Shin KW, Back YW, Park HS, Lee JH, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Protein Rv3841 Activates Dendritic Cells and Contributes to a T Helper 1 Immune Response. 2018;2018:3525302.
284. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(2):910-8.
285. Almeida PE, Roque NR, Magalhães KG, Mattos KA, Teixeira L, Maya-Monteiro C, et al. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(1):97-107.
286. Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, et al. *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(1):7-17.
287. Bowdish DM, Sakamoto K, Kim MJ, Kroos M, Mukhopadhyay S, Leifer CA, et al. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2009;5(6):e1000474.
288. Hwang SA, Kruzel ML, Actor JK. Recombinant human lactoferrin modulates human PBMC derived macrophage responses to BCG and LPS. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2016;101s:S53-s62.
289. Haile M, Hamasur B, Jaxmar T, Gavier-Widen D, Chambers MA, Sanchez B, et al. Nasal boost with adjuvanted heat-killed BCG or arabinomannan-protein conjugate improves primary BCG-induced protection in C57BL/6 mice. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2005;85(1-2):107-14.
290. Gouveia ACC, Braga FG, Mota M, Silva FMC, Brugiolo ASS, Oliveira EE, et al. Enhanced expression of PD-L1 and IFN- γ on dendritic cells is associated with BCG-induced Th2 inhibition. *Cytokine*. 2017;99:163-72.
291. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(6):313-26.
292. Lagranderie M, Abolhassani M, Vanoirbeek JA, Lima C, Balazuc AM, Vargaftig BB, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin killed by extended freeze-drying targets plasmacytoid dendritic cells to regulate lung inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(2):1062-70.
293. Agle K, Vincent BG, Piper C, Belle L, Zhou V, Shlomchik W, et al. Bim regulates the survival and suppressive capability of CD8(+) FOXP3(+) regulatory T cells during murine GVHD. *Blood*. 2018;132(4):435-47.
294. Boer MC, van Meijgaarden KE, Bastid J, Ottenhoff TH, Joosten SA. CD39 is involved in mediating suppression by *Mycobacterium bovis* BCG-activated human CD8(+) CD39(+) regulatory T cells. *European journal of immunology*. 2013;43(7):1925-32.
295. Chen J, Zhou Y, Chen S, Liu M, Guo W, Wang Q, et al. Lkb1 in dendritic cells restricts CD8(+)Foxp3(+)regulatory T cells expansion in vivo. *Experimental cell research*. 2019;384(2):111650.
296. Chen S, Fang L, Guo W, Zhou Y, Yu G, Li W, et al. Control of T(reg) cell homeostasis and immune equilibrium by Lkb1 in dendritic cells. 2018;9(1):5298.

297. Luo W, Qu Z, Zhang L, Xie Y, Luo F, Tan Y, et al. Recombinant BCG::Rv2645 elicits enhanced protective immunity compared to BCG in vivo with induced ISGylation-related genes and Th1 and Th17 responses. *Vaccine*. 2018;36(21):2998-3009.

9 ANEXO

9.1 Microscopia óptica da cultura de macrófagos e moDCs

A)



B)



Anexo 1: A) Fotomicrografia de cultura de macrófagos humanos diferenciados por 6 dias de cultura. B) Fotomicrografia de cultura de moDCs humanos diferenciados por 6 dias de cultura.

9.2 Inclusão de artigo(s) publicado(s), manuscrito(s) aceito(s) ou submetidos para publicação

Durante o período do Curso de mestrado, apesar de todos os percalços e revezes, desenvolvemos estudos e efetuamos publicações em revistas científicas no LIC, como por exemplo:

[PLOS One](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231132). 2020 Apr 9;15(4):e0231132. doi: 10.1371/journal.pone.0231132. eCollection 2020.

A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells

Thaize Quiroga Chometon ^{1, 2}, Mariana da Silva Siqueira ¹, Julie Carmo Sant Anna ¹,
Matheus Rogério Almeida ¹, Mariana Gandini ³, Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira ^{1, 2},
Paulo Renato Zuquim Antas ¹

Affiliations + expand

DOI:10.1371/journal.pone.0231132

Time to face the proofs: the BCG Moreau vaccine promotes superior inflammatory cytokine profile *in vitro* when compared with Russia, Pasteur, and Danish strains

Andreon Santos Machado da Silva¹, Lawrence Henrique Paz Albuquerque¹,
Carlos Germano Garrido de Ponte¹, Matheus Rogério de Almeida¹,
Sandra Elizabete Ribeiro de Faria¹, Mariana da Silva Ribeiro²,
Evelyn Nunes Goulart da Silva Pereira², Paulo Renato Zuquim Antas¹

DOI:10.1080/21645515.2021.1989913