

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE TREINADA INDUZIDA  
POR BCG EM MONÓCITOS HUMANOS E DE CAMUNDONGOS**

**TAÍS CAROLINA PAES BRONZATO**

**GISLANE LELIS VILELA DE OLIVEIRA**

**DUNIA DEL CARMEN RODRIGUEZ SOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP  
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bronzato, Taís Carolina Paes.

Avaliação da resposta imune treinada induzida por BCG em monócitos humanos e de camundongos / Taís Carolina Paes Bronzato. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Gislane Lelis Vilela de Oliveira

Coorientador: Dunia Del Carmen Rodriguez Soto

Capes: 21100004

1. BCG. 2. Imunidade treinada. 3. Monócitos. 4. Resposta imune.

Palavras-chave: BCG; Imunidade treinada; Monócitos; Resposta imune inata.

TAÍS CAROLINA PAES BRONZATO

## **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE TREINADA INDUZIDA POR BCG EM MONÓCITOS HUMANOS E DE CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentado a Universidade Estadual  
Paulista, como parte das exigências para  
a obtenção do título de bacharel, do curso  
de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 03 de dezembro de 2024.

### **BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 **GISLANE LELIS VILELA DE OLIVEIRA**  
Data: 03/12/2024 15:05:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gislane Lelis Vilela de Oliveira  
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Setor de Microbiologia e  
Imunologia / IBB / UNESP

Documento assinado digitalmente  
 **MARCIA GUIMARAES DA SILVA**  
Data: 04/12/2024 15:06:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Guimarães da Silva  
Departamento de Patologia / FMB / UNESP

Documento assinado digitalmente  
 **LUCIANE ALARCAO DIAS MELICIO**  
Data: 04/12/2024 14:45:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Alarcão Dias Melicio  
Departamento de Patologia / FMB / UNESP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente aos meus pais, Nívea e Tales, que sempre me apoiaram, incentivaram minha educação e estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Sou eternamente grata pelo suporte constante ao longo da minha trajetória acadêmica, pela dedicação em me proporcionar uma formação de qualidade e por acreditarem no meu potencial para alcançar meus sonhos e ser uma cientista. Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha avó, Madalena, que não apenas estudou comigo, mas ouviu atentamente sobre cada capítulo de Patologia ou Genética que eu precisava revisar para as provas. Mesmo estando em outra cidade, seu apoio constante foi indispensável ao longo da minha graduação.

Às minhas amigas biomédicas, Julia, Luise, Mariana e Sara, que formaram uma verdadeira rede de apoio durante a graduação. Agradeço pelos momentos compartilhados nesses quatro anos e espero que nossa amizade continue por toda a vida.

À Dra. Dunia, cuja orientação no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan representou um marco essencial em minha trajetória acadêmica. Realizar meu Estágio Curricular Obrigatório no Instituto Butantan sempre foi um sonho, desde antes da graduação, e sou imensamente grata à Dra. Dunia por seu suporte ao longo do estágio e pela orientação na elaboração deste trabalho.

À UNESP, pelo ambiente acadêmico enriquecedor que foi essencial para a minha formação. A infraestrutura, as aulas e a biblioteca contribuíram de maneira significativa para meu aprendizado, e tive a honra de aprender com grandes profissionais, explorando e me aprofundando na área da Biomedicina.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Butantan pelo apoio financeiro concedido por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), que viabilizou a realização deste trabalho.

## RESUMO

A vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), além de ser amplamente utilizada na prevenção da tuberculose, tem demonstrado capacidade de induzir imunidade treinada, um fenômeno em que o sistema imunológico inato é "treinado" para responder de forma mais eficaz a patógenos não relacionados. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade da BCG de induzir imunidade treinada em monócitos humanos e em monócitos murinos. Monócitos foram diferenciados a partir de células hematopoéticas CD34<sup>+</sup> do sangue de cordão umbilical humano e treinados com diferentes concentrações de BCG. Paralelamente, monócitos murinos diferenciados a partir de células da medula óssea extraídas de fêmures e tíbias foram treinados com diferentes cepas de BCG. Após 24 horas de estimulação, e com a confirmação da diferenciação dos monócitos, as análises revelaram que a estimulação com BCG induziu uma produção aumentada de citocinas, como IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Os monócitos treinados mostraram uma resposta imune aprimorada após re-estimulação com antígenos heterólogos, evidenciando a eficácia da BCG na indução de imunidade treinada. Este estudo destaca o potencial da BCG não apenas na prevenção da tuberculose, mas também como uma ferramenta para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para diversas doenças infecciosas.

