

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



**INI**

Instituto Nacional de Infectologia  
Evandro Chagas

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional De Infectologia Evandro Chagas  
Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Yasmim Sampaio da Costa

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM MACRÓFAGOS HUMANOS  
INFECTADOS POR CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
CIRCULANTES NO BRASIL:**

Evolução da virulência da cepa RD<sup>rio</sup> durante 20 anos de circulação

Rio de Janeiro

2021

YASMIM SAMPAIO DA COSTA

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM MACRÓFAGOS HUMANOS  
INFECTADOS POR CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
CIRCULANTES NO BRASIL:**

Evolução da virulência da cepa RD<sup>rio</sup> durante 20 anos de circulação

Dissertação, apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

Orientadora: Dra. Valeria Cavalcanti Rolla

Coorientador: Dr. Eric Henrique Roma de Lima

Rio de Janeiro

2021

da Costa, Yasmim Sampaio.

Estudo da ativação do inflamassoma em macrófagos humanos infectados por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes no Brasil: Evolução da virulência da cepa RDRio durante 20 anos de circulação / Yasmim Sampaio da Costa. - Rio de Janeiro, 2021.

81 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2021.

Orientadora: Valeria Cavalcanti Rolla.

Co-orientador: Eric Henrique Roma.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. RDRio. 4. THP-1. 5. Inflamassoma. I. Título.

YASMIM SAMPAIO DA COSTA

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM MACRÓFAGOS HUMANOS  
INFECTADOS POR CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
CIRCULANTES NO BRASIL:**

Evolução da virulência da cepa RD<sup>rio</sup> durante 20 anos de circulação

Dissertação, apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

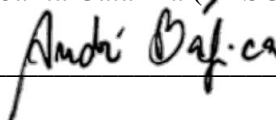
Rio de Janeiro, dezenove de outubro de dois mil e vinte e um.

Orientadora: Dra. Valeria Cavalcanti Rolla, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Coorientador: Dr. Eric Henrique Roma de Lima, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Banca examinadora:

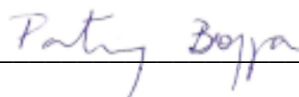
André Luiz Barbosa Báfica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).



Philip Noel Suffys, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).



Patricia Torres Bozza Viola, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).



Com carinho, para minha mãe Aline e meu avô Neilton, meus verdadeiros exemplos de família e amor. Se estou aqui hoje eu devo a vocês.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Aline, minha amiga, meu porto seguro, meu guia. Que jamais mediu esforços para que este e muitos outros sonhos se tornassem realidade. Essa conquista é nossa.

À minha família, pelo incentivo e por sempre vibrar comigo a cada conquista. Obrigada por me inspirarem tanto e me fazerem acreditar que nossos sonhos são possíveis e que podemos ir cada vez mais longe. Família, com vocês ao meu lado tudo se torna mais fácil.

À Andreia, colega de equipe, que poderia ser facilmente confundida com co-orientadora, mesmo tendo mil e uma outras obrigações. Por todos os ensinamentos e direcionamentos essenciais para o andamento do projeto. Por todas as vezes que me ajudou com aqueles cálculos difíceis. Por toda paciência quando parava o que estava fazendo para me explicar a mesma coisa pela terceira vez. Pela sua serenidade e por ser a nossa calma no meio do caos. Sem você esse projeto não seria possível.

À minha orientadora Valeria, por se mostrar sempre disponível para qualquer coisa que eu precisasse.

Ao meu co-orientador Eric, por ser um pesquisador incrível, e por acreditar em mim para realizar o projeto.

À Patrícia Bozza, por revisar o trabalho, pela parceria, e por contribuir com críticas e sugestões que foram essenciais para as melhorias e desenvolvimento desta dissertação.

Ao “time TB”: Andreia, Julia e Gabi. Por todo companheirismo, amizade, paciência e união. Pelas risadas e todos os momentos de descontração que tornaram essa caminhada mais leve. Passamos por muito, mas sobrevivemos. Sentirei falta dessa equipe no meu dia a dia.

À Glória, por ter aberto as portas do seu laboratório. Por todo apoio e dedicação para com os membros do Lab-Imuno.

À Giselle, pela companhia e amizade durante todo esse tempo de Lab-Imuno.

À Ana Tereza, pelas conversas e conselhos. Por tornar os dias no Lab-Imuno sempre divertidos com seu jeito único de ser e com suas histórias sempre tão engraçadas.

À Nati, que deixou o Lab-Imuno mas não deixou nossos corações. Por toda ajuda e parceria na hora de padronizar aquela técnica super complicada.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, por terem cedido as amostras da cepa RDRio. Vocês foram essenciais para o projeto.

Ao Marcos do Laboratório de Micologia, por disponibilizar o leitor de ELISA, além de outros materiais quando precisamos. Por ter ajudado a solucionar alguns problemas que enfrentamos no meio do caminho.

Ao Otacílio e todos os integrantes da plataforma de qPCR do HPP/Fiocruz, por terem nos ajudado quando nosso equipamento de qPCR ficou ruim. Obrigada pela receptividade e paciência.

Ao INI, por disponibilizar a estrutura onde este projeto foi realizado.

Ao INI e ao Programa INOVA Fiocruz, pelo financiamento do projeto, e à Fiocruz pela bolsa de mestrado.

À todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho com suporte técnico, profissional ou pessoal. Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

Atualmente, a tuberculose é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, afetando aproximadamente 10 milhões de pessoas anualmente. No Brasil, a linhagem RDRio de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é a mais predominante entre os casos de tuberculose e tem sido associada ao desenvolvimento de doença grave, manifestada através da formação de cavitações pulmonares, além de fácil disseminação pela alta carga bacilar em indivíduos com a forma ativa da doença. Apesar da gravidade da doença causada por RDRio, não há estudos demonstrando como ocorre a interação de cepas dessa linhagem com as células do sistema imune. Uma importante via de ativação da inflamação na infecção por Mtb é o inflamassoma, que atua na eliminação da bactéria, e na indução de mecanismos de morte celular em células infectadas. Neste trabalho investigamos como isolados clínicos de RDRio de circulação antiga e recente promovem a modulação da resposta inflamatória de macrófagos humanos de linhagem THP-1, através da ativação de inflamassomas. Células THP-1 foram infectadas com as cepas RDRio e H37Rv durante 6, 24 e 48h, e após cada tempo foram avaliados a carga bacilar; expressão de genes envolvidos na formação do inflamassoma; liberação de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18; e morte celular. Observamos que a RDRio de circulação recente (RDRio-Rec) apresentou maior capacidade de infecção do que a RDRio de circulação antiga (RDRio-Ant) ( $p < 0,05$ ). Entretanto, a RDRio-Ant induziu maior expressão os genes IL-1 $\beta$  e AIM2 em 48h de infecção em relação a RDRio-Rec ( $p < 0,05$  e  $p < 0,05$ ) e H37Rv ( $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ ). Em 48h de infecção as duas RDRio levaram a um aumento na morte das células THP-1 infectadas em relação a H37Rv ( $p < 0,001$ ). Também houve alta liberação de IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes celulares em 4 e 48h de infecção com a RDRio-Ant ( $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ ) e RDRio-Rec ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ). Concluímos que RDRio ativa inflamassomas, resultando em uma resposta inflamatória exacerbada em células THP-1, com consequente morte celular e disseminação bacteriana para o meio extracelular. Além disso, podemos associar as diferenças observadas nas respostas induzidas por cada cepa de RDRio a pressões evolutivas sofridas por esta cepa ao longo de 20 anos de circulação no Brasil, que influenciaram para que a RDRio se tornasse mais virulenta.

Descritores: Tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*. RDRio. THP-1. Inflamassoma.



## ABSTRACT

Currently, tuberculosis is one of the main public health problems in the world, affecting approximately 10 million people annually. In Brazil, RDRio lineage of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is responsible for most cases of tuberculosis and has been associated with the development of severe disease, manifested through the formation of pulmonary cavitations, in addition to easy dissemination due to the high bacillary load in individuals with the active form of the disease. Despite the seriousness of the disease caused by RDRio, there are no studies showing how this strain could modulate the inflammatory response. In this work we investigate how old and recent RDRio clinical isolates promote the modulation of the inflammatory response of human macrophages derived from THP-1 cell lineage, through the activation of inflammasomes. THP-1 cells were infected with the RDRio and H37Rv strains and after 6, 24 and 48 hours of infection, bacillary load, expression of genes involved in inflammasome formation, release of IL-1 $\beta$  and IL-18, and cell death were measured. A recent isolate of RDRio strain (RDRio-Rec) showed higher infection rate compared to an old RDRio isolate (RDRio-Old) after 4h of infection ( $p < 0.05$ ). However, RDRio-Old induced higher expression of *IL-1 $\beta$*  and *AIM2* mRNAs after 48h compared to RDRio-Rec ( $p < 0.05$ ) and H37Rv strains ( $p < 0.001$ ) in the infected cells. In addition, both RDRio strains led to an increase in the cell death of infected THP-1 cells compared to H37Rv ( $p < 0.001$ ) at the same time point. RDRio-Old infected cells showed higher IL-1 $\beta$  release at 4 and 48 hours of infection compared to H37Rv strain ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). RDRio-Rec infected cells also showed higher secretion IL-1 $\beta$  at 4 and 48 hours of infection compared to H37Rv strain ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively). Taken together, the results showed that RDRio activates inflammasomes, resulting in an exacerbated inflammatory response in THP-1 cells with consequent cell death. Furthermore, the differences observed in the responses induced by each RDRio strain might be associated with evolutionary pressures suffered by this strain over 20 years of circulation in Brazil, influencing in the modulation of inflammatory response.

Descriptors: Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*. RDRio. THP-1. Inflammasome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> - Principais causas de morte em todo o mundo em 2016. As mortes por tuberculose entre pessoas HIV-positivas são mostradas em cinza. ....	16
<b>Fig. 2</b> - Taxas estimadas de incidência de tuberculose, 2019.....	17
<b>Fig. 3</b> - Série temporal da incidência de tuberculose no Estado.....	18
<b>Fig. 4</b> - Frequência casos de TB todas as formas, segundo sexo e faixa etária (A) e raça/cor (B), em residentes do estado do Rio de Janeiro em 2018.....	18
<b>Fig. 5</b> - Definição e frequência global das sub-linhagens da linhagem 4.....	19
<b>Fig. 6</b> - Proporções da sublinhagem LAM específicas de cada país .....	20
<b>Fig. 7</b> - Diagrama mostrando os genes deletados ou alterados na derivação do LSP de RDRio .....	21
<b>Fig. 8</b> - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> RDRio e sua associação com MDR-TB.....	23
<b>Fig. 9</b> - Ciclo de vida patogênico de <i>M. tuberculosis</i> .....	26
<b>Fig. 10</b> - Mecanismos imunológicos importantes na manutenção da tuberculose latente .....	28
<b>Fig. 11</b> - Ativação e sinalização de IL-1 .....	30
<b>Fig. 12</b> - Transcrição de pró-IL-1 $\beta$ e ativação de IL-1 $\beta$ .....	32
<b>Fig. 13</b> - Atividade de formação de poros de membrana do domínio gasdermina-N .....	33
<b>Fig. 14</b> - Efeitos antimicrobianos da piroptose.....	35
<b>Fig. 15</b> - Ativação de inflamassomas canônicos e não canônicos por bactérias .....	36
<b>Fig. 16</b> - Modelo de amplificação de sinal por filamentos ASC .....	37
<b>Fig. 17</b> - Organização do domínio e montagem básica do inflamassoma.....	38
<b>Fig. 18</b> - Ativação do inflamassoma NLRP3 .....	40
<b>Fig. 19</b> - Triagem de RNAi de componentes do inflamassoma durante a infecção por <i>Mtb.</i> ..	41
<b>Fig. 20</b> - qPCR dos genes NLRP3, AIM2, IL-1 $\beta$ e ASC. ....	52
<b>Fig. 21</b> - CFU extracelular e intracelular.....	54
<b>Fig. 22</b> - qPCR dos genes NLRP3, AIM2 e IL-1 $\beta$ . ....	55
<b>Fig. 23</b> - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$ e AIM2. ....	56
<b>Fig. 24</b> - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$ e ASC. ....	57
<b>Fig. 25</b> - CFU extracelular e intracelular.....	58
<b>Fig. 26</b> - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$ , AIM2 e ASC. ....	59
<b>Fig. 27</b> - Liberação de LDH por células THP-1 infectadas com <i>Mtb.</i> ....	59
<b>Fig. 28</b> - Liberação de IL-1 $\beta$ e IL-18 nos sobrenadantes celulares de células THP-1 infectadas com <i>Mtb.</i> .....	60
<b>Fig. 29</b> - CFU extracelular e intracelular.....	61
<b>Fig. 30</b> - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$ , AIM2 e ASC. ....	63
<b>Fig. 31</b> - Liberação de LDH por células THP-1 infectadas com <i>Mtb.</i> ....	63
<b>Fig. 32</b> - Liberação de IL-1 $\beta$ e IL-18 nos sobrenadantes celulares de células THP-1 infectadas com <i>Mtb.</i> .....	64

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Características demográficas e clínicas associadas a RDRio M. tuberculosis: resultados de regressão logística múltipla <sup>a</sup> .....	23
<b>Tabela 2</b> - Análise multivariada dos fatores epidemiológicos, clínicos, microbiológicos e radiológicos associados à presença de deleção RDRio em 429 pacientes com tuberculose ....	24
<b>Tabela 3</b> - Dados sociodemográficos, clínicos, radiológicos e bacteriológicos para pacientes com tuberculose pulmonar no momento do diagnóstico .....	25

## LISTA DE SIGLAS

<b>7-AAD</b>	7-aminoactinomicina
<b>AG 85</b>	Antígeno 85
<b>AIM2</b>	Ausente no Melanoma 2
<b>ASC</b>	Proteína semelhante à partícula associada à apoptose contendo um CARD
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BAAR</b>	Bacilo álcool-ácido resistente
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CARD</b>	Domínio de recrutamento de caspases
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CFU</b>	Unidade formadora de colônia
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>DAMP</b>	Padrões moleculares associados ao dano
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>ESAT-6</b>	Alvo antigênico secretório inicial de 6 kDa
<b>EtBr</b>	Brometo de etídio
<b>FIIND</b>	Domínio de função para localizar
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IFI16</b>	Proteína 16 induzível por IFN- $\gamma$
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon <i>gama</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 <i>beta</i>
<b>LAM</b>	Latino-americano e Mediterrânea
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LRR</b>	Repetições ricas em leucina
<b>MDR</b>	Multirresistente à medicamentos
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MTC</b>	Complexo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NEK7</b>	Quinase 7 relacionada a NIMA
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NLRC4</b>	Proteína 4 contendo os domínios NOD-, LRR- e CARD
<b>NLRP1</b>	Proteína 1 contendo os domínios NOD-, LRR- e pirina
<b>NOD</b>	Domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo
<b>NOS2</b>	Óxido nítrico sintase 2
<b>OADC</b>	Albumina Dextrose Catalase
<b>PAMP</b>	Padrões moleculares associados ao patógeno
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>PGL</b>	Glicolipídeo fenólico derivado de policetídeo sintase
<b>PI</b>	Iodeto de propídio
<b>PITs</b>	Armadilhas induzidas por poros
<b>PMA</b>	Phorbol 12-miristato 13-acetato
<b>PYD</b>	Domínio de pirina
<b>RIG-I</b>	Gene 1 indutível por ácido retinoico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNI</b>	Intermediários reativos de nitrogênio
<b>ROI</b>	Intermediários reativos de oxigênio

<b>SNP</b>	Polimorfismos de nucleotídeo único
<b>T3SS</b>	Sistema de secreção bacteriana do tipo 3
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento <i>beta</i>
<b>TLR</b>	Receptor do tipo <i>Toll</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
<b>XDR</b>	Extensivamente resistente à medicamentos

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	14
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
1.1. Epidemiologia da tuberculose.....	16
1.2. RDRio de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	19
1.3. Resposta imune inata e adaptativa durante a tuberculose pulmonar.....	25
1.4. IL-1 $\beta$ e IL-18.....	29
1.5. Piroptose .....	33
1.6. Inflamassomas.....	35
1.7. NLRP3 .....	39
1.8. AIM2.....	42
2. JUSTIFICATIVA .....	44
3. OBJETIVO GERAL.....	46
3.1. Objetivos específicos .....	46
4. MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS .....	47
4.1. Desenho de Estudo.....	47
4.2. Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	48
4.3. Cultivo de células da linhagem THP-1 e diferenciação em macrófagos .....	48
4.4. Padronização da ativação de inflamassomas nas células THP-1 .....	49
4.5. Experimentos de infecção com os isolados clínicos .....	49
4.6. Extração de DNA e RNA.....	49
4.7. Quantificação da carga bacteriana por qPCR .....	50
4.8. CFU.....	50
4.9. qPCR.....	50
4.10. Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) .....	51
4.11. ELISA .....	51
4.12. Análise estatística.....	51
5. PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	52
5.1 Análise da indução da ativação de inflamassomas em células THP-1 .....	52
5.2 Experimento 1 .....	53
5.2.1 Quantificação da carga bacteriana por CFU .....	53
5.2.2 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb .....	54
5.3 Experimento 2.....	55
5.3.1 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb .....	55

5.4 Experimento 3.....	56
5.4.1 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb .....	56
5.5 Experimento 4.....	57
5.5.1 Quantificação da carga bacteriana por CFU .....	57
5.5.2 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb .....	58
5.5.3 Ensaio de liberação de LDH.....	59
5.5.4 Ensaio de ELISA para IL-1 $\beta$ e IL-18.....	60
6. RESULTADOS .....	61
6.1. Quantificação da carga bacteriana por CFU .....	61
6.2. Micobactérias de sub-linhagem RDRio induzem maior expressão de genes do complexo de inflamassoma em células THP-1 infectadas.....	62
6.3. Micobactérias de sub-linhagem RDRio induzem o aumento de morte em células THP-1 .....	63
6.4. Liberação de IL-1 $\beta$ e IL-18 nos sobrenadantes celulares .....	64
7. DISCUSSÃO .....	65
8. CONCLUSÕES .....	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

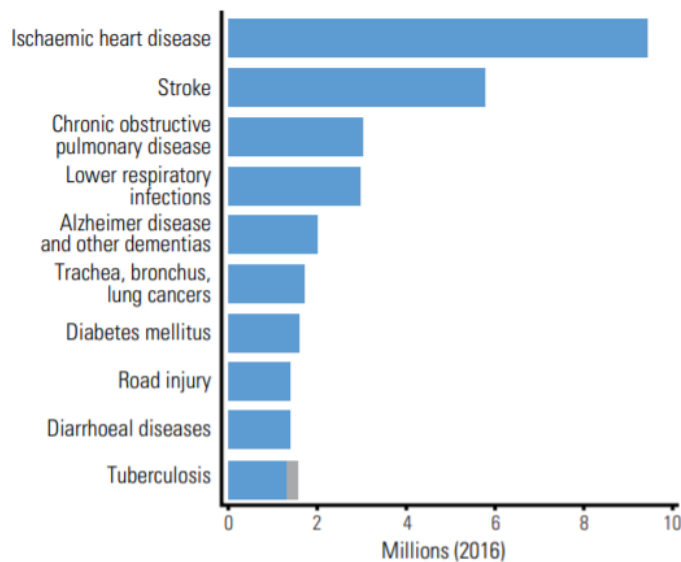
## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Epidemiologia da tuberculose

Atualmente, a tuberculose constitui um problema de saúde pública e é a causa de significativa morbidade e mortalidade, principalmente em regiões onde há maior índice de pobreza e desemprego, e a educação em saúde ainda é precária (CORBETT et al., 2003). A vulnerabilidade, estigma, marginalização e discriminação são situações comuns que cercam pessoas afetadas por essa doença (Global tuberculosis report 2020).