## SUMÁRIO

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                    | <b>1</b>  |
| <b>2 METODOLOGIA.....</b>                                                                    | <b>2</b>  |
| 2.1 Obtenção de Células Hematopoéticas Humanas do Sangue de Cordão Umbilical .....           | 2         |
| 2.2 Diferenciação das Células CD34 <sup>+</sup> em Monócitos.....                            | 2         |
| 2.3 Avaliação da Diferenciação dos Monócitos por Citometria de Fluxo .....                   | 3         |
| 2.4 Cultura dos Microrganismos para Ensaios de Imunidade Treinada .....                      | 3         |
| 2.5 Ensaio de Imunidade Treinada “ <i>in vitro</i> ” em Monócitos Humanos.....               | 3         |
| 2.6 Uso de Camundongos como Modelo experimental para Estudo de Imunidade Treinada ...        | 4         |
| 2.7 Extração de Medula Óssea para Obtenção de Monócitos de Camundongos.....                  | 4         |
| 2.8 Cultura de Células L929 .....                                                            | 5         |
| 2.9 Diferenciação dos Monócitos de Medula Óssea de Camundongos .....                         | 5         |
| 2.10 Ensaio de Imunidade treinada em Monócitos de Medula Óssea de Camundongos.....           | 6         |
| 2.11 Análise Estatística .....                                                               | 6         |
| <b>3 RESULTADOS .....</b>                                                                    | <b>7</b>  |
| 3.1 Diferenciação das Células CD34 <sup>+</sup> do Cordão Umbilical em Monócitos .....       | 7         |
| 3.2 Produção de Citocinas por Monócitos Humanos Após Estimulação Primária e Secundária ..... | 7         |
| 3.3 Estimulação de Monócitos Humanos com Diferentes Cepas e Concentrações de BCG .....       | 9         |
| 3.4 Diferenciação das Células de Medula Óssea de Camundongos em Monócitos .....              | 9         |
| 3.5 Estimulação de Monócitos Murinos com Diferentes Cepas de BCG.....                        | 10        |
| 3.6 Estimulação de Monócitos Murinos com Antígenos Heterólogos.....                          | 11        |
| <b>4 DISCUSSÃO .....</b>                                                                     | <b>13</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>                                                                      | <b>15</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                      | <b>16</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG) desempenha um papel essencial na saúde pública mundial e no controle da tuberculose. Desenvolvida há mais de um século como uma vacina bacteriana atenuada derivada do *Mycobacterium bovis*, a BCG é atualmente a única vacina disponível contra a tuberculose e integra o Programa Nacional de Imunizações (PNI) no Brasil, destacando sua importância contínua para a saúde coletiva (AHMED et al., 2023). Além de sua eficácia na prevenção da tuberculose, evidências recentes sugerem que a BCG pode conferir proteção inespecífica contra outras infecções, revelando um efeito imunomodulador que transcende sua aplicação original (KLEINNIJENHUIS et al., 2012).

Este fenômeno de proteção heteróloga é atribuído à capacidade da BCG de induzir um processo conhecido como imunidade treinada. A imunidade treinada refere-se a um mecanismo pelo qual o sistema imunológico inato é "treinado" para responder de forma mais eficaz a uma gama de patógenos após a exposição a certos estímulos. Este efeito é mediado por alterações epigenéticas e metabólicas nas células do sistema imunológico inato, como demonstrado em estudos prévios (NETEA et al., 2011). Essas modificações resultam em uma resposta imune aprimorada e mais rápida frente a reinfecções. Modelos experimentais em camundongos mostraram que a vacinação com BCG pode proteger contra infecções secundárias por patógenos não relacionados (KANNO et al., 2022).

A vacinação com BCG também tem sido associada à indução de uma resposta imune inata capaz de conferir proteção contra patógenos além do bacilo da tuberculose, conforme demonstrado por estudos epidemiológicos relatados pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A caracterização da imunidade treinada in vitro em células humanas do sistema imune inato pode contribuir para a elucidação dos mecanismos imunes envolvidos nessa proteção contra patógenos não relacionados. A exposição ao BCG está associada a um aumento na produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, e a uma melhora na atividade fagocítica dos macrófagos. Desde sua introdução, o conceito de imunidade treinada tem ampliado o entendimento das respostas imunológicas inatas e contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais (NETEA et al., 2020). O objetivo deste estudo foi estabelecer um modelo experimental de imunidade treinada e avaliar a capacidade de monócitos treinados, diferenciados a partir de amostras de sangue de cordão umbilical humano e de medula óssea de camundongos, em responder de forma mais eficaz a antígenos heterólogos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Obtenção de Células Hematopoéticas Humanas do Sangue de Cordão Umbilical

Os estudos com monócitos provenientes do sangue de cordão umbilical humano foram realizados em colaboração com a Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco, Professora Associada do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) / Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP), responsável pela Disciplina de Obstetrícia e Presidente da Comissão de Pesquisa da FMUSP. As amostras foram obtidas através de doação das parturientes (Plataforma Brasil, CEP/CONEP, CAAE: 52981321.3.0000.5467, Parecer nº 5.861.884/2023).

### 2.2 Diferenciação das Células CD34<sup>+</sup> em Monócitos

Para a obtenção das células progenitoras hematopoéticas (CD34<sup>+</sup>), utilizou-se sangue de cordão umbilical humano. Inicialmente, foi empregado o kit de seleção positiva para células CD34 (EasySep Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II, StemCell Technologies), que isola células-tronco hematopoéticas. O processo começou com o pré-enriquecimento das células-tronco embrionárias provenientes do sangue do cordão umbilical, utilizando um coquetel de anticorpos do kit que se ligaram às células indesejadas e aos glóbulos vermelhos. Em seguida, a solução contendo as células foi centrifugada em um meio de gradiente de densidade a uma velocidade de 1200 g por 10 minutos, formando um *pellet* com as células ligadas aos anticorpos, enquanto as células pré-enriquecidas permaneceram na parte superior do tubo. As células de interesse foram transferidas para um novo tubo, onde foram marcadas com anticorpos e partículas magnéticas. O tubo foi colocado em um dispositivo magnético EasySep, permitindo a separação das células CD34<sup>+</sup>.

As células CD34<sup>+</sup> isoladas foram cultivadas a 37°C em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e mantidas em expansão por 7 dias. Após esse período, foi adicionado um suplemento de expansão mieloide (StemSpan Myeloid Expansion Supplement II, StemCell Technologies) à cultura para induzir a diferenciação em monócitos CD14<sup>+</sup>, com as células mantidas em cultura por mais 7 dias sob as mesmas condições.

## 2.3 Avaliação da Diferenciação dos Monócitos por Citometria de Fluxo

Para confirmar a diferenciação, foi realizada a fenotipagem das células por citometria de fluxo, utilizando um citômetro de fluxo FACS Canto II, com os seguintes anticorpos conjugados: CD14-PerCP (marcador de monócitos), CD33-PE (marcador de células mieloides) e CD45-APC (marcador de leucócitos) (BD Biosciences) (ARREY et al., 2019). Os dados foram adquiridos e analisados utilizando o software FlowJo (BD Biosciences). As células que apresentaram positividade para CD14, CD33 e CD45 foram classificadas como monócitos.

## 2.4 Cultura dos Microrganismos para Ensaio de Imunidade Treinada

O BCG Moreau foi cultivado em meio Middlebrook 7H9 (Difco, USA), suplementado com 0,5% de glicerol, 0,05% de Tween 80 (Sigma-Aldrich®, USA) e 10% de OADC (ácido oleico-albumina-dextrose-catalase; BBL, USA). As culturas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem uma densidade óptica (DO) de 0,6. Após esse período, as células foram lavadas com 10% de glicerol e armazenadas a -80 °C até o uso.

A *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi cultivada em meio LB (5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de triptona e 10 g/L de NaCl) a 37 °C até atingir uma DO de 0,6. A *Candida albicans* (ATCC 90112) foi cultivada em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de dextrose) e mantida a 30 °C até alcançar uma DO de 0,6. As culturas de *S. aureus* e *C. albicans* foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, e 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) e ressuspensas em 10% de glicerol. Aliquotas foram armazenadas a -80 °C até o uso. Antes do uso, cada microrganismo foi diluído em série e cultivado em placas de Petri com o meio de cultura apropriado para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC).

## 2.5 Ensaio de Imunidade Treinada “*in vitro*” em Monócitos Humanos

Os monócitos CD14<sup>+</sup> foram cultivados em placas de 96 poços após contagem em câmara de Neubauer, com uma densidade de 1x10<sup>5</sup> células por poço, e estimulados com diferentes proporções de BCG Moreau liofilizado por um período de 24 horas. A concentração de BCG foi ajustada para alcançar uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1:1 e 1:1, onde, no

primeiro caso, para cada célula foram adicionadas 0,1 UFC de BCG, e no segundo caso, foi adicionada 1 UFC de BCG por célula. Após o período de estimulação, os sobrenadantes dos cultivos foram coletados e congelados para análises posteriores.

As células foram incubadas por mais 6 dias, em um período de descanso (*resting*), e posteriormente re-estimuladas por 24 horas com antígenos heterólogos, especificamente lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli* O55:B5; Sigma-Aldrich) na concentração de 1 ng por poço, ou *Candida albicans* na concentração de  $1 \times 10^5$  por poço. Decorridas 24 horas de re-estimulação, os sobrenadantes foram novamente coletados e analisados para a produção de citocinas inflamatórias, utilizando a técnica de Citometria de Beads Acopladas (CBA human inflammatory kit, BD Biosciences).

## **2.6 Uso de Camundongos como Modelo experimental para Estudo de Imunidade Treinada**

Camundongos fêmeas C57BL/6 de quatro a sete semanas foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) sob o protocolo 6191010422/2022.

## **2.7 Extração de Medula Óssea para Obtenção de Monócitos de Camundongos**

Os camundongos foram submetidos à eutanásia sob anestesia geral por injeção intraperitoneal de uma combinação de xilazina e quetamina (0,1 mL/10 g). Em seguida, os fêmures e tíbias foram extraídos, e a medula óssea foi lavada com meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) utilizando uma seringa posicionada na cavidade medular do osso. A suspensão obtida foi filtrada e, após centrifugação, a 200 g por 10 minutos, o *pellet* celular foi ressuspensionado em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich®) previamente inativado e uma solução antibiótica-antimicótica (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL), constituindo o meio completo, com adição de 30% de meio condicionado de células L929 como fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos-macrófagos).

As células foram distribuídas em placas de seis poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 6 dias, com troca de meio no 4º dia. Para a remoção de células não aderentes, as placas foram lavadas com PBS, e as células aderentes foram destacadas com um raspador de células e RPMI-1640 frio. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio completo, contadas em uma câmara de Neubauer, ajustadas para 1x10<sup>6</sup> células/mL e distribuídas em placas de 96 poços (100 µL/poço).

## **2.8 Cultura de Células L929**

As células fibroblásticas da linhagem L929, provenientes de camundongos, foram originalmente obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) e foram cultivadas em uma concentração de 1x10<sup>5</sup> células/mL em meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich®) previamente inativado, além de uma solução antibiótica-antimicótica (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL), resultando em um meio completo. As células foram subcultivadas a cada 48 horas, e o sobrenadante rico em M-CSF foi armazenado.

Após a coleta do sobrenadante, as células foram lavadas com meio RPMI 1640 sem soro, descartando-se o sobrenadante da lavagem. Para destacar as células da garrafa, foi adicionado 1 mL de tripsina (solução de tripsina 0,05%-EDTA 0,02%), e as células foram incubadas por quatro minutos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionado meio completo para inativar a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspendido em meio completo e redistribuído em garrafas de cultura celular.

## **2.9 Diferenciação dos Monócitos de Medula Óssea de Camundongos**

A adição do meio condicionado por células L929 é uma prática de diferenciação de monócito amplamente utilizada (BOLTZ-NITULESCU et al., 1987), visto que secretam um fator de crescimento de monócitos, o M-CSF (MARIM et al., 2010), diferenciando as células da medula óssea em monócitos derivados da medula óssea (BMDM), quando suplementadas no meio de cultura. Desta forma, uma alíquota das células da medula óssea foi utilizada para confirmar a diferenciação em monócitos, empregando os marcadores anti-CD11b conjugado

com PE e anti-F4/80 conjugado com Pacific Blue. Os dados foram coletados e analisados utilizando o software FlowJo (BD Biosciences). As células que demonstraram dupla positividade para CD11b e F4/80 foram identificadas como monócitos.