Estima-se que 1/4 da população mundial esteja infectada com tuberculose (Global tuberculosis report 2020). Apesar de ser uma doença antiga, está entre as 10 maiores causas de morte e lidera o ranking de mortes por apenas um agente infeccioso, estando acima de HIV/AIDS (Fig. 1) (Global tuberculosis report 2020).

**Fig. 1** - Principais causas de morte em todo o mundo em 2016. As mortes por tuberculose entre pessoas HIV-positivas são mostradas em cinza.



**Fonte:** Global tuberculosis report 2020.

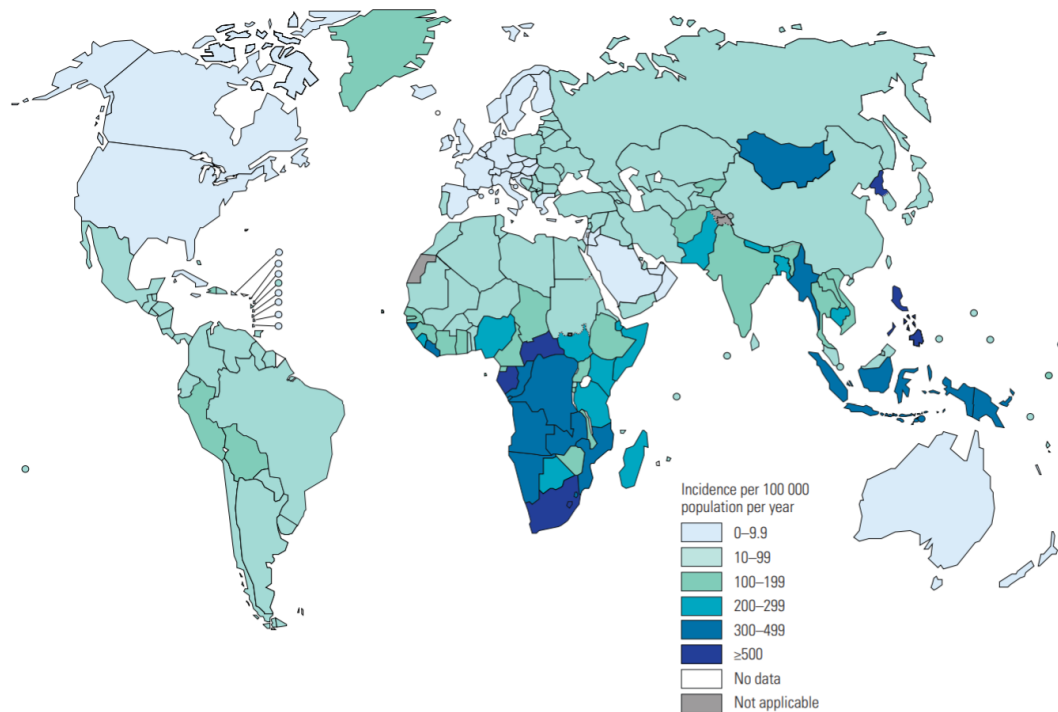
\*Este é o último ano para o qual estimativas para todas as causas estão atualmente disponíveis.

A tuberculose afeta pessoas de todas as idades, porém é mais comum entre homens adultos, que em 2019 somaram 56% de todos os casos, enquanto mulheres adultas representaram apenas 32% dos casos (Global tuberculosis report 2020). Além disso, fatores de risco como HIV, desnutrição, diabetes, hábitos de fumo e consumo de bebidas alcoólicas podem aumentar as chances de desenvolvimento da doença (Global tuberculosis report 2020).



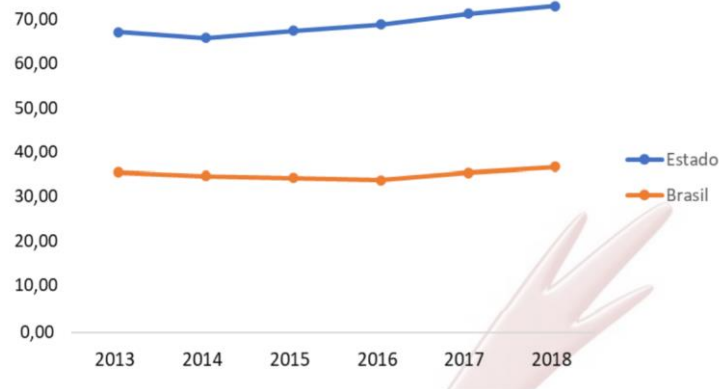
Segundo dados do Global tuberculosis report 2020, o Brasil tem, atualmente, cerca de 211 milhões de habitantes e encontra-se entre os 30 países com alta carga de tuberculose. Em 2018, foi estimada uma incidência de 96 mil casos da doença no país (Fig. 2), além de 4,9 mil mortes entre indivíduos HIV negativos e 1,8 mil mortes entre indivíduos HIV positivos (Global tuberculosis report 2020).

**Fig. 2 -** Taxas estimadas de incidência de tuberculose, 2019



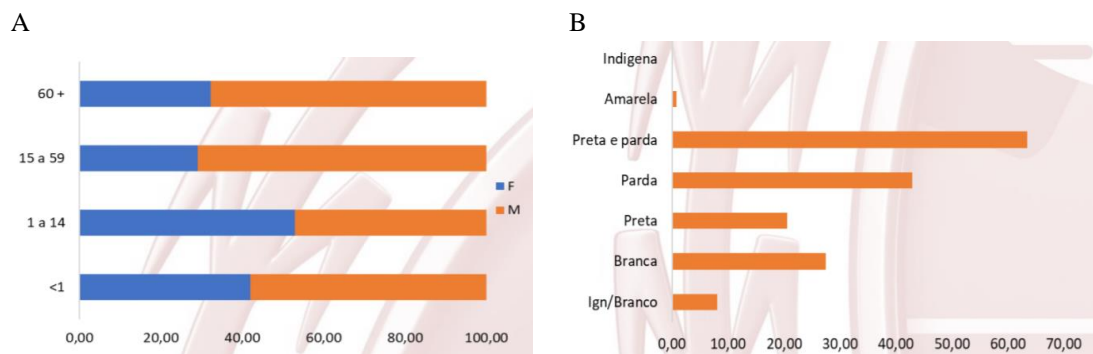
**Fonte:** Global tuberculosis report 2020.

Assim como no Brasil, o Rio de Janeiro vem sofrendo um aumento na incidência de casos de tuberculose desde 2015 (SES et al., 2020). Porém, esse número é duas vezes maior no Rio de Janeiro do que no Brasil inteiro (SES et al., 2020). Dados coletados entre 2013 e 2018 apontam um aumento de 6 casos/100 mil habitantes no estado do Rio de Janeiro, e um aumento de 2 casos/100 mil habitantes no país (Fig. 3) (SES et al., 2020).

**Fig. 3** - Série temporal da incidência de tuberculose no Estado

**Fonte:** SES et al., 2020.

É importante ressaltar que a incidência de casos no Rio de Janeiro atinge, em sua maior parte, homens com 15 a 59 anos (Fig. 4A) e pessoas de cor preta ou parda (Fig. 4B) (SES et al., 2020). O mesmo padrão é observado nos números de óbito, que são predominantes em homens (76,99%) e pessoas de raça/cor preta ou parda (69,32%) (SES et al., 2020).

**Fig. 4** - Frequência casos de TB todas as formas, segundo sexo e faixa etária (A) e raça/cor (B), em residentes do estado do Rio de Janeiro em 2018.

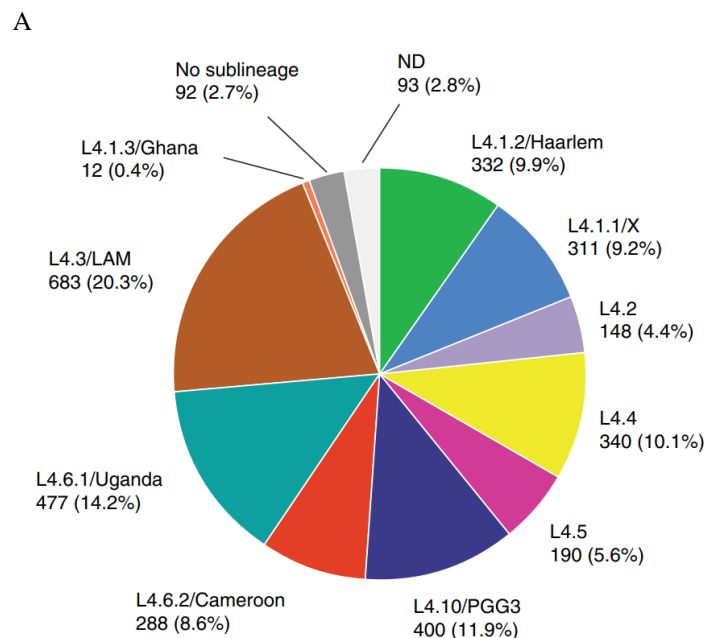
**Fonte:** SES et al., 2020.

O estado do Rio concentra a maior taxa de mortalidade de tuberculose entre os estados do Brasil (SES et al., 2020). Em 2018, foram registrados 730 óbitos por tuberculose no Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) (4,25 óbitos/ 100 mil habitantes) (SES et al., 2020). Esses números podem estar relacionados com o fato de que a tuberculose é fortemente associada a pobreza e, no Brasil, a distribuição racial de riqueza é evidente.

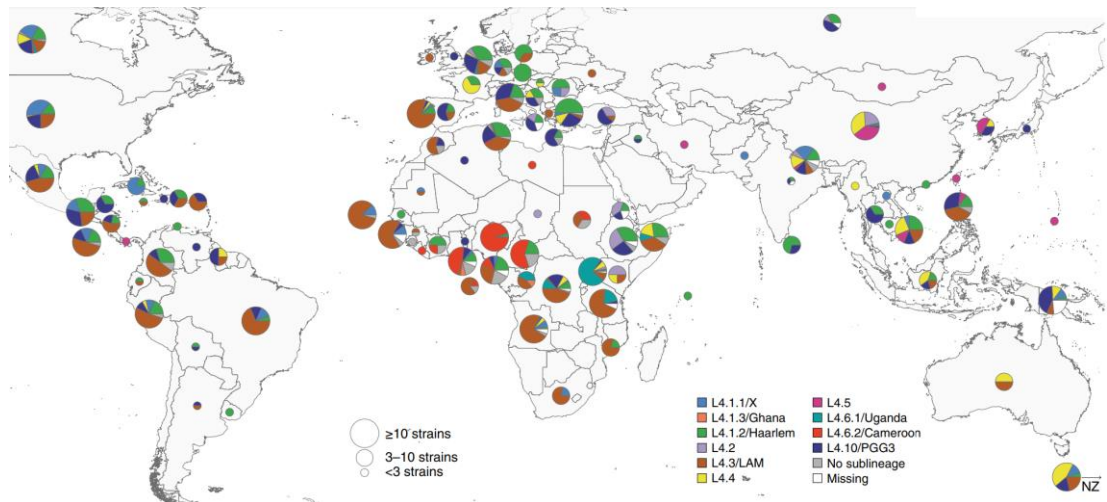
## 1.2. RDRio de *Mycobacterium tuberculosis*

RDRio é a causa predominante de tuberculose no Brasil (LAZZARINI et al., 2008). RDRio foi observada pela primeira vez por Lazzarini et al. (2007), em um estudo que tinha como objetivo inicial a aplicação de um protocolo de reação em cadeia de polimerase (PCR) baseado em deleção genômica para diferenciação de isolados do complexo de Mtb (MTC). Durante o estudo de Lazzarini et al. (2007), foi observado um novo polimorfismo de sequência longa (LSP) entre os isolados que faziam parte de uma importante sub-linhagem da família Latino-americano e do Mediterrâneo (LAM). A família LAM é um membro da linhagem Euro-Americana de Mtb e apresenta a maior frequência global (20.3%) entre as linhagens de Mtb, seguido pelas famílias L4.6.1/Uganda (14.2%), L4.10/PGG3 (11.9%), L4.4 (10.1%) e L4.1.2/Haarlem (9.9%), segundo a análise feita por (STUCKI et al., 2016) (Fig. 5A e B). Dados obtidos por Stucki et al. (2016) mostram uma alta proporção da família LAM circulante no Brasil, bem como em países da África e Oceania (Fig. 6).

**Fig. 5** - Definição e frequência global das sub-linhagens da linhagem 4



B

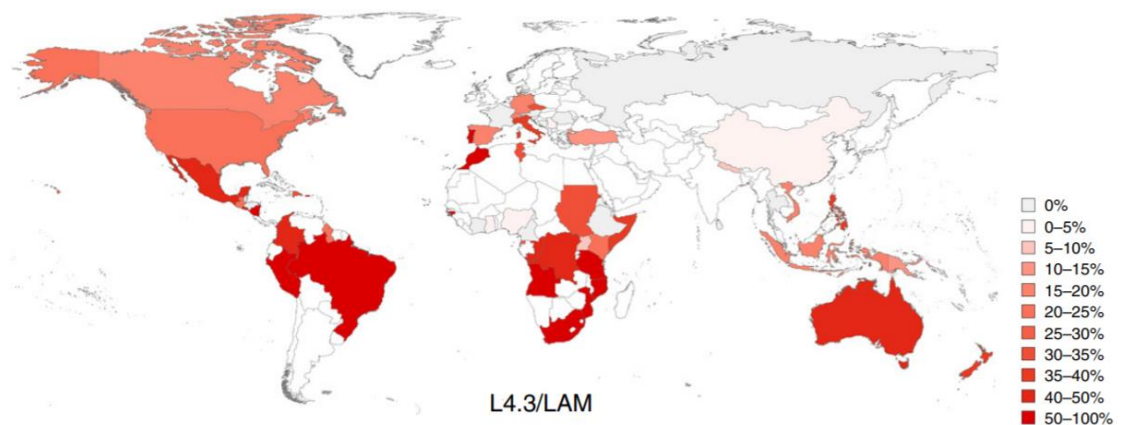


**Nota:** (A) Um total de 3.366 isolados de linhagem 4 de MTBC foram rastreados para SNPs específicos de sub-linhagem. L4.3/LAM foi a sub-linhagem mais frequente globalmente. (B) Os gráficos de pizza mostram as proporções das dez sub-linhagens de linhagem 4 entre todos os isolados de linhagem 4 de MTBC em cada país. Os tamanhos dos círculos correspondem ao número de isolados analisados por país. Um total de 3.366 isolados da linhagem 4 de MTBC foram incluídos. Os códigos de cores são como na (A). ND, não definido

**Fonte:** Adaptado de Stucki et al., 2016.

Além de ser a linhagem Mtb mais prevalente no mundo, cepas de genótipo LAM são responsáveis por, aproximadamente, metade dos casos de tuberculose que ocorrem no Brasil (BRUDEY et al., 2006; LAZZARINI et al., 2008; ROCHA et al., 2011). Apesar de sua importância na história da tuberculose, pouco se sabe sobre sua epidemiologia, características clínicas da doença ou comportamento biológico das cepas pertencentes a essa família.

**Fig. 6 -** Proporções da sublinhagem LAM específicas de cada país



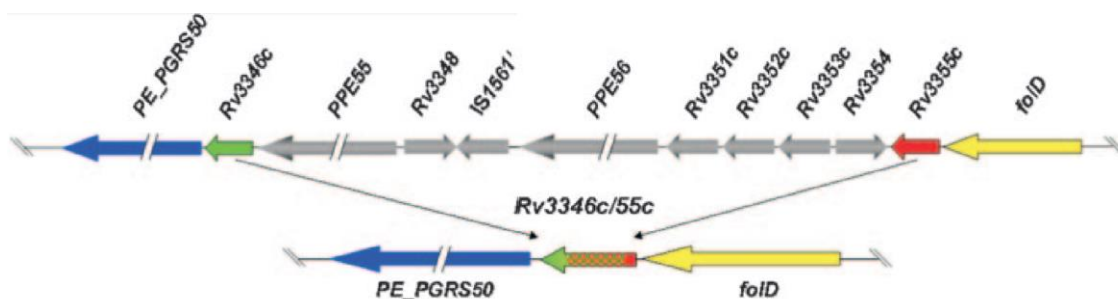
**Nota:** A intensidade do vermelho corresponde à proporção de uma sub-linhagem entre todos os isolados da linhagem 4 em cada país. Países com menos de três isolados no total são mostrados como 'sem dados' e são preenchidos em branco. Um total de 3.366 isolados da linhagem 4 foram incluídos nesta análise.

**Fonte:** Adaptado de Stucki et al., 2016.

Análises de PCR, mostraram que há uma grande deleção ou modificação da sequência de DNA de RDRio, quando comparada com o genoma da cepa padrão de laboratório H37Rv

(LAZZARINI et al., 2007). Essa sequência de 26.317 kb constitui 0,6% de todo o genoma, resultando na perda ou modificação de 10 genes, o que representa a deleção cromossômica mais longa que já observada em cepas de Mtb (Fig. 7) (LAZZARINI et al., 2007).