## **2.10 Ensaio de Imunidade treinada em Monócitos de Medula Óssea de Camundongos**

Após o cultivo dos monócitos derivados da medula óssea ( $1 \times 10^6$  células/mL), as células foram estimuladas com BCG a uma MOI de 0,1:1 ( $10^4$  UFC:  $10^5$  células/poço) por 24h. O sobrenadante foi coletado para análise da produção de citocinas inflamatórias na resposta primária, utilizando a técnica de Citometria de Beads Acopladas (CBA mouse inflammatory kit, BD Biosciences). Em seguida, as bactérias foram removidas através de lavagens com RPMI-1640, e um novo meio foi adicionado. As células permaneceram em período de descanso (*resting*) por 6 dias, com troca de meio no 4º dia. No sétimo dia, os monócitos foram desafiados com *Staphylococcus aureus* ( $1 \times 10^6$ /mL) e *Candida albicans* ( $1 \times 10^6$ /mL) por 24h. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para avaliar a produção de citocinas inflamatórias na resposta à re-estimulação, novamente empregando a técnica de CBA.

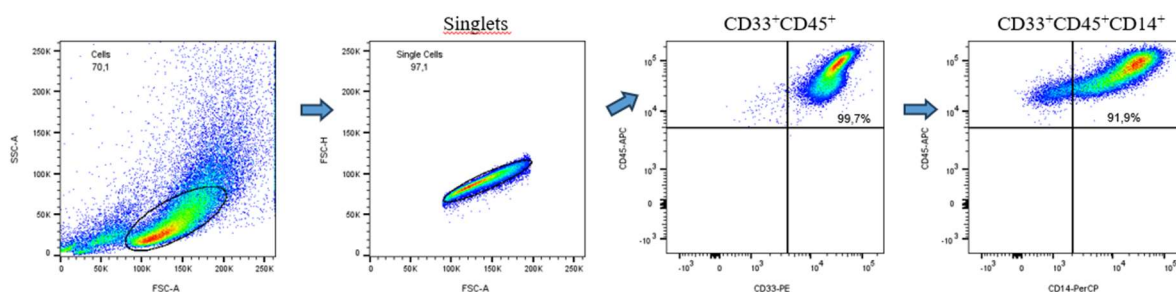
## **2.11 Análise Estatística**

Para a análise estatística, foram efetuadas comparações entre os grupos utilizando o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (duas caudas) e a ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi conduzida com o software GraphPad Prism, versão 7.04.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Diferenciação das Células CD34<sup>+</sup> do Cordão Umbilical em Monócitos

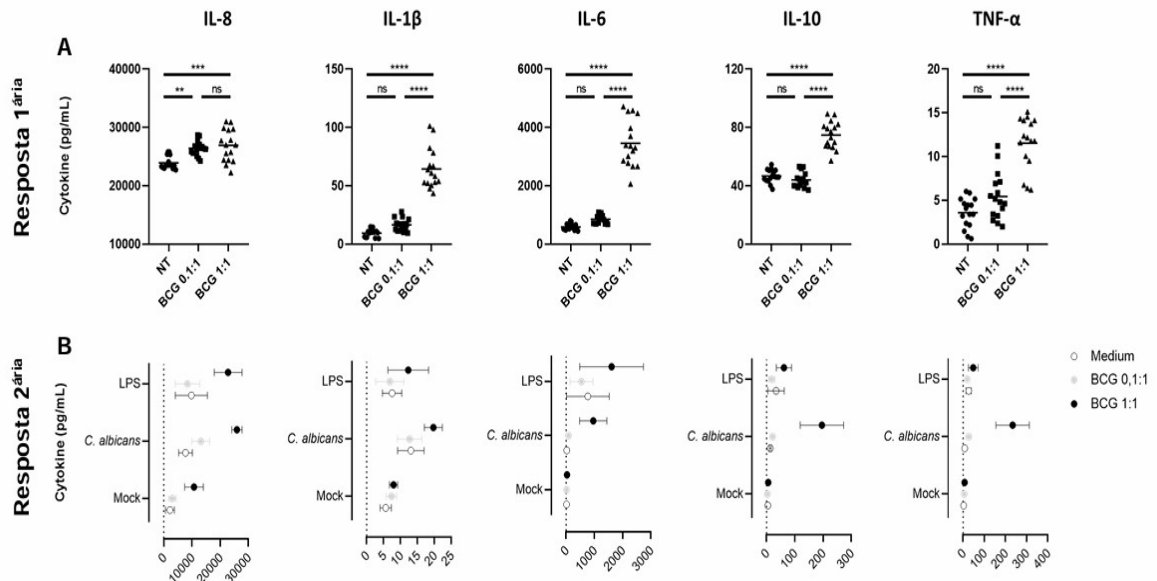
A estratégia de *gate* aplicada na análise por citometria de fluxo permitiu avaliar a diferenciação das células CD34<sup>+</sup> provenientes do sangue do cordão umbilical em monócitos. A seleção de células *singlets*, seguida pela identificação da população CD33<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, confirmou que 99,7% da população leucocitária era composta por células mieloides. Dentro dessa população, 91,9% foram identificados como monócitos (CD33<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>), comprovando que as células CD34<sup>+</sup> se diferenciaram efetivamente em monócitos CD14<sup>+</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Estratégia de *gate* para confirmar a diferenciação das células do sangue do cordão umbilical humano em monócitos. Após 14 dias de cultura de expansão e diferenciação, as células CD34<sup>+</sup> do sangue do cordão umbilical foram diferenciadas em monócitos. As células positivas para CD14, CD33 e CD45 foram consideradas monócitos.

#### 3.2 Produção de Citocinas por Monócitos Humanos Após Estimulação Primária e Secundária

No que se refere à produção de citocinas inflamatórias pelos monócitos humanos estimulados com BCG e posteriormente re-estimulados com antígenos heterólogos, observou-se que, na resposta primária, a estimulação das células com BCG em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 foi capaz de induzir um aumento significativo das principais citocinas inflamatórias, incluindo IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  (Figura 2A).

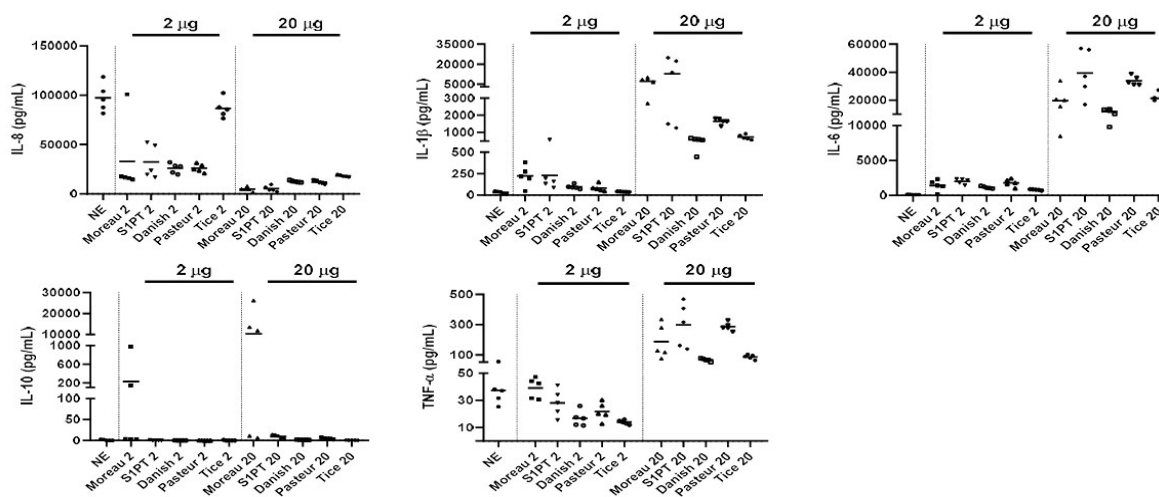


**Figura 2.** Resposta primária e secundária de monócitos humanos estimulados com BCG e re-estimulados com antígenos heterólogos. Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram estimulados com BCG (MOI 0,1:1 e 1:1) por 24 horas (A) e, após 6 dias de descanso, foram re-estimulados com LPS ou *Candida albicans* por 24 horas (B). A produção de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) foi determinada utilizando Cytometric Bead Array (CBA). Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . NS = não significativo; NT = não estimuladas.

Após o período de *resting*, a re-estimulação dos monócitos com antígenos heterólogos induziu uma liberação ainda maior dessas citocinas nas células previamente treinadas com BCG na maior concentração (MOI 1:1) (Figura 2B). Na condição de MOI 0,1:1, a produção de citocinas inflamatórias também foi observada, embora em menor quantidade comparada à condição de MOI 1:1.

### 3.3 Estimulação de Monócitos Humanos com Diferentes Cepas e Concentrações de BCG

Em um experimento preliminar, cinco cepas de BCG (Moreau, recombinante rBCG-S1PT, Danish, Pasteur e Tice) foram testadas quanto à ativação de monócitos com diferentes concentrações de BCG (Figura 3). Todas as cepas induziram a produção de IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ , embora em níveis variados. A concentração de 20  $\mu$ g de BCG foi a que resultou na maior produção dessas citocinas. Além disso, constatou-se que a concentração de 2  $\mu$ g foi suficiente para induzir uma quantidade significativa dessas citocinas, demonstrando que doses menores ainda podem ser efetivas na ativação de monócitos.

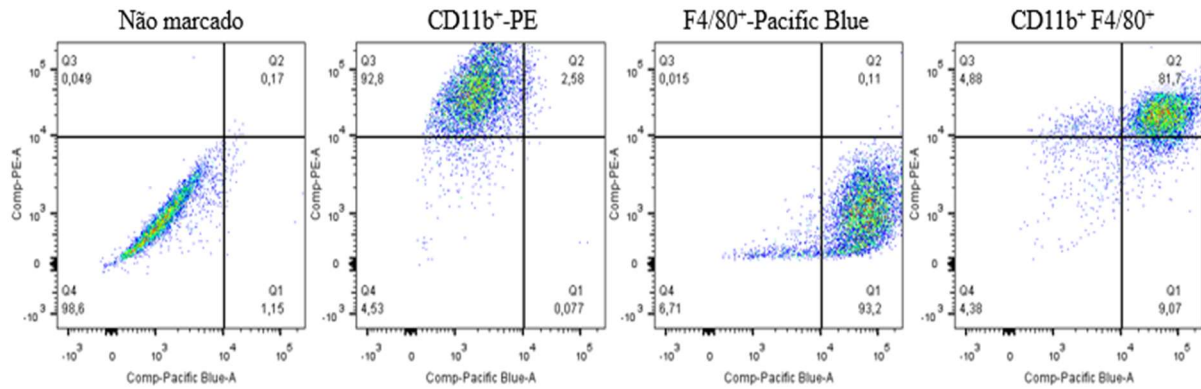


**Figura 3.** Produção de citocinas inflamatórias por monócitos humanos estimulados com diferentes cepas de BCG. Monócitos ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram estimulados com cinco cepas diferentes de BCG liofilizado (Moreau, S1PT, Danish, Pasteur, Tice) em duas concentrações (2  $\mu$ g e 20  $\mu$ g) por 24 horas. A produção de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) foi determinada a partir dos sobrenadantes utilizando Cytometric Bead Array (CBA). NE = não estimuladas.