**Fig. 7** - Diagrama mostrando os genes deletados ou alterados na derivação do LSP de RDRio



**Fonte:** LAZZARINI et al., 2007.

As deleções genômicas são amplamente utilizadas como marcadores para a definição de linhagens e sublinhagens de Mtb, e podem estar associadas com a capacidade de modificação da imunidade, que muitas vezes acontece em favor da bactéria (GAGNEUX et al., 2006; LAZZARINI et al., 2008; STAMM; COLLINS; SHILOH, 2015). Nesse contexto, cepas específicas de Mtb carregam consigo características genéticas únicas, assim como seus fenótipos de virulência (LAZZARINI et al., 2008). A cepa CH, pertencente a linhagem do Leste Africano-Indiano, por exemplo, possui um polimorfismo no gene Rv1519, que está associado com uma maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10, o que aumenta a capacidade de sobrevivência dessa cepa no hospedeiro (NEWTON et al., 2006). O gene Rv2224c foi associado com aumento da virulência bacteriana em camundongos infectados com as cepas H37Rv de Mtb e BCG de *M. bovis* (RENGARAJAN et al., 2008). A ausência de Rv2224c resultou na diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 *in vivo*, aumento na suscetibilidade a lisozimas e diminuição da liberação da proteína GroEL2, responsável por modular a produção de citocinas em macrófagos (RENGARAJAN et al., 2008). Essas e outras características observadas em diferentes cepas dão suporte a ideia de que a capacidade de modificar a imunidade, juntamente com a existência de uma co-evolução entre bactéria e hospedeiro, pode ter implicações no controle da doença, além de gerar vantagens biológicas para o Mtb (LAZZARINI et al., 2008; PALITTAPONGARNPIM et al., 2018).

As diferenças nas respostas imune do hospedeiro, assim como o desfecho da doença a longo prazo, também foram diretamente atribuíveis a lipídios únicos produzidos por cepas individuais de Mtb (REED et al., 2004). O glicolípido fenólico derivado de policetídeo sintase

(PGL) é um fenoglicolípido, produzido por diferentes isolados de Mtb e que está envolvido na inibição de citocinas pró-inflamatórias e hiperletalidade da doença em modelos murinos (REED et al., 2004). A ausência de PGL foi associada com o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, e com a perda de um fenótipo hipervirulento, observado em cepas de linhagem Beijing (KRISHNAN et al., 2011; REED et al., 2004). Curiosamente, as modificações presentes no genoma de RDRio resultaram na deleção do gene pks15/1, o que resultou na perda do fenoglicolípido PGL, que poderia estar envolvido com o aumento da resposta pró-inflamatória no hospedeiro (LAZZARINI et al., 2007).

Entre os genes que foram deletados em RDRio, além de pks15/1, destacam-se dois genes PPE potencialmente imunogênicos (Rv3347c e Rv3350c) (LAZZARINI et al., 2007). Esses genes fazem parte da família de multigenes PPE/PE\_PGRS encontrada apenas em micobactérias e são responsáveis por codificar as proteínas PPE55 e PPE56 (BRENNAN; DELOGU, 2002; LAZZARINI et al., 2008). Essas proteínas são expressas na superfície extracelular de Mtb e atuam como potenciais antígenos na virulência micobacteriana e na imunidade ao hospedeiro (COLE, 2002; LAZZARINI et al., 2007). Sendo assim, especula-se que a perda dos genes PPE minimiza o reconhecimento imunológico do hospedeiro e isso pode estar associado com a maior virulência e transmissibilidade de RDRio (LAZZARINI et al., 2007).

As características clínicas observadas em pacientes infectados com RDRio demonstram indícios de que a infecção por essa micobactéria tem leve associação com o desenvolvimento da forma grave da doença (Tabela 1) (LAZZARINI et al., 2007). Em diferentes estudos, a infecção por RDRio foi associada com aumento de perda de peso, maior hemoptise, carga bacteriana aumentada, falha do tratamento, resistência a medicamentos e desenvolvimento de doença cavitária (KEMPKER et al., 2012; LAZZARINI et al., 2007, 2008). Nas análises feitas por Lazzarini et al. (2008), em amostras de pacientes de Belo Horizonte, foi observado que o odds ratio (OR) para cavitação pulmonar causada por RDRio foi 8 vezes (IC 95% 1,5 a 53,0) maior em comparação com outras cepas (Tabela 1). A presença de cavitações pulmonares em pacientes com tuberculose também está associada a recidivas e resistência à medicamentos (LAZZARINI et al., 2008).

**Tabela 1** - Características demográficas e clínicas associadas a RDRio *M. tuberculosis*: resultados de regressão logística múltipla<sup>a</sup>

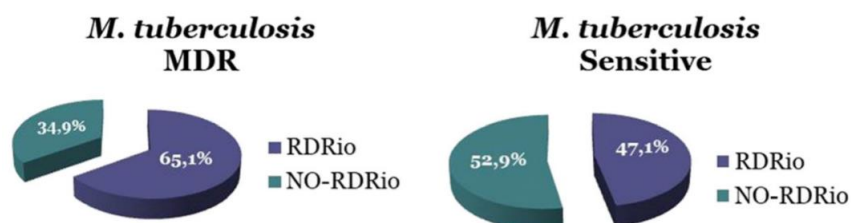
Patient characteristic	OR (95% CI)	P
Age	0.99 (0.96–1.01)	0.32
Male gender	1.25 (0.49–3.19)	0.64
HIV positive	0.56 (0.15–1.96)	0.36
Presence of AFB in sputum	0.41 (0.13–1.33)	0.14
Resistance to at least one TB drug	0.73 (0.26–2.03)	0.54
City of residence Belo Horizonte	4.05 (1.4–11.6)	0.009
Cough	1.24 (0.06–25.2)	0.89
Sputum production	0.31 (0.01–7.0)	0.46
Cavity on CXR	8.97 (1.52–53.0)	0.016

<sup>a</sup>AUC = 0.743. Variáveis de febre e perda de peso foram omitidas devido à instabilidade numérica do ajuste do modelo.

**Fonte:** Lazzarini et al., 2008.

Em outros estudos RDRio foi caracterizada como multirresistente à medicamentos (MDR) e extensivamente resistente à medicamentos (XDR) (DE ALMEIDA et al., 2019; DALLA COSTA et al., 2013; DAVID et al., 2012). A Fig. 8 mostra uma relação significativa ( $p < 0,001$ ) encontrada por (DE ALMEIDA et al., 2019) entre a sub-linhagem RDRio e cepas MDR-TB, de amostras pulmonares (escarro e lavado broncoalveolar) de pacientes de Minas Gerais. Além disso, foram observadas contagens mais altas de CFU em pacientes infectados com RDRio, o que indica uma multiplicação bacteriana acelerada *in vivo*, podendo estar relacionado com a alta taxa de transmissão entre os contatos (LAZZARINI et al., 2007; LÓPEZ et al., 2003; URBANOWSKI et al., 2004). Em contrapartida, o estudo de Barbosa et al. (2012) não foi capaz de encontrar diferenças clínicas ou características de uma doença mais severa em pacientes infectados com RDRio quando comparado com pacientes infectados com outras cepas de *Mtb*, no Rio de Janeiro.

**Fig. 8** - *Mycobacterium tuberculosis* RDRio e sua associação com MDR-TB



**Nota:** Porcentagens de RDRio e NO-RDRio em isolados clínicos suscetíveis e MDR-TB. É importante destacar que a relação entre a sub-linhagem RDRio e MDR-TB foi significativa ( $p < 0,001$ ).

**Fonte:** (DE ALMEIDA et al., 2019).

Durante a caracterização de RDRio feita por Lazzarini et al. (2007), observou-se que 70% das cepas da família LAM9 presente em seu estudo tinham o genótipo RDRio. Esses dados, juntamente com o quadro clínico observado nos pacientes, apontam para uma possível



vantagem biológica específica de RDRio em relação a outras cepas da mesma família. Além disso, dados publicados mostrando a associação de cepas da família LAM com surtos em prisões e resistência à drogas em diversos países, reforçam a importância dessa família na sua contribuição para a disseminação da tuberculose no mundo (PERDIGÃO et al., 2020; GUERRA et al., 2019; CANDIA et al., 2007; IGNATOVA et al., 2006; SHEMYAKIN et al., 2004).

Em 2007 Lazzarini et al., observou que o genótipo RDRio estava presente na maioria dos casos de transmissão recente de tuberculose. Contudo, estudos do nosso grupo identificaram a presença de RDRio, através da técnica de MIRU-VNTR, em isolados de pacientes com tuberculose coletados entre 1995 e 1997 no Rio de Janeiro (dados não publicados). A presença de RDRio também foi confirmada em isolados clínicos de pacientes do Rio Grande do Sul coletados entre 1998 e 2001 (SOARES et al., 2014). Esses dados confirmam que RDRio já circulava no Brasil há pelo menos 10 anos antes de sua caracterização.

Outros estudos epidemiológicos demonstraram que RDRio pode ser responsável por cerca de 30-50% dos casos de tuberculose em cidades de outros Estados do Brasil, como Espírito Santo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (LAZZARINI et al., 2008; CARDOSO OELEMANN et al., 2011; VINHAS et al., 2013; VON GROLL et al., 2010). Em São Paulo a infecção por RDRio foi associada ao consumo de álcool e a uma doença menos infecciosa em pessoas jovens ou acima de 60 anos (Tabela 2), bem como a resistência a drogas (Tabela 3) (DALLA COSTA et al., 2013; MORAES et al., 2017).

**Tabela 2** - Análise multivariada dos fatores epidemiológicos, clínicos, microbiológicos e radiológicos associados à presença de deleção RDRio em 429 pacientes com tuberculose

Age group	Odds ratio (CI 95%)	p value
under 24 years*	---	---
25 - 35 years	2,28 (1,02 - 5,07)	0,04
36 - 60 years	2,36 (1,11 - 5,05)	0,03
over 60 years	2,69 (0,96 - 7,52)	0,06
Alcoholism	1,63 (1,05 - 2,54)	0,03

CI 95%: confidence interval of 95%; \*: category of reference.

**Fonte:** Moraes et al., 2017.



**Tabela 3** - Dados sociodemográficos, clínicos, radiológicos e bacteriológicos para pacientes com tuberculose pulmonar no momento do diagnóstico

Characteristic	RDRio (n = 37)	WT (n = 59)	P value
Gender (M/F)	28/9	37/22	0.0683
Race (white/not white)	22/15	35/24	0.5804
Weight loss	4	10	0.2177
Fever	18	23	0.8736
Hemoptysis	17	23	0.8186
Alcohol use	18	27	0.7063
Illicit drug use	14	14	0.1465
HIV positive	13	16	0.5819
Cavity or CXR	17	25	0.3658
Miliary infiltrate	4	7	0.4367
Pleural effusion	4	2	0.0934
Mediastinal adenopathy	2	1	0.8185
MDR	34	37	0.0015

**Fonte:** Dalla Costa et al., 2013.

RDRio também está presente com alta frequência em algumas unidades prisionais do Rio de Janeiro (HUBER et al., 2014). A ocorrência de tuberculose entre populações prisionais é um assunto de grande importância, pois na maioria dos casos se trata de um ambiente superlotado, com baixo nível de higiene, pouco iluminado e/ou ventilado. Esse cenário, que é comum dentro das prisões, geram condições favoráveis para a alta disseminação desta sub-linhagem entre os presos.

RDRio também está presente em diversos países da Europa, África e nas Américas (GAGNEUX et al., 2006; DE JONG et al., 2008; GIBSON et al., 2008; Brynildsrud et al., 2018). Apesar de ser rara na Ásia, RDRio também já foi encontrada em países como China e Cazaquistão (MOKROUSOV et al., 2014; SKIBA et al., 2019). Esses dados demonstram a existência de uma disseminação contínua dessa sub-linhagem fora do Brasil, e confirmam sua importância na contribuição para a carga mundial de tuberculose (LAZZARINI et al., 2007).

A grande variedade genética presente no MTC e as características biológicas específicas de cada linhagem e cepas de Mtb, influenciam diretamente nos aspectos clínicos e epidemiológicos da doença. Além disso o Mtb se adapta de forma diferente em populações específicas, tornando sua transmissão mais eficiente dentro desses grupos étnicos.

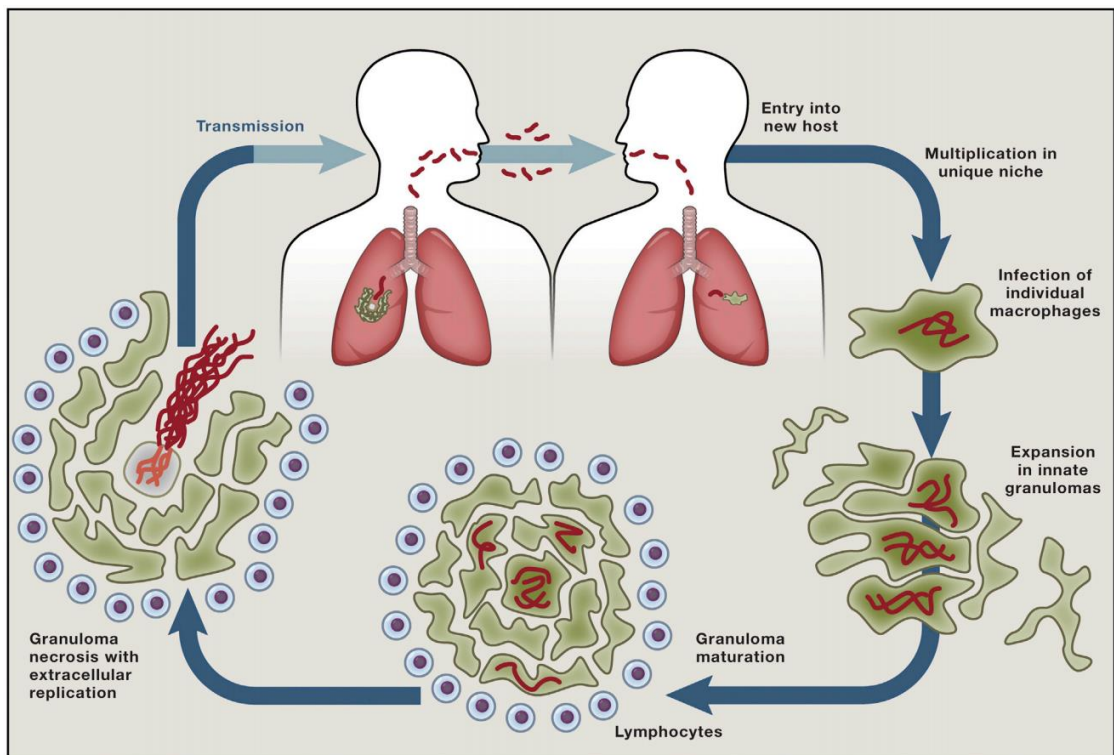
### 1.3. Resposta imune inata e adaptativa durante a tuberculose pulmonar

Apenas 5 a 10% dos 1,7 bilhões de pessoas que estão infectadas com Mtb desenvolverá a doença ao longo da vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). A maioria das pessoas é capaz de conter a infecção e desenvolver a tuberculose latente, através do

desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa bem-sucedida (SEGOVIA-JUAREZ; GANGULI; KIRSCHNER, 2004).

O Mtb é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) e intracelular facultativo, que tem a capacidade de infectar principalmente macrófagos alveolares. A doença é transmitida por via aérea quando uma pessoa contaminada expulsa a bactéria, principalmente através da tosse. Por ser transmitida por via aérea, é uma doença tipicamente pulmonar, porém, pode atingir outras áreas do corpo, como pleura, pericárdio, linfonodos, olhos, entre outros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Após a transmissão por via aérea, os bacilos entram nos alvéolos e infectam macrófagos, que são responsáveis pela primeira linha de defesa da resposta imune inata, eliminação dos bacilos e posterior formação de granulomas (Fig. 9) (CAMBIER; FALKOW; RAMAKRISHNAN, 2014).

**Fig. 9** - Ciclo de vida patogênico de *M. tuberculosis*

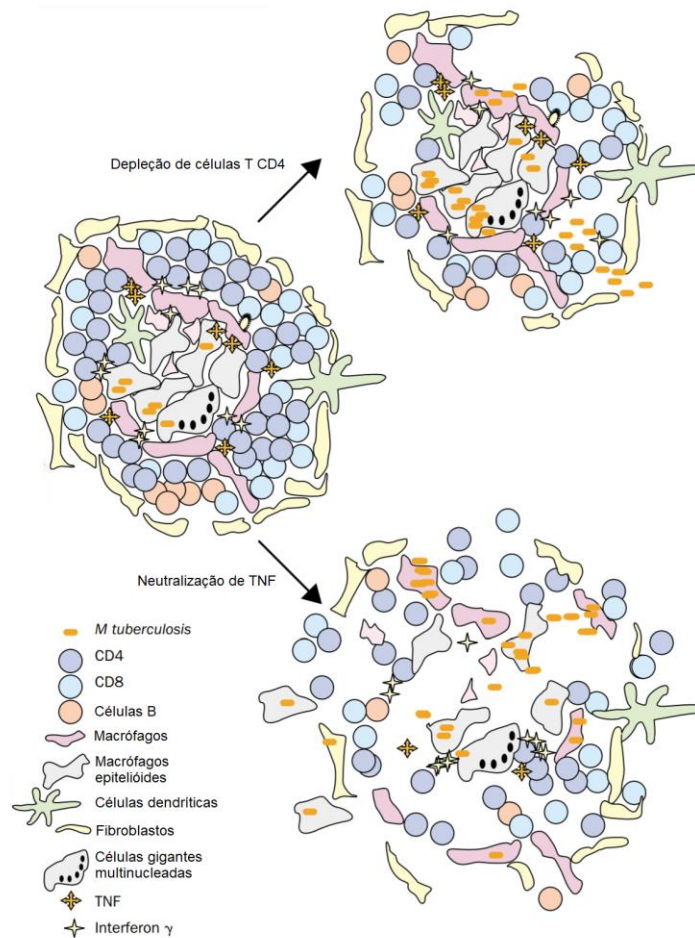


**Fonte:** Cambier, Falkow e Ramakrishnan, 2014.

Os macrófagos têm um potente papel antimicrobiano durante a imunidade inata na infecção por tuberculose (FLYNN; CHAN, 2001). Essas células medeiam a morte ou inibição dos bacilos através de suas funções efetoras, que incluem a fusão de fagolisossomos, diminuição do pH intrafagossômico, geração de ROI por explosão oxidativa e produção de RNI por via citotóxica dependente de NOS2 (FLYNN; CHAN, 2001; ORME; COOPER, 1999).

Ainda assim, o Mtb foi capaz de desenvolver, ao longo dos anos, mecanismos evasivos para evitar a morte por seus macrófagos hospedeiros, como por exemplo a prevenção da fusão fagolisossômica (MCDONOUGH; KRESS; BLOOM, 1993; FLYNN; CHAN, 2001). Além de sua atividade antimicrobiana, os macrófagos liberam citocinas, como IL-1, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, TGF- $\beta$  e quimiocinas que ativam e recrutam mais macrófagos, além de outras células imunes, como células T, NK, neutrófilos e células dendríticas para o local da infecção (ORME; COOPER, 1999; SADEK et al., 1998; VALONE et al., 1988). Células dendríticas, que são ativadas e secretam IL-12, também fagocitam os bacilos, e são responsáveis por apresentar seus antígenos para células T naïve que se encontram no linfonodo mais próximo, induzindo a diferenciação e ativação dessas células (SAUNDERS; COOPER, 2000; TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003). Células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> ativadas, então, migram para os sítios de infecção através dos sinais produzidos pelos macrófagos e contribuem para o controle da infecção (FLYNN; CHAN, 2001; FLYNN; ERNST, 2000). Essas células medeiam a inflamação através da liberação de citocinas, como IL-4, IL-12 e IFN- $\gamma$ , induzindo a ativação de mais células, incluindo macrófagos e monócitos, e com o tempo passam a expressar memória imunológica (FLYNN; CHAN, 2001; FLYNN; ERNST, 2000; ORME; COOPER, 1999). O IFN- $\gamma$  produzido pelas células T ativa e potencializa a liberação de TNF pelos macrófagos (ORME; COOPER, 1999). As células T CD8<sup>+</sup> ativadas também atuam lisando os macrófagos infectados que são incapazes de matar os bacilos intracelulares, através da via perforina/granzima ou induzindo apoptose pela ligação de CD95 (FLYNN; CHAN, 2001; FLYNN; ERNST, 2000; ORME; COOPER, 1999). Essa migração e interação entre as diversas células do sistema imune no local de infecção resulta na formação dos granulomas, que consistem em macrófagos e células gigantes, células T e B e fibroblastos, que circundam os macrófagos infectados na tentativa de conter a infecção (Fig. 10) (FLYNN; CHAN, 2001; SEGOVIA-JUAREZ; GANGULI; KIRSCHNER, 2004).

**Fig. 10** - Mecanismos imunológicos importantes na manutenção da tuberculose latente



**Fonte:** Adaptado de (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

**Nota:** Granuloma formado em resposta ao *M. tuberculosis*, composto por macrófagos, que podem se diferenciar em macrófagos epitelióides ou células gigantes multinucleadas, células T CD4 e CD8, células B, células dendríticas e fibroblastos. Na depleção das células T CD4 há menor ativação de macrófagos e reativação da infecção. Em caso de neutralização de TNF há o desagrupamento das células e desorganização do granuloma.

Em casos onde há depleção das células TCD4, como, por exemplo, durante o HIV, o funcionamento do granuloma fica prejudicado, a produção de interferon é diminuída e macrófagos menos ativados, resultando em um granuloma desorganizado e reativação da infecção (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

Para que a infecção seja contida, é necessário que os granulomas sejam em sua maioria pequenos e sólidos, de forma que não induzam patologia significativa (SAUNDERS; COOPER, 2000). Por outro lado, granulomas grandes e necróticos ajudam na disseminação bacteriana e maior patologia (SAUNDERS; COOPER, 2000). Segundo Segovia-Juarez, Ganguli e Kirschnwer (2004), entre os principais elementos envolvidos na formação do granuloma

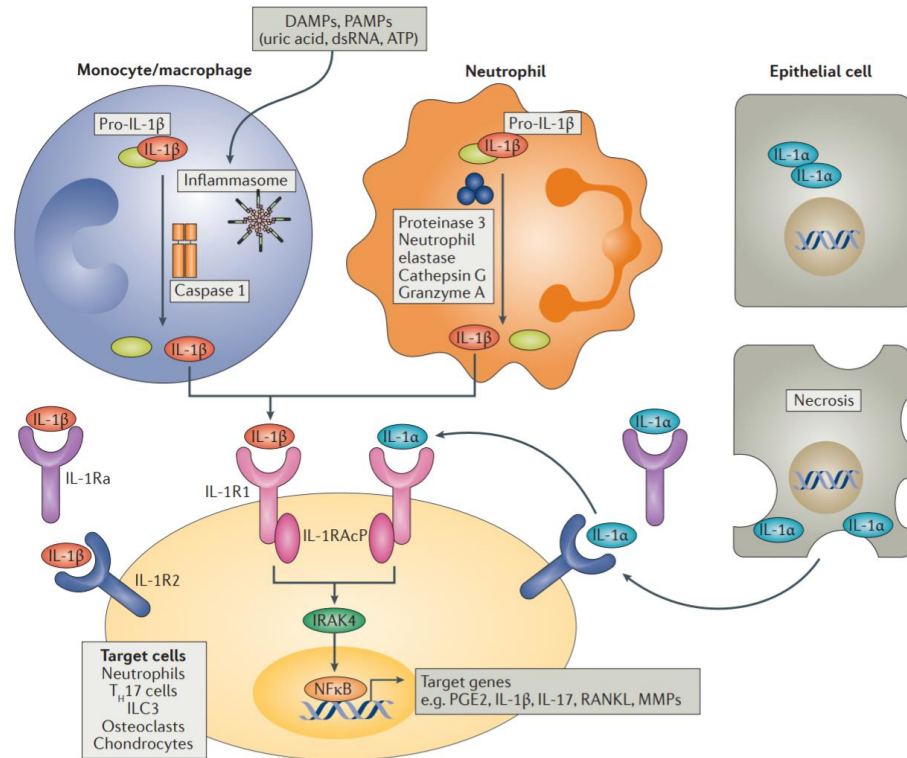
durante a infecção por tuberculose estão a capacidade do hospedeiro de ativar macrófagos e a prevenção de sua superlotação nos granulomas, bem como a difusão de quimiocinas e citocinas.

#### 1.4. IL-1 $\beta$ e IL-18

IL-1 $\beta$  e IL-18 são citocinas pró inflamatórias que desempenham importante papel durante a infecção por tuberculose. A IL-1 $\beta$  pertence à família do gene IL-1 que é composta por 3 membros: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e o antagonista do receptor IL-1 (IL-1Ra) (DINARELLO, 1996). Enquanto IL-1Ra é um antagonista específico do receptor, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  apresentam função agonista (DINARELLO, 1996). Seus efeitos biológicos são estimulados através da ligação com o receptor de membrana da IL-1 (IL-1R), que é expresso em células como endoteliais, epiteliais e leucócitos (Fig. 11) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  apresentam menos de 30% de homologia, porém, desempenham funções biológicas similares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Entretanto, a IL-1 $\beta$  é a principal forma biologicamente ativa e secretada, e pode ser considerada um mediador sistêmico, enquanto a IL-1 $\alpha$  é liberada após a apoptose das células e é considerada um regulador de eventos intracelulares que medeia a inflamação local (DINARELLO, 1996). A principal fonte de IL-1 são macrófagos ativados, porém, essa citocina também pode ser produzida por outras células, como neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais (Fig. 11) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A IL-1 $\beta$  é uma das principais citocinas pró inflamatórias e que desempenha importante papel na imunidade inata. Sua ativação resulta em efeitos locais e sistêmicos induzindo a inflamação aguda. Essa citocina atua, entre outras coisas, na ativação de linfócitos; aumento da expressão de genes que codificam moléculas biologicamente ativas; estímulo da produção de metabólitos do ácido araquidônico; estímulo da produção de quimiocinas; da diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> em Th17; além de afetar a remodelação do tecido mesenquimal, onde contribui para processos destrutivos e de reparo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DINARELLO, 1988). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a IL-1 também induz a produção da forma induzível de NOS (iNOS) em uma variedade de células, incluindo macrófagos murinos (DINARELLO, 1996). A IL-1 também atua sinergicamente com outras citocinas, particularmente o fator de necrose tumoral (TNF), induzindo a expressão de IL-6 por leucócitos e outros tipos celulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Em conjunto, essas citocinas também apresentam efeitos protetores, como a indução de febre, síntese de proteína de fase aguda pelo fígado e produção aumentada de leucócitos pela medula óssea (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

**Fig. 11** - Ativação e sinalização de IL-1



**Fonte:** Schett, Dayer e Manger, 2016.

**Nota:** A liberação de IL-1 $\beta$  de monócitos / macrófagos e neutrófilos requer processamento enzimático de sua proteína precursora intracelular (pró-IL-1 $\beta$ ).

Há estudos que evidenciam que a produção e a atividade da IL-1, particularmente a IL-1 $\beta$ , são fortemente reguladas, de forma que a resposta de IL-1 $\beta$  durante a doença não seja tão forte e não cause danos ao hospedeiro (DINARELLO, 1996). O aumento de IL-1 foi observado em diversos cenários, incluindo os que não envolviam infecções por microorganismos (DINARELLO, 1996). Estudos anteriores relataram aumento significativo de IL-1 na doença de Alzheimer; coagulação intravascular; tumores sólidos; leucemias; desordens autoimunes; asma; trauma cefálico; pancreatite; periodontite; rejeição de transplante; doença do enxerto contra hospedeiro; e em indivíduos saudáveis após exercícios extenuantes (DINARELLO, 1996). Outros estudos ressaltam a importância da IL-1 $\beta$  e seu envolvimento na regulação da resposta Th1, controlando algumas infecções intracelulares como listeriose e leishmaniose (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996). A tuberculose está entre as diversas infecções bacterianas nas quais a resistência do hospedeiro depende da produção de IL-1 (FREMOND et al., 2007; SU et al., 2010). A importância dessa citocina no controle da tuberculose pulmonar foi comprovada ao observarem que, camundongos deficientes de IL-1 $\beta$  ou seu receptor (IL-1R) são mais sensíveis à infecção, além de apresentarem maior carga bacteriana (JUFFERMANS et al., 2000; MAYER-BARBER et al., 2010).

Os meios pelos quais o Mtb sobrevive no hospedeiro mesmo com uma resposta imune em andamento ainda é amplamente discutido. Acredita-se que tal característica se dê através de mecanismos de escape ou subversão às respostas de defesa de macrófagos, tornando-os inaptos a eliminar os bacilos. Um estudo feito por Novikov et al. (2011), mostrou que cepas virulentas de Mtb induzem a ativação de IFN tipo 1, e que isso limita a produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos a nível de mRNA, resultando em uma resposta imune ineficiente no combate ao Mtb.

Outro estudo, mostrou que houve a supressão de IL-1 $\beta$  através da inibição de inflamassomas, pela ação da metaloprotease Zn<sup>2+</sup> de Mtb, que é necessária para a virulência em camundongos (MASTER et al., 2008). Esses achados apontam para uma possível manipulação do processamento de IL-1 $\beta$  como estratégia de sobrevivência de Mtb dentro dos macrófagos.

Paralelo à IL-1 $\beta$ , a IL-18 é uma citocina pró-inflamatória que atua regulando as respostas imunes inata e adquirida, e é produzida por várias células, principalmente macrófagos (DINARELLO et al., 2013; GRACIE; ROBERTSON; MCINNES, 2003). Essa citocina foi originalmente identificada como um fator de indução de IFN- $\gamma$ , por potencializar a produção dessa citocina em diversos tipos celulares, como esplenócitos, linfócitos hepáticos e células T helper 1 (Th1) (KOHNO et al., 1997; OKAMURA et al., 1995). Além da produção de IFN- $\gamma$ , a IL-18 também tem papel na ativação de células NK, ativação de células T, indução de moléculas de adesão celular, síntese de óxido nítrico e produção de quimiocinas, bem como na indução da proteína transmembranar FasL (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DINARELLO et al., 2013).

Um estudo feito por Bazan, Timans e Kastelein (1996), mostrou que a IL-18 tem muita similaridade com as citocinas da família IL-1, e por isso, pode ser classificada como um membro dessa super família de citocinas (DINARELLO et al., 2013; GRACIE; ROBERTSON; MCINNES, 2003). Assim como a IL-1 $\beta$ , estudos anteriores relataram o papel da IL-18 na resposta imune contra doenças infecciosas. Kawakami et al. (1997) demonstrou que a IL-18 teve importante papel na proteção contra a infecção pulmonar e disseminada de camundongos por *C. neoformans* através da indução de IFN- $\gamma$ .

O envolvimento de IL-18 na geração da imunidade protetora contra a tuberculose foi demonstrada em um estudo no qual camundongos deficientes dessa citocina apresentaram maior desenvolvimento de lesões granulomatosas após a infecção pela cepa virulenta Kurono de Mtb (SUGAWARA et al., 1999). No mesmo estudo, o tratamento com IL-18 exógena resultou na diminuição da carga bacteriana dos camundongos (SUGAWARA et al., 1999).

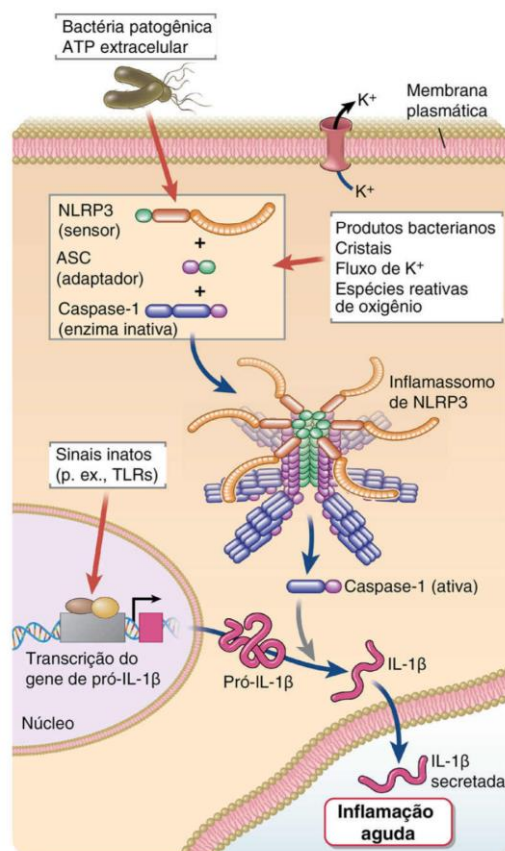
A IL-18 também está associada com a produção de IL-1 $\beta$ . Em um estudo feito por Puren et al. (1998), foi observado que a IL-18 aumenta indiretamente a produção de IL-1 $\beta$  através da



indução da produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares não positivas para CD14. (SUGAWARA et al., 1999) também observou que camundongos deficientes de IL-18 expressam menos IL-1 $\beta$  em relação a camundongos selvagens.

Tanto IL-18 como IL-1 $\beta$  exigem a atividade de diferentes proteinases para sua ativação. A produção de IL-1 $\beta$  é dividida em duas etapas, sendo necessário dois sinais distintos. Primeiramente, a sinalização de TLRs e NLRs ativam a via de transcrição NF- $\kappa$ B, que é responsável por induzir a transcrição do gene de IL-1 $\beta$  (Fig. 12) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A segunda etapa, requer a ativação de proteases específicas que serão responsáveis por clivar essa citocina para sua forma biologicamente ativa (Fig. 12). A maturação de pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$  se dá principalmente pela ação proteolítica da caspase-1, na posição Asp116 (FANTUZZI; DINARELLO, 1999).

**Fig. 12** - Transcrição de pró-IL-1 $\beta$  e ativação de IL-1 $\beta$



**Fonte:** (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

**Nota:** A ativação do inflamassoma NLRP3, que processa pró-IL-1 em IL-1 ativa, é mostrada. Os inflamassomas com outras proteínas NLRP atuam de forma similar. Vários PAMPs ou DAMPs induzem expressão de pró-IL-1 $\beta$  via sinalização de receptor de reconhecimento de padrão. ASC, proteína do tipo speck associada à apoptose contendo CARD; IL-1, interleucina-1.

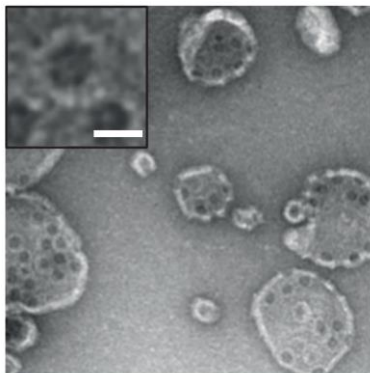


Outras vias de ativação de IL-1, em diferentes tipos celulares já foram descritas na literatura. Em 1991, Mizutani et al., demonstrou que a IL-1 $\beta$  pode ser convertida para sua forma biologicamente ativa pela ação de cinases de mastócitos humanos. No mesmo ano, foi observado que a IL-1 $\beta$  produzida por queratinócitos epidérmicos humanos pode ser clivada por quimotripsina exógena (MIZUTANI; BLACK; KUPPER, 1991). A protease granzima A também foi descrita como ativadora de IL-1 $\beta$  (IRMLER et al., 1995). Diferentemente da IL-1 $\beta$ , a IL-18 não precisa de dois sinais para ser ativada, pois sua forma inativa, a pró-IL-18, já é expressa constitutivamente. A pró-IL-18 também pode ser clivada para sua forma bioativa através da ação da proteinase caspase-1 (DINARELLO et al., 2013). Além de caspase-1, outras proteinases que clivam pró-IL-18 em diferentes tipos celulares já foram descritas, como a caspase-3, caspase-4 e proteinase-3 (FANTUZZI; DINARELLO, 1999; TSUTSUI et al., 2000). Contudo, cada proteinase pode clivar essas citocinas em um local diferente na sua estrutura. Assim, algumas acabam resultando no acúmulo de produtos biologicamente inativos.

### 1.5. Piroptose

Além da ativação de IL-1 $\beta$  e IL-18, a caspase-1 também é responsável por ativar a piroptose, um tipo de morte celular programada, rápida e lítica. O termo piroptose vem do grego *piro* (fogo, febre) e *ptose* (cair), devido as características inflamatórias e necróticas dessa morte celular (BROZ, 2019). A piroptose, compartilha algumas características com a apoptose, entre elas a fragmentação do DNA, condensação nuclear e a dependência de caspase (JORGENSEN; MIAO, 2015). Entretanto, possui diferenças marcantes, que incluem a ativação por caspases inflamatórias e a formação de poros na membrana celular (Fig. 13) (JORGENSEN; MIAO, 2015).

**Fig. 13** - Atividade de formação de poros de membrana do domínio gasdermina-N



**Fonte:** Adaptado de (DING et al., 2016).

**Nota:** Lipossomos foram tratados com proteínas gasdermina. São mostradas micrografias representativas de microscopia eletrônica de coloração negativa dos lipossomas. Inserções em uma visão expandida de

um poro representativo (barra de escala, 15 nm). O dado mostrado é representativo de três experimentos independentes.