### 3.4 Diferenciação das Células de Medula Óssea de Camundongos em Monócitos

A fim de confirmar a diferenciação das células de medula óssea de camundongos em monócitos, foram utilizados anticorpos conjugados, sendo o anti-CD11b conjugado com PE e o anti-F4/80 conjugado com Pacific Blue. Por meio da citometria de fluxo, foram identificadas as populações de células marcadas com CD11b, marcador característico de monócitos/macrófagos, e de células marcadas com F4/80, marcador específico de monócitos

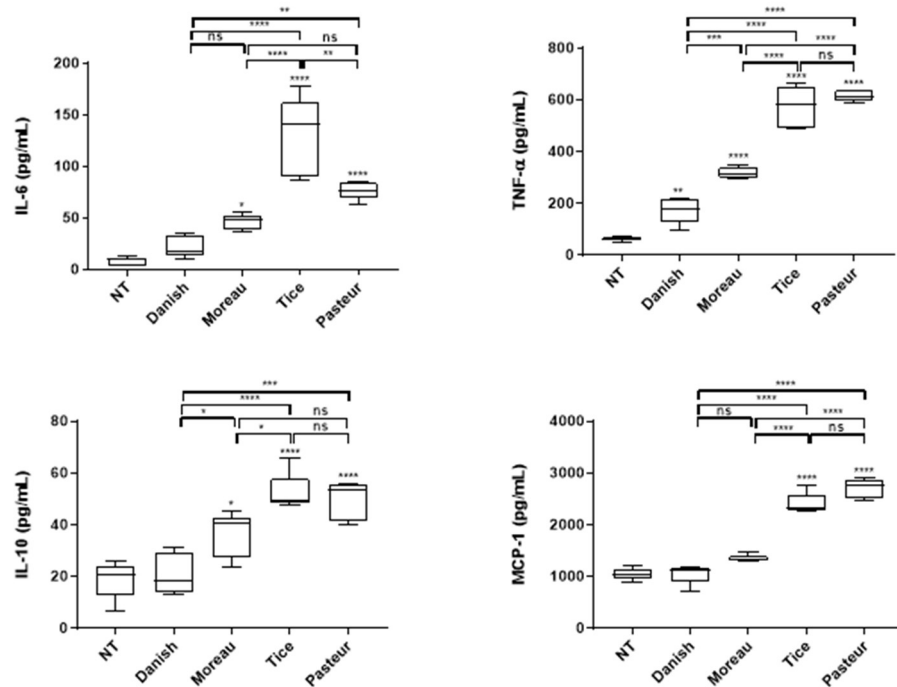
murinos. Dessa forma, foi possível confirmar células duplamente positivas para CD11b e F4/80, indicando que 81,7% das células se diferenciaram em monócitos.



**Figura 4.** Estratégia de Gate para confirmar a diferenciação das células de medula óssea de camundongos em monócitos. Foram utilizados os seguintes anticorpos conjugados: anti-CD11b-PE e anti-F4/80-Pacific Blue. As células duplamente positivas foram consideradas monócitos.

### 3.5 Estimulação de Monócitos Murinos com Diferentes Cepas de BCG

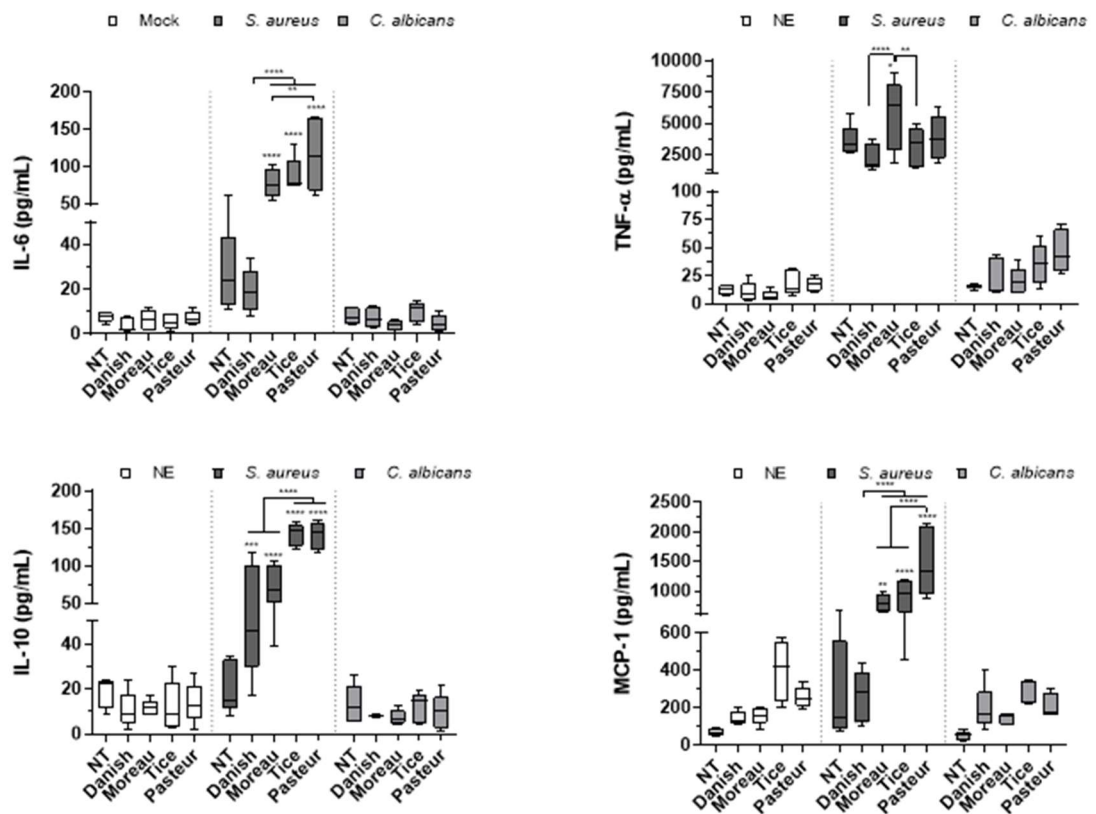
Avaliou-se a produção de citocinas inflamatórias por monócitos murinos após estimulação primária com diferentes cepas de BCG (Danish, Moreau, Tice e Pasteur). Todas as cepas foram capazes de induzir a produção de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e MCP-1, embora com variações nas intensidades de resposta. Particularmente, as cepas Tice e Pasteur se destacaram, apresentando um aumento significativo na indução dessas citocinas em comparação com as demais.