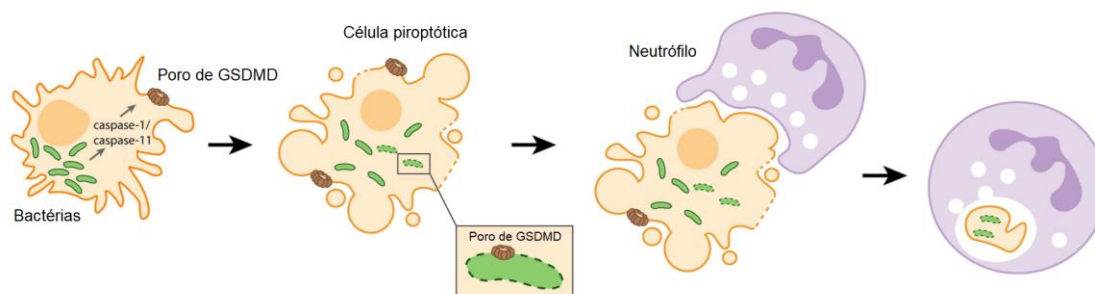
Devido a presença de poros na membrana, a célula torna-se permeável para corantes de pequeno peso molecular que seriam impermeáveis a membrana em condições normais, como o 7-aminoactinomicina (7-AAD), iodeto de propídio (PI) e brometo de etídio (EtBr) (FINK; COOKSON, 2006). Diferente de células apoptóticas que permanecem intactas, formando apenas corpos apoptóticos, não sendo possível corá-las com 7-AAD ou PI (JORGENSEN; MIAO, 2015). A morte celular por piroptose ocorre quando a caspase cliva a proteína gasdermina D em dois fragmentos, o C-terminal e o N-terminal. O domínio C-terminal tem função inibitória quando ligado ao N-terminal, enquanto o domínio N-terminal livre se insere na membrana plasmática para formar poros com até 15nm de diâmetro (Fig. 13) (DING et al., 2016; KAYAGAKI et al., 2015; SHI et al., 2015). A formação de poros interrompe o gradiente eletroquímico da célula, resultando no influxo de água, inchaço e por último a lise celular (JORGENSEN et al., 2016b). Tanto a formação de poros, quanto a morte por piroptose promovem a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 para o meio extracelular (EVAVOLD et al., 2018; HEILIG et al., 2018; KAYAGAKI et al., 2015; SHI et al., 2015).

Durante a piroptose, também ocorre a formação de armadilhas induzidas por poros (PITs), os quais se associam às bactérias e as mantêm presas na célula (JORGENSEN et al., 2016a, 2016b). Desse modo, após a ruptura da membrana celular, as organelas e o citoesqueleto também permanecem associados as PITs ao invés de se dispersarem para o meio (JORGENSEN et al., 2016b).

Uma vez aprisionadas dentro das células, as bactérias tornam-se alvo da gasdermina D devido a cardiolipina presente na membrana bacteriana, que promove o ligação do terminal-N de gasdermina D com as membranas lipossomais, causando danos às membranas das bactérias (Fig. 14) (BROZ, 2019). A piroptose por si só não é capaz de matar essas bactérias, porém, estudos *in vitro* demonstram que os poros da gasdermina D deixam bactérias intracelulares, como *L. monocytogenes*, *C. rodentium*, e *B. thailandensis*, enfraquecidas e com maior suscetibilidade a estressores e antibióticos (JORGENSEN et al., 2016b), além de resultar na redução da contagem de CFU de *L. monocytogenes* (JORGENSEN et al., 2016b; LIU et al., 2016). A morte dessas bactérias só ocorre efetivamente após serem fagocitadas por um segundo fagócito (Fig. 14). As PITs estão associadas a ativação da resposta imune inata via receptores sequestradores (do inglês *scavenger receptors*) e sistema complemento, que além de recrutar neutrófilos para o local da piroptose, também pode contribuir para opsonização das PITs

(JORGENSEN et al., 2016a). Os neutrófilos recrutados realizam a eferocitose das PITs, e matam com eficiência as bactérias presas à elas (Fig. 14) (BROZ, 2019).

**Fig. 14** - Efeitos antimicrobianos da piroptose



**Fonte:** (BROZ, 2019).

**Nota:** Bactérias intracelulares são aprisionadas em corpos celulares piroptóticos, chamados PITs. Os poros de gasdermina D também podem danificar bactérias intracelulares. Os PITs são reconhecidos e eferocitados por neutrófilos, que matam as bactérias associadas aos PITs.

Segundo Jorgensen e Miao (2015), a piroptose impede que a replicação intracelular continue, e contribui para a exposição das bactérias, fazendo com que fiquem suscetíveis à morte pelas células efectoras ou fagocitose por um segundo fagócito. Sendo assim, a piroptose poderia ser a melhor opção de defesa para o hospedeiro devido sua capacidade de restringir a replicação do patógeno ao mesmo tempo que previne sua propagação para células vizinhas (BROZ, 2019). No caso de infecção por *Mtb*, que é intracelular facultativo, a piroptose poderia contribuir para que alguns bacilos se disseminem para outras partes do corpo, aumentando a carga bacilar e a taxa de infecção. Guinn et al. (2004) relataram que após 7 dias de infecção a cepa H37Rv de *Mtb* é capaz de lisar células THP-1 hospedeiras, com subsequente disseminação para macrófagos vizinhos ainda não infectados, e que esse fenômeno ocorre de maneira dependente do locus RD1 e das proteínas ESAT-6 e CFP10. Deve-se considerar que dentro de um sistema completo, outros fagócitos, como os neutrófilos, poderiam fagocitar e matar essas bactérias antes que elas pudessem infectar outras células, diminuindo a sua capacidade de disseminação. Nesse modelo, entretanto, foi utilizada apenas uma linhagem celular, demonstrando uma realidade diferente do que realmente acontece na infecção por *Mtb* no hospedeiro humano, limitando a nossa compreensão sobre esse assunto.

## 1.6. Inflamassomas

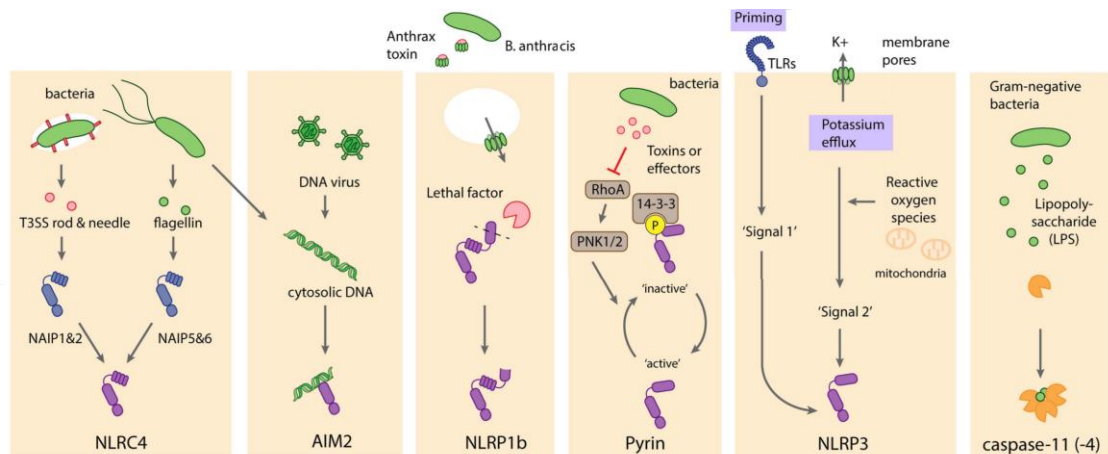
Para que ocorra a piroptose e a liberação de citocinas, a caspase-1 precisa ser ativada por complexos proteicos chamados de inflamassomas, que desempenham um papel cada vez mais importante na geração de imunidade inata efetiva. Os inflamassomas são plataformas

compostas por proteínas, que atuam coordenando as defesas antimicrobianas do hospedeiro, por intermédio de caspases inflamatórias que ativam citocinas e/ou induzem a morte celular (BROZ; DIXIT, 2016). Essas plataformas proteicas são amplamente estudadas não só pela sua importância nas doenças infecciosas, mas também pela atividade desregulada de inflamassomas que está associada com inúmeras desordens inflamatórias (BROZ; DIXIT, 2016).

O termo inflamassoma foi citado pela primeira vez por Martinon e Burns (2002), ao descreverem um complexo de proteínas de alto peso molecular que atua como plataforma para recrutamento e ativação de forma auto proteolítica de caspases inflamatórias. Entre as caspases ativadas por inflamassomas, a caspase-1 é a mais estudada e foi considerada uma protease necessária para a clivagem de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas formas biologicamente ativas e posterior liberação pelas células (VON MOLTKE et al., 2013). Alguns estudos relataram a ativação de inflamassomas, seguido de um aumento na ativação e secreção de IL-1 $\beta$  dependente de caspase-1, em macrófagos após a infecção com Mtb (KLEINNIJENHUIS et al., 2009; MONTERO et al., 2004; NETEA et al., 2006).

A formação do complexo de cada inflamassoma é iniciada por sensores citosólicos distintos, conhecidos como Receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes em sua estrutura. Esses receptores são ativados por estímulos únicos, que incluem agentes infecciosos ou não infecciosos no citosol da célula hospedeira, sinais de perigo endógenos, além de distúrbios da homeostase celular (Fig. 15) (LISTON; MASTERS, 2017; VON MOLTKE et al., 2013).

**Fig. 15 -** Ativação de inflamassomas canônicos e não canônicos por bactérias



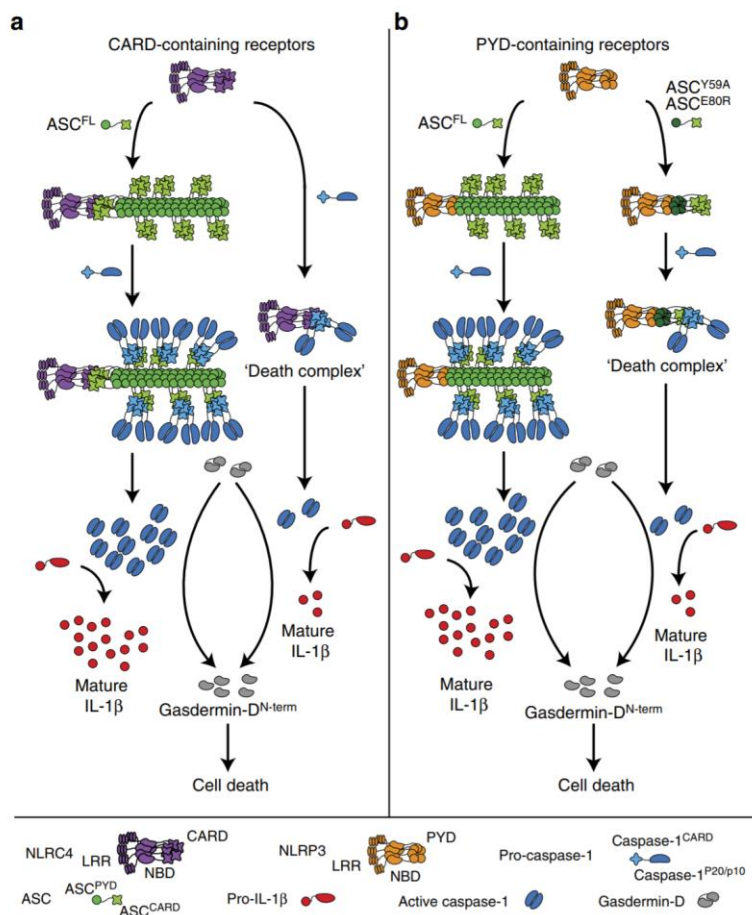
**Fonte:** (BROZ, 2019).

**Nota:** As vias NAIP-NLRC4 e AIM2 envolvem a ligação direta dos respectivos ligantes (flagelina, proteínas estruturais T3SS ou DNA). O NLRP1b reconhece a atividade proteolítica do fator letal da metaloprotease de *B. anthracis*. Pyrin usa um mecanismo de guarda para detectar a inativação de RhoA. A ativação do NLRP3 envolve o priming pelo sinal 1, seguido pela ativação pelo sinal 2. A natureza do sinal 2 e o mecanismo de reconhecimento ainda são desconhecidos. A via não canônica envolve a

detecção direta de LPS pela caspase-11 em camundongos ou caspase-4 (ou caspase-5) em humanos.

O estímulo de PRRs resulta no recrutamento e oligomerização da proteína semelhante à partícula associada à apoptose contendo um CARD (ASC). A proteína ASC é composta pelo domínio de pirina (PYD) e pelo domínio de recrutamento de caspases (CARD), que são responsáveis pelo recrutamento de caspase-1 através de uma interação CARD-CARD (Fig. 16) (BROZ; DIXIT, 2016). Primeiramente, ASC oligomeriza através do seu domínio PYD, formando longos filamentos reticulados, um processo que pode ser considerado um mecanismo de amplificação de sinal para os inflamassomas (Fig. 16) (DICK et al., 2016). Os filamentos de ASC, então, agregam-se através de interações CARD-CARD formando uma partícula cada vez maior, ou seja, um inflamassoma macromolecular que recrutará o zimogênio da caspase-1 (Fig. 16) (BROZ, 2019). Após recrutada, a caspase-1 é ativada por dimerização e auto proteólise, e estará pronta para atuar na clivagem proteolítica de pró-IL-1 $\beta$ , IL-18, e gasdermina-D (Fig. 16) (VON MOLTKE et al., 2013).

**Fig. 16 -** Modelo de amplificação de sinal por filamentos ASC

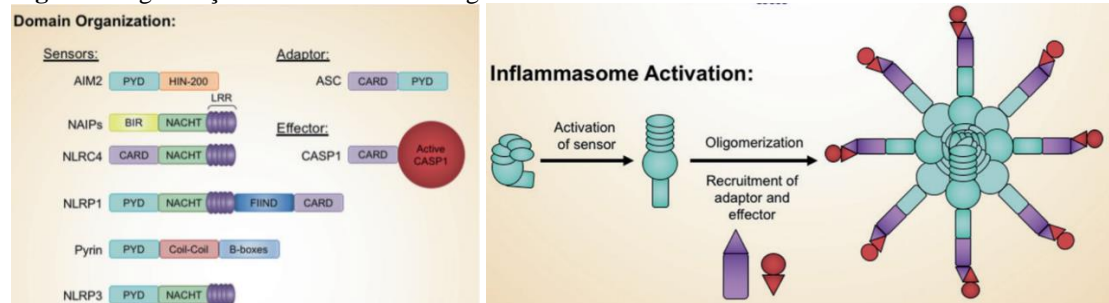


**Fonte:** (DICK et al., 2016).

**Nota: (A)** Receptores contendo CARD recrutam a proteína adaptadora ASC por meio de interações CARD-CARD homotípicas, ou seja, uma molécula ASC em ponte. Esta etapa nucleia o ASC<sup>PYD</sup> de várias moléculas de ASC em ponte, levando à formação de um filamento de ASC<sup>PYD</sup>, que é condensado no ponto ASC pelo ASC<sup>CARD</sup>. A formação de filamentos promove a ativação de grandes quantidades de caspase-1, promovendo a maturação proteolítica de grandes quantidades de citocinas (pró-IL-1 $\beta$ ). Na ausência de ASC, os receptores contendo CARD interagem diretamente com a pró-caspase-1, levando à formação dos chamados "complexos de morte". Nesses pequenos complexos, apenas algumas moléculas de caspase-1 são ativadas e o processamento da pró-caspase-1 pode não acontecer. As poucas moléculas de caspase-1 são suficientes para induzir eficazmente a piroptose, mas o processamento de citocinas é reduzido. **(B)** Os receptores contendo PYD podem interagir diretamente com ASC por meio de interações PYD-PYD homotípicas, levando a filamentos de ASC<sup>PYD</sup> e, finalmente, ao ponto ASC. Quanto aos receptores contendo CARD, isso leva à ativação da caspase-1 e subsequente processamento de citocinas e piroptose. Mutações que bloqueiam ou retardam a formação de filamentos ASC (por exemplo, ASC<sup>E80R</sup> ou ASC<sup>Y59A</sup>) permitem apenas que algumas moléculas de caspase-1 sejam ativadas. Isso é suficiente para induzir a piroptose, mas insuficiente para produzir grandes quantidades de citocinas maduras antes da lise celular.

Existem diversos tipos de inflamassomas, e esses são ativados de maneira distinta no citosol da célula. As proteínas NLRs, com exceção de NLRP1, são constituídas por um domínio tripartido que envolve: um domínio de dobra de morte no terminal amino (domínio de pirina ou CARD); um domínio de ligação de nucleotídeo NACHT central; e repetição rica em leucina (LRRs) carboxi-terminal (Fig. 17) (TING et al., 2008). Cada domínio exerce uma função distinta no inflamassoma: NACHT tem atividade de ATPase e pode influenciar na oligomerização das outras proteínas; os LRRs tem função regulatória e podem interferir na interação do ligante; e os domínios de dobra de morte são responsáveis por interagir com ASC e/ou caspase-1 (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). Além dos outros domínios que são comuns entre as proteínas NLRs, o inflamassoma NLRP1 contém um domínio de função para localizar (FIIND) e um C-terminal CARD (Fig. 17) (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013).

**Fig. 17 -** Organização do domínio e montagem básica do inflamassoma



**Fonte:** Christgen; Place; Kanneganti, 2020.

**Nota:** Os domínios de AIM2, NAIPs, NLRC4, NLRP1, Pyrin, NLRP3, ASC e CASP1 são mostrados. O arquétipo da estrutura do inflamassoma é composta por um sensor, um adaptador e uma proteína efetora. Após a ativação, o sensor oligomeriza e recruta as proteínas adaptadoras e efetoras para o complexo do inflamassoma. LRR, repetição rica em leucina; BIR, inibidor baculoviral da repetição da proteína da apoptose.

Entre as proteínas NLRs estão NLRP1, NLRP3 e NLRC4, que fazem parte da via canônica de inflamassoma, responsáveis por ativar caspase-1 (BROZ; DIXIT, 2016). Também estão incluídos nesse grupo os inflamassomas ausente em melanoma 2 (AIM2) e pirina (BROZ;

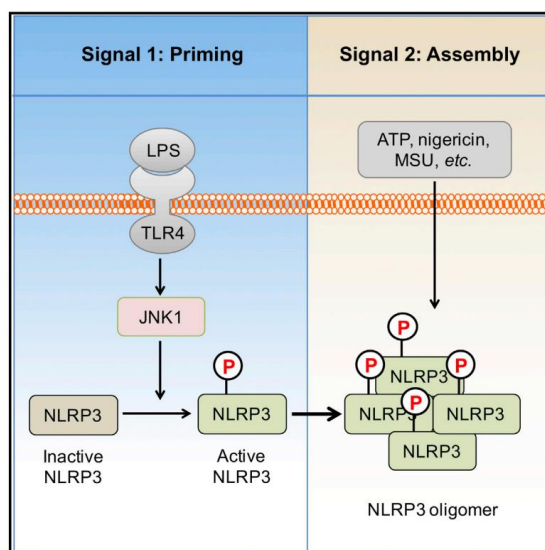


DIXIT, 2016). Outros inflamassomas menos conhecidos incluem o NLRP6, NLRP7, NLRP12, o gene 1 induzível por ácido retinóico (RIG-I) e a proteína 16 induzível por IFN- $\gamma$  (IFI16) (BROZ; MONACK, 2013; VON MOLTKE et al., 2013).

A via não canônica de inflamassomas é composta por proteínas que são responsáveis pela ativação de outras caspases, incluindo caspase-11 (em camundongos) e as caspases-4 e 5 (em humanos) (BROZ; DIXIT, 2016). Diferente da caspase-1, essas caspases ativam gasdermina-D, mas não clivam IL-1 $\beta$  e IL-18 de forma eficiente (BROZ, 2019). Os inflamassomas não canônicos são ativados por bactérias gram-negativas, devido a porção de lipídio A que está presente no lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular dessas bactérias (BROZ et al., 2012; KAYAGAKI et al., 2011; RATHINAM et al., 2012). O LPS só desencadeia a ativação desses inflamassomas quando se encontra no citosol da célula, o que pode ocorrer durante uma infecção bacteriana, transfecção, ou qualquer outro método de transporte do LPS (KAYAGAKI et al., 2011). Sendo assim, o LPS extracelular não é suficiente para desencadear a via não canônica de inflamassomas (KAYAGAKI et al., 2011).

### 1.7. NLRP3

Uma das vias canônicas de inflamassoma melhor caracterizada é a proteína 3 contendo os domínios NOD-, LRR- e pirina (NLRP3). O inflamassoma NLRP3 é composto por um N-terminal PYD, um domínio NACHT central e domínios LRRs C-terminal (Fig. 17) (BROZ, 2019). Diferente dos outros inflamassomas, o NLRP3 necessita de dois sinais para sua ativação, pois a sua expressão basal não é suficiente para a ativação do complexo (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). O primeiro sinal é chamado de *priming*, e consiste na sinalização de Receptores do tipo *Toll* (TLRs) que desencadeará a supregulação transcricional de NLRP3 e pró-IL1 (Fig. 18) (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). Paralelamente, eventos não transcricionais ocorrem como uma forma de controlar uma ativação desregulada, esses incluem a desfosforilação de resíduos dentro do N-terminal PYD, fosforilação de um resíduo de serina entre os domínios PYD e NACHT e a desubiquitinação de NLRP3 (JULIANA et al., 2012; LATZ; XIAO; STUTZ, 2013; PY et al., 2013; SONG et al., 2017; STUTZ et al., 2017). O segundo sinal é o que desencadeará a real ativação de NLRP3 e pode ser induzido por uma gama de fatores, que incluem cristais de ácido úrico, sílica, amianto e alume, híbridos RNA-DNA, ATP extracelular, toxinas que levam a formação de poros e diversos patógenos virais, bacterianos, fúngicos e protozoários (Fig. 18) (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013).

**Fig. 18** - Ativação do inflamassoma NLRP3

**Fonte:** Song et al., 2017.

**Nota:** Ativação do inflamassoma NLRP3 através de sinais de *priming* e montagem.

Devido à grande variedade de estímulos envolvidos na ativação de NLRP3, supõe-se que exista um evento celular único que todos esses ativadores tem como um alvo em comum (BROZ; DIXIT, 2016). O que se sabe, até o momento, é que a diminuição dos níveis intracelulares de  $K^+$ , decorrente da ruptura da membrana celular, parece ser o ponto de convergência para ativação de NLRP3, por esse fenômeno estar associado com todos os outros ativadores desse inflamassoma (BROZ; DIXIT, 2016; MUÑOZ-PLANILLO et al., 2013). É possível, então, que o NLRP3 funcione como um sensor de alteração da homeostase celular, que também detecta os danos infligidos pela infecção de um patógeno (BROZ, 2019).

Recentemente, a proteína quinase 7 relacionada a NIMA (NEK7) também foi sugerida como sendo um componente do inflamassoma NLRP3, essencial à sua formação (HE et al., 2016; SHI et al., 2016). Essa proteína se liga diretamente ao NLRP3 e atua a jusante do efluxo de  $K^+$  controlando a oligomerização deste inflamassoma (HE et al., 2016; SHI et al., 2016).

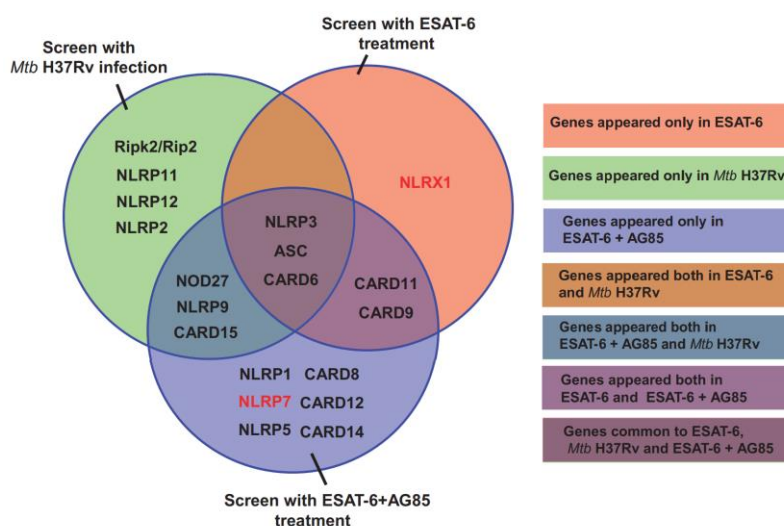
Alguns microrganismos podem ativar o NLRP3 diretamente, devido a liberação de proteínas formadoras de poros, porém essa ativação também pode ocorrer de forma indireta após a ativação dos inflamassomas não canônicos, que acabam gerando o segundo sinal necessário para ativação de NLRP3 (BROZ, 2019). Um exemplo disso, é a ativação das caspases-11 e -4, que podem clivar gasdermina-D, culminando no efluxo de  $K^+$  que, por sua vez, é um dos sinais de ativação para NLRP3 (RÜHL; BROZ, 2015).

Em 2010, Mishra et al., observou que o NLRP3 é a principal via de inflamassoma ativada por Mtb em macrófagos, seguido da liberação de IL-1 $\beta$  (Fig. 19). Além disso, a ativação



de caspase-1 ocorreu de forma dependente da liberação da proteína ESAT-6 pelo sistema de secreção ESX-1 (MISHRA et al., 2010a).

**Fig. 19** - Triagem de RNAi de componentes do inflamassoma durante a infecção por *Mtb*.



**Fonte:** Mishra et al. (2010).

**Nota:** Diagrama de Venn dos 'acertos' confirmados, como pontuados na tela secundária, que exibem fenótipos semelhantes ou diferentes com parâmetros de triagem variáveis. Reguladores positivos (preto) e reguladores negativos (vermelho). Monócitos THP-1 foram transduzidos de forma estável com vetores lentivirais que codificam shRNAs direcionados a 22 NODs e 14 proteínas contendo o domínio CARD do genoma humano (listados na Tabela S1). Após a seleção dos transdutantes com puromicina, as células foram infectadas com *Mtb* H37Rv ou pulsadas com ESAT-6 purificado sozinho e ESAT-6 em combinação com AG85 purificado.

Segundo Mishra et al. (2010), esse fenômeno poderia estar associado com a habilidade de ESAT-6 em causar danos a membrana celular, resultando no efluxo de  $K^+$ , bem como na difusão de outros produtos bacterianos no citosol, como o antígeno 85 (AG85).

O domínio ASC, também conhecido como Pycard, foi descoberto primeiramente como uma proteína formadora de mancha, envolvida na apoptose de células HL-60, e posteriormente como uma proteína adaptadora que interage com NLRs (MASUMOTO et al., 1999). Em 2010, McElvania Tekippe et al., demonstrou que o *Mtb* induziu a liberação de IL-1 $\beta$  em macrófagos humanos e de camundongos *in vitro*, e que esse processo foi dependente de Pycard, caspase-1 e NLRP3.

A infecção por *Mtb* também pode promover necrose dependente de NLRP3, porém, independente de caspase-1 em macrófagos humanos infectados com a cepa H37Rv (WONG; JACOBS JR, 2011). O mesmo fenômeno foi observado em macrófagos infectados com *Shigella* e *Staphylococcus*, onde o adaptador ASC foi necessário para que ocorresse a necrose

(CRAVEN et al., 2009; WILLINGHAM et al., 2007). Esses resultados sugerem outro papel importante para o NLRP3 na morte celular, além da ativação de piroptose para proteção do hospedeiro contra o patógeno.

Nos últimos anos foram relatadas associações entre polimorfismos nos genes de inflamassoma e a suscetibilidade ao desenvolvimento de tuberculose. Polimorfismos presentes nos genes CARD8 e NLRP3 foram associados com o desenvolvimento de tuberculose extrapulmonar e piora nos resultados do tratamento da tuberculose pulmonar em indivíduos da Etiópia (ABATE et al., 2019). O SNP rs34298354 foi associado com suscetibilidade a tuberculose em pacientes de Taiwan (LIU et al., 2020). O estudo feito por Liu et al. (2020), mostrou que um polimorfismo no genótipo TC rs34298354 de NLRP3 está associado com uma diminuição no risco de tuberculose.

Polimorfismos presentes em genes de TLR, como TLR1, -2, -4, -6, -8, -9 e -10 também foram associados com um papel protetor ou com o aumento do risco de desenvolver tuberculose (LIU et al., 2020; SALIE et al., 2015; SCHURZ et al., 2015; YU WANG et al., 2018). Os TLRs são PRRs transmembranares responsáveis por reconhecer PAMPs, e estão envolvidos com o reconhecimento extracelular de Mtb e a ativação do inflamassoma NLRP3 (LIU et al., 2020). Em conjunto, esses dados apontam um papel importante do inflamassoma NLRP3 e de TLRs na proteção contra tuberculose.

## 1.8. AIM2

Outra via de inflamassoma amplamente estudada é a AIM2, um membro da família de PRRs do tipo HIN200 ou AIM2. Esse inflamassoma apresenta um PYD no terminal N, e o terminal C com uma ou duas proteínas nucleares hematopoiéticas induzíveis por IFN com domínios de 200 aminoácidos (HIN200) que se ligam ao DNA citosólico (Fig. 17) (BROZ, 2019; BROZ; DIXIT, 2016). Diversos estudos demonstraram que AIM2 é essencial na defesa contra infecções virais de vírus de DNA, como *Vaccinia* e *citomegalovírus* (CMV), e algumas infecções bacterianas de bactérias invasoras do citosol, como *Listeria monocytogenes* ou *Francisella novicida*, após serem lisadas no compartimento citosólico (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2010; JONES et al., 2010; RATHINAM et al., 2010; SAUER et al., 2010; WARREN et al., 2010; WU; FERNANDES-ALNEMRI; ALNEMRI, 2010).

Cepas virulentas de Mtb podem alterar o pH do fagossomo da célula hospedeira e impedir a maturação em fagolisossomo, como um mecanismo de sobrevivência para que possam residir dentro deles (CLEMENS; HORWITZ, 1995; ROHDE et al., 2007). Além disso, micobactérias virulentas podem escapar do fagossomo para o citosol (VAN DER WEL et al.,

2007; WELIN; LERM, 2012). No trabalho de van der Wel et al. (2007), foi possível observar que cepas virulentas de Mtb e *M. leprae* vivos são capazes de se translocar do fagolisossomo para o citosol de células hospedeiras não apoptóticas, e que a quantidade de bactérias no citosol aumenta conforme o tempo de infecção. Além disso, a translocação de Mtb para o citosol é dependente de ESX-1, bem como da secreção de CFP-10 e ESAT-6, que tem um papel importante na virulência do Mtb (VAN DER WEL et al., 2007).

O inflamassoma AIM2 é ativado com a presença de dsDNA citosólico e pode reconhecer Mtb após sua translocação para o citosol. Saiga et al. (2012) mostrou o DNA da cepa H37Rv co-localizado com AIM2 citosólico em macrófagos RAW264.7 após 6h de infecção, confirmando que o reconhecimento do DNA de Mtb pelo inflamassoma AIM2 ocorre dentro do compartimento citosólico. No mesmo estudo, camundongos AIM2<sup>-/-</sup> foram altamente suscetíveis a infecção pela cepa virulenta H37Rv de Mtb, em comparação com camundongos selvagens, com uma produção deficiente de IL-1 $\beta$  e IL-18, e uma resposta do tipo Th1 ineficiente (SAIGA et al., 2012). Esses resultados demonstram claramente que AIM2 desempenha um papel importante na resposta imune contra o Mtb (SAIGA et al., 2012). Entretanto, não está claro como o DNA de Mtb se torna exposto no citosol da célula e qual o papel da piroptose na proteção contra Mtb durante a ativação do inflamassoma AIM2. Em conjunto, os dados publicados apontam que o inflamassoma AIM2 exerce um papel importante no reconhecimento e proteção do hospedeiro contra o Mtb.

Enquanto células infectadas por diferentes tipos de microorganismos podem morrer por diferentes tipos de morte celular, como necrose, ferroptose, apoptose ou piroptose, a ativação de inflamassomas e a morte por piroptose é aparentemente a melhor opção no combate ao Mtb por restringir a propagação do patógeno no hospedeiro. Além disso, a liberação de citocinas como resultado da piroptose e ativação de resposta Th1 resulta no recrutamento de células efetoras e na morte eficiente das bactérias no local de infecção.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar de ter grande importância clínica devido ao desenvolvimento de doença grave, ainda não há pesquisas investigando como RDRio interage com o sistema imune do hospedeiro, e como se dá o processo de inflamação ou morte das células infectadas. De fato, estes tipos de estudos se limitam a cepas de pouca ou nenhuma circulação no Brasil, como Beijing, H37Rv e H37Ra.

Embora exista pouca informação sobre a RDRio, foi sugerido que esta sub-linhagem é capaz de atenuar a resposta imune do hospedeiro através da deleção de dois de seus antígenos de superfície (PPE55 e PPE56), que são importantes na virulência micobacteriana (LAZZARINI et al., 2008). Além disso, houve uma deleção no gene *pks15/1* de RDRio, que resultou na perda de um fenoglicolípido envolvido na inibição de citocinas pró-inflamatórias (LAZZARINI et al., 2008).

Como RDRio causa doença grave caracterizada pela presença de cavitações pulmonares, decorrente da incapacidade de macrófagos de conter a infecção, suspeitamos que esses processos estejam relacionados com a ativação de inflamassomas em macrófagos, devido a sua importância na regulação da resposta Th1 e morte celular por piroptose. Durante a ativação de inflamassomas, caspase-1 é ativada e pode clivar gasdermina D, que leva a célula ao processo de piroptose (FINK; COOKSON, 2006). Este processo de morte leva à formação de poros na membrana da célula, que resultam na liberação do conteúdo citoplasmático, incluindo bacilos intracelulares. Em contrapartida, inflamassomas são os principais responsáveis pela ativação e liberação de citocinas, como IL-18 e IL-1 $\beta$  (WAWROCKI; DRUSZCZYNSKA, 2017). Essas citocinas promovem recrutamento e diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> em perfil Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  e interleucinas pró-inflamatórias, além de induzir a atividade de células como TCD8<sup>+</sup> e NK (WAWROCKI; DRUSZCZYNSKA, 2017). Dessa forma, IL-18 e IL-1 $\beta$  atuam potencializando a resposta inflamatória, contribuindo para a eliminação do bacilo em células infectadas (MAYER-BARBER et al. 2010; SUGAWARA et al. 1999).

O Mtb pode ativar diferentes vias de inflamassoma através do reconhecimento de diversos PAMPs e DAMPs, como peptídeos microbianos, depleção de K<sup>+</sup> na célula ou expressão da proteína tirosina quinase (BRIKEN; AHLBRAND; SHAH, 2013). Estudos mostraram que o Mtb induz a expressão de IL-1 $\beta$  através da ativação do inflamassoma NLRP3 *in vitro* (DORHOI et al., 2012; MCELVANIA TEKIPPE et al., 2010; MISHRA et al., 2010a), devido à exposição a proteína ESAT-6 de Mtb (MISHRA et al., 2010a). A ativação do

inflamassoma dependente de ESX-1 também foi observada na infecção pelo *M. marinum* (Koo et al., 2008), sugerindo que a ativação do inflamassoma e a secreção de IL-1 $\beta$  na infecção por micobactérias é dependente de ESAT-6 (MISHRA et al., 2010). Paralelamente, polimorfismos no gene de NLRP3 também foram associados com o risco de desenvolvimento de tuberculose e tuberculose extrapulmonar (ABATE et al., 2019; LIU et al., 2020).

O inflamassoma AIM2 também foi associado com o reconhecimento intracelular de Mtb. Camundongos deficientes de AIM2 se mostraram mais suscetíveis a infecção com a cepa H37Rv, além de ter uma resposta Th1 prejudicada (SAIGA et al., 2012). Por outro lado, o estudo de Briken; Ahlbrand e Shah (2013), mostrou que as cepas H37Rv e H37Ra levaram a inibição da ativação do inflamassoma AIM2 através da expressão de IFN- $\beta$  *in vitro*. Nesse contexto, diferentes cepas de Mtb podem ativar diferencialmente o inflamassoma e a morte celular por piroptose, porém, ainda não se sabe como esse processo ocorre na infecção por cepas de grande circulação no Brasil, como RDRio.

Atualmente, existem poucas pesquisas associando a infecção por Mtb e piroptose. Um estudo feito em 2015 por (BAI et al., 2015), demonstrou que a morte celular por piroptose contribui para o efeito anti-Mtb da IL-32 $\gamma$ , uma citocina que induz a ativação de caspase-1 e produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos humanos. Adicionalmente, o ATP exógeno é um potente ativador do inflamassoma e da piroptose, e contribui para a morte intracelular de Mtb (KUSNER; BARTON, 2001). Em contrapartida, um outro estudo mostrou que a morte celular induzida por H37Rv não era dependente de caspase-1, mas sim de ESAT-6, indicando que é possível que esta cepa não induza piroptose (WELIN et al., 2011).