**Figura 5.** Produção de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e MCP-1) por monócitos de camundongos diferenciados a partir de células da medula óssea, após estimulação com diferentes cepas de BCG (Danish, Moreau, Tice e Pasteur). A avaliação da produção das citocinas foi determinada utilizando Cytometric Bead Array (CBA). Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . NS = não significativo; NT = não estimuladas.

### 3.6 Estimulação de Monócitos Murinos com Antígenos Heterólogos

Por fim, avaliou-se a capacidade dos monócitos previamente estimulados com diferentes cepas de BCG (Danish, Moreau, Tice e Pasteur) de responder a uma segunda estimulação com os antígenos heterólogos *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Todas as cepas foram capazes de induzir a produção de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e MCP-1) após essa estimulação secundária, embora a intensidade das respostas tenha variado entre as cepas e os diferentes antígenos. A re-estimulação com *S. aureus* promoveu uma resposta aumentada de IL-6, particularmente nos monócitos previamente estimulados com as cepas Moreau, Tice e Pasteur. Em relação ao TNF- $\alpha$ , a re-estimulação com *S. aureus* resultou em uma produção elevada, destacando-se a cepa Moreau, enquanto a resposta a *C. albicans* foi inferior. A produção de IL-10 foi mais pronunciada após a re-estimulação com *S. aureus*. Já para MCP-1, observou-se uma produção acentuada em resposta a *S. aureus*, superando a indução observada com *C. albicans*. Em geral, as cepas não apresentaram diferenças significativas na indução de citocinas inflamatórias após a estimulação com *C. albicans*.



**Figura 6.** Produção de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e MCP-1) por monócitos de camundongos, diferenciados a partir de células da medula óssea e previamente estimulados com diferentes cepas de BCG (Danish, Moreau, Tice e Pasteur), após reestimulação com os antígenos heterólogos *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A avaliação da produção das citocinas foi determinada utilizando Cytometric Bead Array (CBA). Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . NS = não significativo; NT = não estimuladas.

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a literatura existente sobre os efeitos da imunidade treinada induzida pela vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). A observação de uma produção aumentada de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , em monócitos humanos treinados com BCG, confirma a capacidade da BCG de aprimorar a resposta imune em células do sistema imunológico inato. Esses resultados estão alinhados com o estudo de Kleinnijenhuis et al. (2014), que demonstrou que a BCG pode induzir mudanças semelhantes em células NK, sugerindo que a ativação do sistema imunológico inato pode ser um mecanismo comum de proteção não específica. Além disso, o aumento na produção de citocinas após a re-estimulação com antígenos heterólogos reforça a ideia de que a BCG tem a capacidade de "treinar" monócitos para uma resposta mais eficaz a uma ampla variedade de patógenos. Este conceito é reforçado por Arts et al. (2018), que evidenciaram que a vacinação com BCG protege contra infecções virais experimentais em humanos, por meio da indução de citocinas associadas à imunidade treinada.

A variabilidade observada na produção de citocinas entre diferentes cepas e concentrações de BCG é suportada pelo estudo de Angelidou et al. (2020), que discute a heterogeneidade das respostas imunes induzidas por diferentes cepas de BCG. Esses resultados sugerem que diferentes cepas de BCG podem modular a produção de citocinas de maneira distinta, evidenciando uma variabilidade na resposta imune inata que pode influenciar a indução de imunidade treinada. Tanto no modelo de monócitos humanos quanto no modelo murino, a resposta ao primeiro estímulo indicou que todas as cepas de BCG foram capazes de induzir a produção de citocinas inflamatórias, mas a intensidade dessa produção variou entre as cepas.

Ao avaliar a produção de citocinas inflamatórias pelos monócitos humanos, observa-se que a estimulação primária com BCG induziu um aumento significativo na produção de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , confirmando a capacidade do BCG em ativar a resposta inflamatória de monócitos. Os resultados indicam uma resposta mais intensa com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1, sugerindo que a quantidade de BCG influencia diretamente a magnitude da resposta inflamatória primária. Esse fenômeno de resposta dependente da concentração destaca a importância de otimizar o MOI para alcançar uma ativação ideal. Após o período de *resting*, a re-estimulação com antígenos heterólogos evidenciou um efeito de memória imunológica nos monócitos treinados, especialmente na condição de MOI 1:1, onde se observou um aumento ainda mais acentuado na produção de citocinas inflamatórias. Quanto às concentrações de BCG, a dose de 20  $\mu$ g foi a mais eficaz na

indução das citocinas inflamatórias pelos monócitos humanos, no entanto, os resultados obtidos indicaram que até mesmo uma dose mais baixa de BCG (2 µg) foi capaz de induzir respostas imunológicas significativas.