Já foi demonstrado que a cepa H37RV, utilizada como padrão em vários estudos de resposta imune na infecção por Mtb, possui significativas diferenças gênicas, e possivelmente fenotípicas em relação a isolados de Mtb colhidos em surtos de tuberculose pelo mundo (O'TOOLE; GAUTAM, 2017). Portanto, estudos de interação Mtb-célula hospedeira específicos para cepas de circulação, ou de predominância local, podem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas mais direcionadas ou até mesmo vacinas eficazes contra estas cepas de Mtb específicas. Este estudo poderá somar conhecimento relevante sobre como cepas de grande circulação no Brasil, como a RDRio, modulam a resposta de inflamassoma em macrófagos infectados. Essas informações ajudarão a compreender como Mtb sobrevive aos mecanismos de defesa do hospedeiro e como se dá sua disseminação, servindo como direcionamento para identificação de novos alvos terapêuticos para estudos aplicados a tuberculose.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar como isolados clínicos de RDRio, de circulação antiga e recente, modulam a ativação de inflamassoma e morte celular em macrófagos humanos.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Avaliar a expressão de genes relacionados ao inflamassoma durante a infecção;
- Quantificar a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 no sobrenadante de culturas de células infectadas;
- Avaliar se houve morte celular induzida pelos diferentes isolados clínicos durante a infecção;
- Correlacionar a carga bacilar de macrófagos humanos com a ativação do inflamassoma;
- Comparar as diferenças de ativação de inflamassoma e morte celular entre: RDRio de circulação antiga com RDRio de circulação recente;

## 4. MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

### 4.1. Desenho de Estudo

Vários experimentos piloto foram realizados para se obter as melhores condições de infecção para avaliação da ativação de inflamassoma durante a infecção. Dentre as condições testadas, diferentes concentrações de PMA, tempo de descanso das células após ativação, carga de infecção, e tempo de infecção foram avaliados.

Macrófagos humanos, derivados da linhagem THP-1 foram infectados com 5 ou 3 cepas de Mtb. Sub-linhagens de Mtb de isolados clínicos provenientes de pacientes acometidos por tuberculose pulmonar atendidos no Serviço de Pneumologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) entre 1995 e 1997, identificadas como isolados A, P e R, foram utilizadas no estudo. As análises de MIRU-VNTR mostraram que o isolado A apresentou baixa homologia (50%) a RDRio, enquanto o isolado P apresentou alta homologia (91%) a RDRio. O isolado R apresentou 100% de homologia a RDRio e resistência a isoniazida (XDR), o que demonstra circulação desta sub-linhagem no Brasil anos antes da sua identificação, em 2007. Paralelamente, um isolado de RDRio de circulação recente (isolado em 2010) foi utilizado nos experimentos como grau de comparação com o isolado de RDRio de circulação há 20 anos atrás. O isolado de RDRio de circulação recente foi cedido pelo Laboratório de Pesquisa em Micobacterias/UFMG, isolado de amostras clínicas de pacientes com tuberculose pulmonar entre 2008 e 2011, identificado através de MIRU/VNTR e com resistência a isoniazida, estreptomicina e azitromicina (MDR). As infecções foram feitas na proporção MOI 5:1 ou 10:1. A cepa H37Rv foi utilizada como cepa de referência e macrófagos não infectados foram utilizados como controle dos experimentos. Os macrófagos foram infectados, e nos tempos de 6, 24, 48, 72, 96 e 120h foram avaliados a carga bacilar e os eventos celulares relacionados com ativação de inflamassomas. Proteínas totais foram extraídas por Trizol ou solução de lise. RNA total e DNA foram extraídos por Trizol ou *mirVana* miRNA Isolation Kit. A carga bacilar foi avaliada por contagem de CFU ou qPCR e a expressão de genes de inflamassoma foi avaliada por qPCR. A morte celular foi avaliada através de ensaios de liberação de LDH. A liberação de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 foi avaliada através de ELISA com os sobrenadantes celulares. Os resultados finais são representativos de 2 experimentos de infecção independentes.

## 4.2. Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Os isolados de Mtb foram cultivados em meio Middlebrook 7H9, suplementado com Albumina Dextrose Catalase (OADC, 10%) à 37°C durante 3 a 4 semanas. Após o crescimento, as cepas foram congeladas a -70°C, em PBS, para posterior uso. A carga bacteriana foi quantificada após congelamento para determinação de CFU para os experimentos de infecção com as cepas recém descongeladas. Alternativamente, os isolados foram cultivados em meio Middlebrook 7H9 suplementado com Albumina Dextrose Catalase (OADC) 10% e tyloxapol a 0,25% ou 0,025% à 37°C durante 15 a 20 dias, com adição de meio fresco semanalmente. O crescimento foi acompanhado através de comparação visual com escala McFarland, e as bactérias foram utilizadas para o experimento de infecção ao atingirem a fase log de crescimento. Para calcular a quantidade de bactérias para realizar o experimento, foi coletado 60ul da suspensão para leitura de densidade ótica (OD) por espectrofotometria, e resultado da OD foi incluído na equação da curva da escala McFarland. Alternativamente, para o experimento descrito no item 6, foi considerado “OD = 1,00” equivalente a  $10^8$  bactérias/ml, e o resultado da leitura foi calculado através de regra de 3.

Para a contagem de CFU, as bactérias foram plaqueadas em 5 diluições seriadas (fator de 10), em duplicata e espalhadas em placas de petri com meio de cultura sólido Middlebrook 7H11 ou 7h10, suplementado com OADC 10%, a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. As colônias foram contadas duas a quatro semanas após o plaqueamento.

## 4.3. Cultivo de células da linhagem THP-1 e diferenciação em macrófagos

Linhagens de células monocíticas humanas THP-1 foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion), 2mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina (meio completo) em 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram expandidas e mantidas por passagens sucessivas por duas ou três semanas até atingirem quantidade suficiente para os experimentos.

Para os experimentos, as células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos por indução de acetato de miristato de forbol (PMA). Para isso, células THP-1 foram cultivadas em placas de 6, 24 ou 96 poços na concentração de  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$  ou  $5 \times 10^3$  células/poço, respectivamente, por 48h em meio RPMI completo com 8,1nM, 16,21nM ou 100nM de PMA a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>.



#### 4.4. Padronização da ativação de inflamassomas nas células THP-1

Células THP-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço e estimuladas com PMA à 8,1nM durante 48h para diferenciação e ativação de monócitos em macrófagos. Após a diferenciação, as células foram estimuladas com LPS à 100ng/ml e ATP à 3mM durante 3 e 24h. As células não estimuladas foram usadas como controle.

Após cada tempo de estimulação, foi feita extração de RNA das células pelo protocolo de Trizol e transcrição do RNA em cDNA. Foram utilizadas 20ng de cDNA para a reação de qPCR. O gene constitutivo RLP37A foi utilizado como controle de expressão da quantificação relativa da expressão gênica.

#### 4.5. Experimentos de infecção com os isolados clínicos

Após 48h de diferenciação de monócitos em macrófagos, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e infectadas com os isolados clínicos e a cepa H37Rv na proporção MOI 5:1 ou 10:1 em meio RPMI com BSA 5% por 4h a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Alternativamente, após 48h de diferenciação as células foram deixadas descansando por 24 ou 48h em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion), 2mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina (meio completo) em 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de descanso o meio de cultura das células foi trocado por meio RPMI com BSA 5% e fizemos a infecção com os isolados clínicos na proporção 10:1 por 4h a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o tempo de infecção as células foram lavadas com PBS para retirada bactérias não aderentes. Após 6, 24, 48, 72, 96 e 120h de infecção, os sobrenadantes foram coletados e congelados, e as células aderidas foram lisadas para coleta do conteúdo intracelular.

#### 4.6. Extração de DNA e RNA

Após cada tempo de infecção com os isolados clínicos, as células foram lisadas com Trizol e foi utilizado o protocolo de Trizol™ (Invitrogen) para extração e isolamento de RNA total, DNA e proteínas de cada tempo de infecção, de acordo com o fabricante. Em alguns experimentos foi utilizado o kit *mirVana* miRNA Isolation para extrações de DNA, RNA total e miRNA. O DNA e RNA foram quantificados por espectrofotometria, pelo cálculo de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

#### 4.7. Quantificação da carga bacteriana por qPCR

A quantificação da carga bacteriana com qPCR foi feita com as amostras de DNA do experimento de infecção, utilizando o método de SYBR green e primer para amplificação específica do gene 85B de Mtb. A quantificação relativa foi calculada baseada na presença do gene  $\beta$ -globulina, na célula hospedeira.

#### 4.8. CFU

Após 4h de infecção com os isolados clínicos, as células THP-1 foram lavadas com PBS para retirada das bactérias não aderentes, e os sobrenadantes foram coletados e plaqueados, em diferentes diluições, em meio de cultura agar Middlebrook 7H11 ou agar Middlebrook 7H10, ambos suplementados com 10% de OADC. Após o plaqueamento dos sobrenadantes, as células foram lavadas uma vez com 1ml de água, e depois lisadas com 0,1% de Triton X-100 ou 0,1% de SDS. O lisado celular foi coletado e plaqueado em meio de cultura agar Middlebrook 7H11 ou agar Middlebrook 7H10, ambos suplementados com 10% de OADC. Após 24, 48, 72, 96 e 120h de infecção, os sobrenadantes e lisado celular foram plaqueados como descrito acima. Então, as placas com meio de cultura 7H11 ou 7H10 foram armazenadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 3-4 semanas, com contagem posterior de unidades formadoras de colônia.

#### 4.9. qPCR

O RNA extraído foi convertido em cDNA através da enzima transcriptase reversa (Goscript, Promega) de acordo com as instruções do fabricante, e utilizando um termociclador Mastercycler (Eppendorf).

O cDNA foi utilizado para avaliação de expressão gênica por qPCR por método SYBR Green (Fast Evagreen qPCR Master Mix, Biotium) de acordo com as instruções do fabricante. Primers específicos para os genes alvo foram desenhados para amplificação específica (NLRP3, IL-1 $\beta$ , AIM2 e ASC), seguindo o programa primer Blast. Os primers foram validados em ensaio de avaliação da expressão gênica em experimentos controle para a ativação de inflamassoma nas células THP-1. A expressão do gene RPL37A foi utilizada como controle interno da quantificação relativa da expressão. Para amplificação dos genes ASC, NLRP3, AIM2 e RPL37A, utilizamos os primers à 3 $\mu$ M e para amplificação de IL-1 $\beta$ , o primer foi utilizado a 0,150 $\mu$ M. A montagem das placas foi feita manualmente ou utilizando o robô epMotion 5070 (Eppendorff), e as amostras foram amplificadas no equipamento QuantStudio™ 3 System (ThermoFisher). Os resultados de quantificação relativa foram calculados pela fórmula  $Q=2^{-C_t}$

$\Delta\Delta C_t$ , onde um controle não-infectado/não-estimulado foi utilizado como base para o cálculo. Foram consideradas válidas, as triplicatas que apresentaram uma diferença de valor de  $C_t \leq 0,5$  entre elas.

#### **4.10. Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH)**

Os sobrenadantes coletados durante os experimentos de infecção foram utilizados para medir a liberação de LDH das células usando o Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.11. ELISA**

Os sobrenadantes coletados durante os experimentos de infecção foram utilizados para medir a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 das células usando o kit DuoSet ELISA (R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.12. Análise estatística**

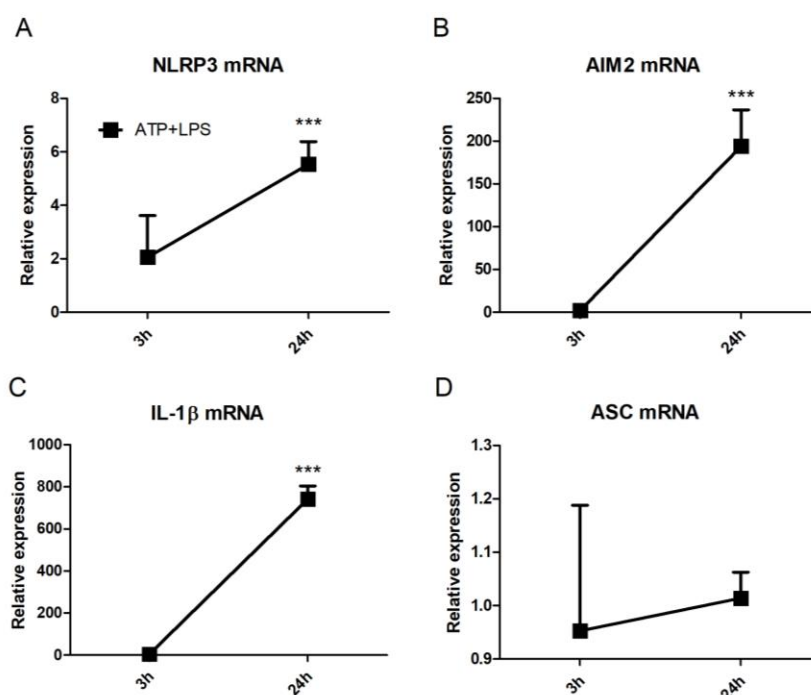
Foram realizados testes de Análise de variância (ANOVA-two-way), com post-test de Bonferroni para correção de múltiplas comparações, entre os grupos e ao longo dos tempos. Foi considerado um valor de  $p < 0,05$  para significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0.

## 5. PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Inicialmente, foram feitos vários experimentos em diferentes condições, para que conseguíssemos encontrar as condições ideais para avaliar a ativação de inflamassoma em células THP-1 infectadas com as diferentes cepas de Mtb, dentro do nosso modelo de estudo.

### 5.1 Análise da indução da ativação de inflamassomas em células THP-1

Para avaliação e confirmação da especificidade dos primers desenhados no Primer-blast, e para confirmar que nossas células THP-1 expressavam os genes de interesse, realizamos um experimento controle de indução através do estímulo de macrófagos THP-1 com ATP e LPS. Observamos que o tratamento com ATP e LPS induziu um aumento da expressão dos genes NLRP3, AIM2 e IL-1 $\beta$  nas células em relação ao controle sem estímulo após 24h ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$  respectivamente) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A, B e C**). Por outro lado, não houve aumento na expressão do gene ASC nas células estimuladas com ATP e LPS (**Erro! Fonte de referência não encontrada.D**). Esses resultados confirmam que nossas células expressam os genes NLRP3, AIM2 e IL-1 $\beta$  e que nossos primers eram específicos para esses genes. Entretanto, não podemos afirmar o mesmo para o gene ASC.



**Fig. 20** - qPCR dos genes NLRP3, AIM2, IL-1 $\beta$  e ASC.

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram incubados com LPS (100ng/ml) e ATP (3mM) durante 3 e 24h. A expressão foi normalizada utilizando RPL37A como gene constitutivo. Os dados mostrados representam o aumento de expressão do gene em relação ao controle não ativado em cada tempo. Os resultados foram expressos em relação ao controle não ativado, e como média e desvio padrão \*\*\* $p < 0,001$ .

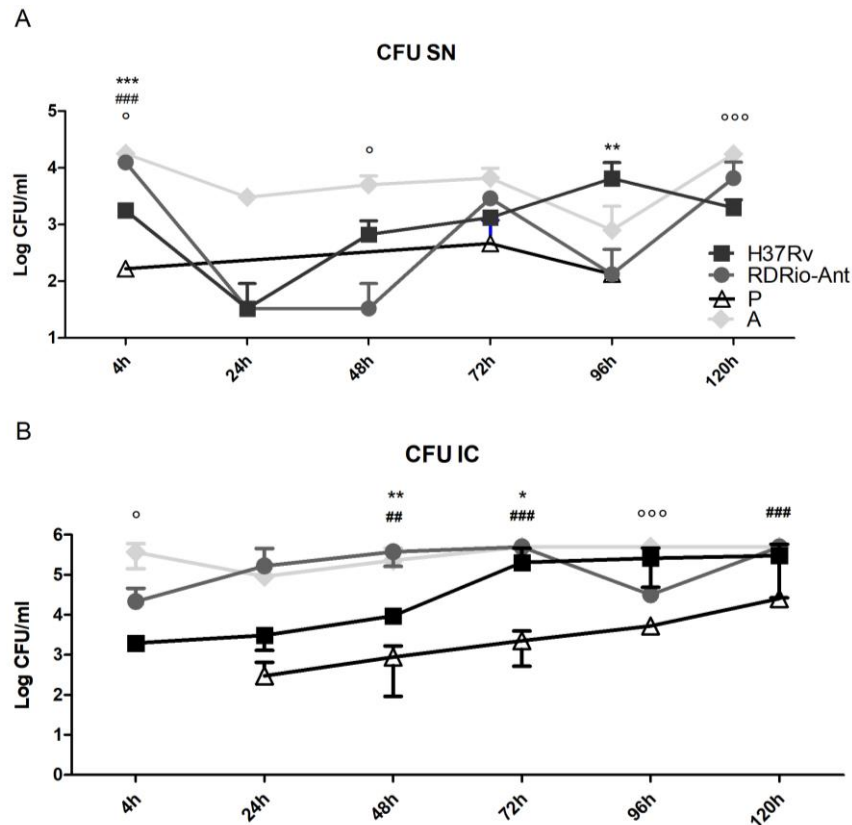
## 5.2 Experimento 1

Células THP-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços, com  $5 \times 10^5$  células/poço, para experimentos de qPCR, e em placas de 96 poços com  $5 \times 10^3$  células/poço para experimentos de CFU. As células foram diferenciadas em macrófagos por indução de PMA a 8,1nM, durante 48h. Após a diferenciação, as células foram lavadas com PBS três vezes e infectadas com as cepas na concentração MOI 5 durante 6, 24, 48, 72, 96 e 120h. As cepas estavam armazenadas em freezer -80 e foram descongeladas no dia da infecção. Neste início, foram incluídas as cepas A, de baixa homologia a RDRio (50%), a cepa P, de alta homologia a RDRio (91%), a H37Rv padrão de laboratório. Apenas a RDRio de circulação antiga (RDRio-Ant) foi incluída pois não havíamos conseguido amostras de isolados de RDRio de circulação recente até o momento. A extração de RNA foi feita através de lise de três pools de quadruplicata ( $2 \times 10^6$  células, no total) com solução de Trizol. O CFU foi feito em placas de 7H11. Os resultados deste experimento são representativos de dois experimentos independentes.

### 5.2.1 Quantificação da carga bacteriana por CFU

Em relação a carga bacilar nos sobrenadantes das células infectadas, após 48h de infecção, a carga bacilar de RDRio-Ant foi menor comparado a da cepa A ( $p < 0,05$ ) (Fig. 21A). A CFU de RDRio-Ant foi maior após 4h, e menor após 96h, comparado a de H37Rv ( $p < 0,001$ , e  $p < 0,01$ , respectivamente).

Células infectadas com RDRio-Ant apresentaram maior carga bacilar intracelular comparado a cepa H37Rv em 48 e 72h ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), e comparado à cepa P, em 48, 72 e 120h ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) (Fig. 21B). As células infectadas com RDRio-Ant apresentaram carga bacilar intracelular similar comparado ao grupo A em 24, 48 e 72h (Fig. 21B). Porém, em 4 e 96h, a CFU do grupo RDRio-Ant foi menor comparado ao grupo infectado com a cepa A ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).