No modelo murino, as cepas Tice e Pasteur se destacaram por induzirem uma produção mais elevada de IL-6 e TNF- $\alpha$ , sugerindo um potencial inflamatório mais intenso, provavelmente associado à ativação de vias pró-inflamatórias em monócitos treinados. Já o aumento na expressão de IL-10, aponta para uma modulação anti-inflamatória, essencial para o controle da resposta inflamatória, evitando danos teciduais excessivos. Essa regulação, consistente com o estudo de Netea et al. (2016), reflete um equilíbrio entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias promovido por diferentes cepas de BCG, especialmente Tice e Pasteur. A expressão elevada de MCP-1 em resposta a essas cepas sugere que elas também favorecem o recrutamento de monócitos para o local da inflamação, potencializando a mobilização celular para combater infecções secundárias. Esses resultados sugerem que diferentes cepas de BCG podem modular a produção de citocinas de maneira distinta, evidenciando uma variabilidade na resposta imune inata que pode influenciar a indução de imunidade treinada.

A resposta ao segundo estímulo no modelo murino revelou que a produção de algumas citocinas inflamatórias foi particularmente elevada em resposta a *Staphylococcus aureus* em comparação com *Candida albicans*, sugerindo que, embora todas as cepas induzam uma resposta inflamatória, a resposta dessas citocinas pode variar dependendo da natureza do antígeno secundário. Esses achados evidenciam que a estimulação primária com diferentes cepas de BCG pode modular a resposta imunológica subsequente a antígenos heterólogos, destacando a capacidade dos monócitos treinados de reconhecer e responder de forma mais eficaz a infecções secundárias, como também relatado por Koeken et al. (2022).

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo reforça a importância da vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) tanto na prevenção da tuberculose quanto como um potente indutor de imunidade treinada, capaz de amplificar a resposta do sistema imunológico inato a diferentes patógenos. Foi estabelecido um protocolo eficaz para a diferenciação e cultura de monócitos a partir de sangue de cordão umbilical humano, que permitiu avaliar o efeito do treinamento com BCG. Tanto os monócitos diferenciados a partir do sangue de cordão umbilical quanto os monócitos diferenciados a partir da medula óssea de camundongos foram treinados com BCG e demonstraram uma produção aumentada de citocinas inflamatórias, tanto na resposta primária quanto após a re-estimulação com antígenos heterólogos. Estes resultados confirmam que os parâmetros ótimos de estimulação com BCG foram determinados com sucesso e que a re-estimulação dos monócitos confirmou o treinamento das células, evidenciando a capacidade da BCG de induzir uma resposta imune aprimorada.

Esses resultados mostram que é possível induzir imunidade treinada em monócitos humanos e murinos, contribuindo para o crescente corpo de evidências que apoia o uso da BCG como uma abordagem promissora para a imunização não específica. Essas descobertas têm implicações significativas para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais e terapêuticas que integrem a proteção conferida pela imunidade treinada, expandindo o papel da BCG na saúde pública para além da prevenção da tuberculose e destacando seu potencial como uma vacina multifacetada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, et al. BCG revaccination in adults enhances pro-inflammatory markers of trained immunity along with anti-inflammatory pathways. *iScience*, v. 26, n. 10, p. 107889–107889, out. 2023.

ANGELIDOU, et al. BCG as a case study for precision vaccine development: Lessons from vaccine heterogeneity, trained immunity, and immune ontogeny. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 11 mar. 2020.

ARREY, F. et al. Humanized mouse model mimicking pathology of human tuberculosis for in vivo evaluation of drug regimens. *Frontiers in Immunology, Lausanne*, v. 10, p. 89, 31 jan. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00089

ARTS, et al. BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction of cytokines associated with trained immunity. *Cell Host & Microbe*, v. 23, n. 1, p. 89-100.e5, jan. 2018.

BOLTZ-NITULESCU, G. et al. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 41, n. 1, p. 83–91, jan. 1987.

KANNO, et al. Recombinant BCG expressing the subunit 1 of pertussis toxin induces innate immune memory and confers protection against non-related pathogens. *Vaccines*, v. 10, n. 2, p. 234–234, fev. 2022.

KLEINNIJENHUIS, et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 43, p. 17537–17542, set. 2012.

KLEINNIJENHUIS, et al. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. *Clinical Immunology*, v. 155, n. 2, p. 213–219, dez. 2014.

KOEKEN et al. Plasma metabolome predicts trained immunity responses after antituberculosis BCG vaccination. *PLoS Biology*, v. 20, n. 9, p. e3001765–e3001765, 12 set. 2022.

MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. e15263–e15263, dez. 2010.

NETEA, M. G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 20, n. 6, p. 375–388, 4 mar. 2020.

NETEA, M. G. et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, v. 352, n. 6284, 21 abr. 2016.

NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; MEER, J. W. M. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe*, v. 9, n. 5, p. 355–361, maio 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). SAGE meeting of April 2014: background documents. Disponível em: [https://terrance.who.int/mediacentre/data/sage/SAGE\\_Docs\\_Ppt\\_Apr2014/SAGE\\_Yellow\\_Book\\_Apr\\_2014.pdf](https://terrance.who.int/mediacentre/data/sage/SAGE_Docs_Ppt_Apr2014/SAGE_Yellow_Book_Apr_2014.pdf). Acesso em: 28 ago. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record: Relevé épidémiologique hebdomadaire. [S.l.]: [s.n.], 2018. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/260306/WER9308.pdf?sequence=1>. Acesso em: 03 nov. 2024.