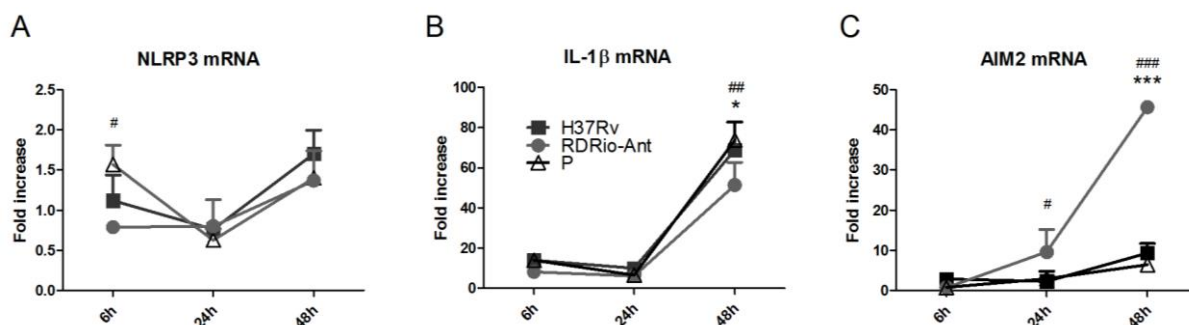
### 5.2.2 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb

Foi avaliada a expressão gênica de NLRP3, IL-1 $\beta$  e AIM2 das amostras 6, 24 e 48 horas após infecção. Não foi possível utilizar as amostras de 72, 96 e 120h pois as células contaminaram durante o experimento de infecção.

Após 6h de infecção, as células infectadas com RDRio-Ant apresentaram menor expressão de NLRP3 em relação as células infectadas com a cepa P ( $p$ <0,05) (Fig. 22A).

Após 48h de infecção, RDRio-Ant induziu menor expressão de IL-1 $\beta$  nas células infectadas, comparado ao grupo infectado com H37Rv e P ( $p$ <0,05 e  $p$ <0,01, respectivamente) (Fig. 22B).

Após 24h, as células infectadas com RDRio-Ant apresentaram maior expressão de AIM2 em relação as células infectadas com a cepa P ( $p$ <0,05) (Fig. 22C). O gene AIM2 apresentou alta expressão nas células infectadas com RDRio-Ant em relação a infecção com as cepas P e H37Rv após 48h ( $p$ <0,001 e  $p$ <0,001, respectivamente) (Fig. 22C).



**Fig. 22 - qPCR dos genes NLRP3, AIM2 e IL-1 $\beta$ .**

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e P (MOI 5:1) nos tempos indicados. A expressão foi normalizada utilizando RPL37A como gene constitutivo. Os resultados foram expressos em relação ao controle não infectado, e como média e desvio padrão \*\*\* e ### $p$ <0,001, ## $p$ <0,01 e # $p$ <0,05. Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv, e os (#) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e P.

## 5.3 Experimento 2

Células THP-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em uma quantidade de  $5 \times 10^5$  células/poço, para experimentos de qPCR e ensaios de LDH. As células foram diferenciadas em macrófagos por indução de PMA a 16,21nM, durante 48h. Após a diferenciação, as células foram deixadas descansando em meio RPMI completo, sem PMA, durante 24h. Após o descanso as células foram lavadas com PBS três vezes e infectadas com os isolados clínicos A, P e RDRio-Ant, além da cepa padrão de laboratório H37Rv, em MOI 10, durante 6, 24, 48, 72, 96 e 120h. Os isolados clínicos estavam armazenados em freezer -80 e foram descongelados no dia da infecção. A extração de RNA foi através de lise de três pools de quadruplicata ( $2 \times 10^6$  células, no total) com o kit de extração *mirVana* miRNA Isolation.

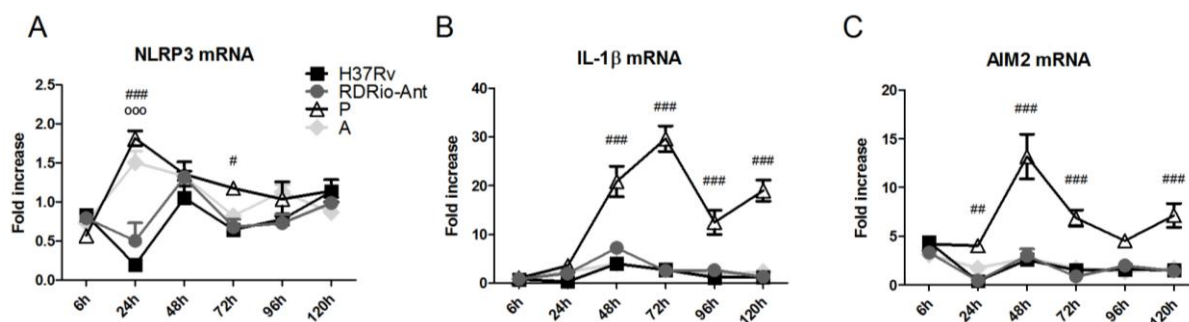
### 5.3.1 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb

Foi feita a avaliação da expressão gênica de NLRP3, AIM2 e IL-1 $\beta$  com as amostras de 6, 24, 48, 72, 96 e 120h de infecção.

As células infectadas com as cepas A e P apresentaram maior expressão de NLRP3 em relação as células infectadas com RDRio-Ant após 24h ( $p$ <0,001 e  $p$ <0,001, respectivamente) (Fig. 23A).

As células infectadas com RDRio-Ant apresentaram baixa expressão de IL-1 $\beta$  em relação ao grupo infectado com a cepa P a partir de 48 até 120h de infecção ( $p$ <0,001) (Fig. 23B).

A partir de 24 até 120h pós infecção, com exceção de 96h, a cepa P induziu maior expressão de AIM2 comparado ao grupo infectado por RDRio-Ant,  $p$ <0,01 (Fig. 23C).



**Fig. 23** - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$  e AIM2.

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant, P e A (MOI 10:1) nos tempos indicados. A expressão foi normalizada utilizando RPL37A como gene constitutivo. Os resultados foram expressos em relação ao controle não infectado, e como média e desvio padrão ### e °°° $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$  e # $p < 0,05$ . Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv, os (#) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e a cepa P e os (°) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e a cepa A.

### 5.4 Experimento 3

A partir deste experimento, apenas RDRio-Ant, RDRio-Rec e H37Rv foram incluídas, devido a questões de logística.

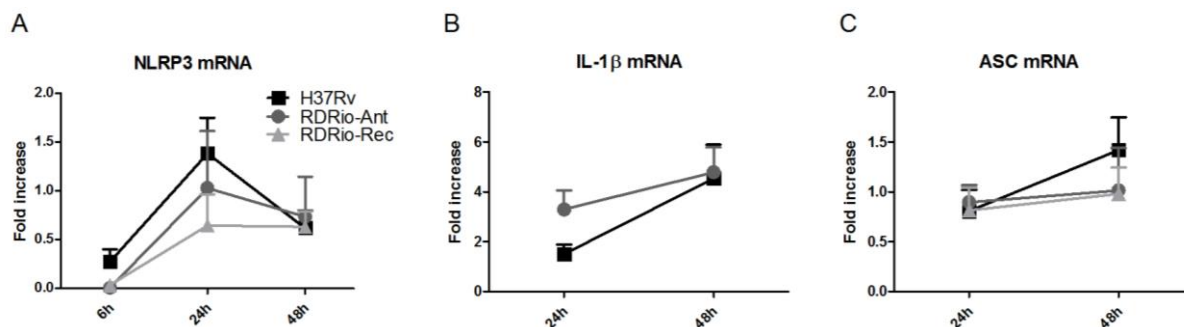
Células THP-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em uma quantidade de  $5 \times 10^5$  células/poço, para experimentos de qPCR e ensaios de LDH. As células foram diferenciadas em macrófagos por indução de PMA a 16,21nM, durante 48h. Após a diferenciação, as células foram deixadas descansando em meio RPMI completo, sem PMA, durante 48h. Após o descanso as células foram lavadas com PBS cinco vezes e infectadas com RDRio-Ant e RDRio-Rec, além de H37Rv, na concentração MOI 10, durante 6, 24 e 48h. As cepas foram cultivadas em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,25% de tyloxapol. O crescimento foi acompanhado através de comparação visual com escala McFarland, e as bactérias foram utilizadas para o experimento de infecção ao atingirem a fase log de crescimento. Para calcular a quantidade de bactérias para realizar o experimento, foi coletado 60ul da suspensão para leitura de densidade ótica (OD) por espectrofotometria, e resultado da OD foi incluído na equação da curva da escala McFarland. A extração de RNA foi feita através da lise de três pools de quadruplicata ( $2 \times 10^6$  células) com o kit de extração *mirVana* miRNA Isolation.

#### 5.4.1 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb

Foi feita a avaliação da expressão gênica de NLRP3, ASC e IL-1 $\beta$  com o cDNA das amostras de 6, 24 e 48h após infecção.

Não observamos diferenças na expressão dos genes durante a infecção (Fig. 24A - C).





**Fig. 24** - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$  e ASC.

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1) nos tempos indicados. A expressão foi normalizada utilizando RPL37A como gene constitutivo. Os resultados foram expressos em relação ao controle não infectado.

## 5.5 Experimento 4

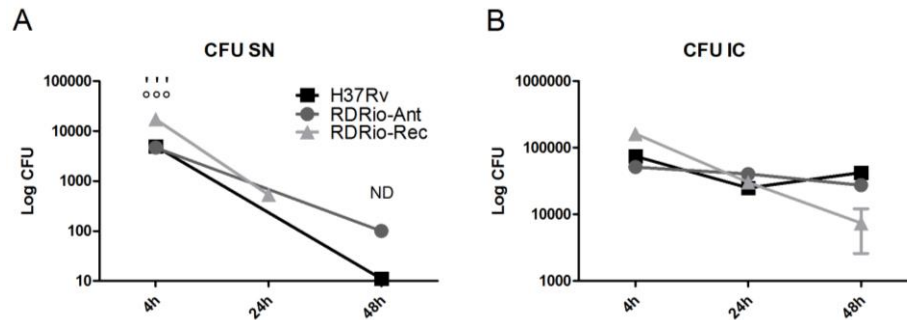
Células THP-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços, em uma quantidade de  $2 \times 10^6$  células/poço, para experimentos de qPCR e ensaios de LDH e ELISA, e plaqueadas em placas de 24 poços em uma quantidade de  $5 \times 10^5$  células/poço para experimentos de CFU. As células foram diferenciadas em macrófagos por indução de PMA a 100nM, durante 48h. Após a diferenciação, as células foram deixadas descansando em meio RPMI completo, sem PMA, durante 48h. Após o tempo de descanso o meio de cultura das células foi trocado por meio RMPI completo fresco e as células foram infectadas com RDRio-Ant e RDRio-Rec, além de H37Rv, na concentração MOI 10, durante 6, 24 e 48h. As cepas foram cultivadas em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,025% de tyloxapol, e foi adicionado meio de cultura fresco duas vezes por semana. O acompanhamento do crescimento e cálculo de inóculo para realizar o experimento de infecção está descrito no item 5.3. A extração de RNA foi feita através da lise das células ( $2 \times 10^6$ ) com a solução de Trizol.

### 5.5.1 Quantificação da carga bacteriana por CFU

Devido a problemas de contaminação, não foi possível incluir os dados de RDRio-Rec nos sobrenadantes 48h pós infecção.

RDRio-Rec apresentou a maior carga bacilar no sobrenadante 4h pós infecção, em relação a RDRio-Ant e H37Rv ( $p < 0,001$ ) (Fig. 25A).

As células infectadas com H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec apresentaram carga bacilar intracelular similar durante todo o período de infecção avaliado (Fig. 25B).



**Fig. 25** - CFU extracelular e intracelular.

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1). (A) Contagem de CFU dos sobrenadantes (SN) após cada tempo de infecção. (B) Contagem de CFU intracelular (IC) de células THP-1 aderidas lisadas com água e SDS 0,1% após cada tempo de infecção. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão  $^{***}p < 0,001$ . Os (°) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e RDRio-Rec, e os (') representam a diferença estatística entre RDRio-Rec e H37Rv. ND = Não detectado.

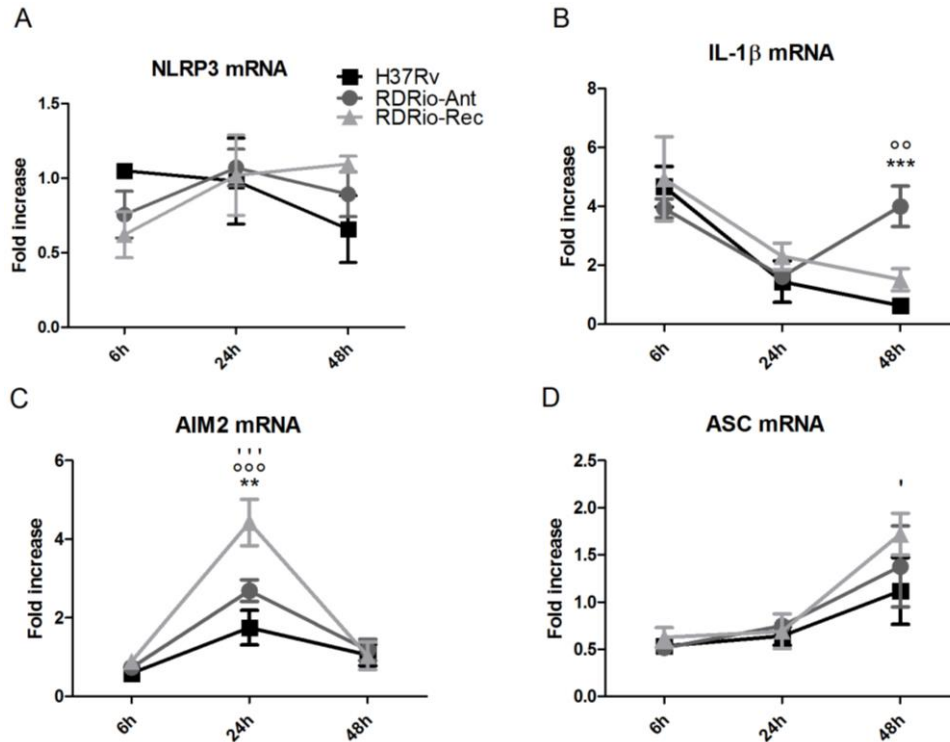
### 5.5.2 Expressão de genes de inflamassomas em células THP-1 infectadas com Mtb

Não houve diferença na expressão do gene NLRP3 pelas células infectadas durante os três tempos de infecção (Fig. 26A).

Em 48h de infecção as células infectadas com RDRio-Ant apresentaram maior expressão de IL-1 $\beta$  comparado às infectadas por RDRio-Rec e H37Rv ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) (Fig. 26B).

As células infectadas com RDRio-Rec apresentaram maior expressão do gene AIM2 após 24h em relação as células infectadas com RDRio-Ant e H37Rv ( $p < 0,001$ ) (Fig. 26C). Neste mesmo intervalo de tempo, o grupo infectado com RDRio-Ant apresentou maior expressão de AIM2 comparado ao H37Rv ( $p < 0,01$ ) (Fig. 26C).

Apenas RDRio-Rec induziu maior expressão do gene ASC pelas células infectadas após 48h em relação a H37Rv ( $p < 0,05$ ) (Fig. 26D).

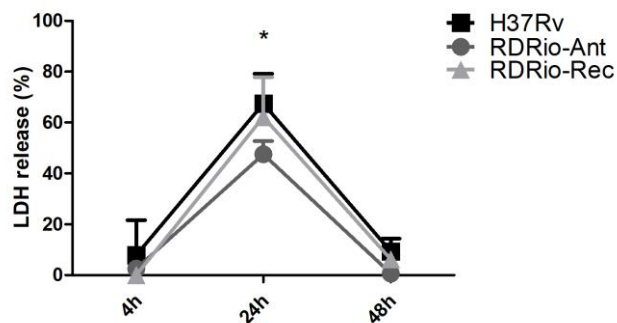


**Fig. 26** - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$ , AIM2 e ASC.

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1) nos tempos indicados. A expressão foi normalizada utilizando RPL37A como gene constitutivo. Os resultados foram expressos em relação ao controle não infectado, e como média e desvio padrão \*\*\* e  $^{\circ\circ\circ}p < 0,001$ , \*\* e  $^{\circ\circ}p < 0,01$ . Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv, os (°) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e RDRio-Rec, e os (‘) representam a diferença estatística entre RDRio-Rec e H37Rv.

### 5.5.3 Ensaio de liberação de LDH

Observamos que em 24h as células infectadas com H37Rv liberaram maior quantidade de LDH em relação as células infectadas com RDRio-Ant ( $p < 0,05$ ) (Fig. 27).



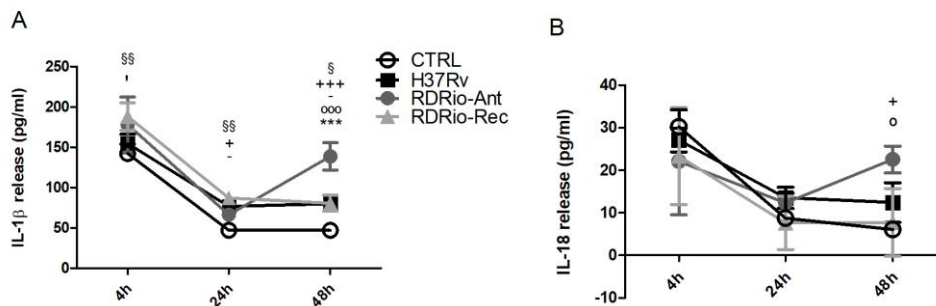
**Fig. 27** - Liberação de LDH por células THP-1 infectadas com Mtb.

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados ou não pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1) nos tempos indicados. O resultado foi calculado em relação ao controle negativo, considerado igual a 1, e apresentados como média e desvio padrão  $*p < 0,05$ . Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv.

### 5.5.4 Ensaio de ELISA para IL-1 $\beta$ e IL-18

As células infectadas com RDRio-Rec liberaram mais IL-1 $\beta$  no sobrenadante em relação as células infectadas com H37Rv após 4h (Fig. 28A). Após 48h, as células infectadas com RDRio-Ant liberaram mais IL-1 $\beta$  do que as células infectadas com H37Rv e com RDRio-Rec ( $p<0,001$ ) (Fig. 28A).

Apenas em 48h de infecção as células infectadas com RDRio-Ant liberaram mais IL-18 nos sobrenadantes, em relação as células infectadas com RDRio-Rec ( $p<0,05$ ) (Fig. 28B).



## 6. RESULTADOS

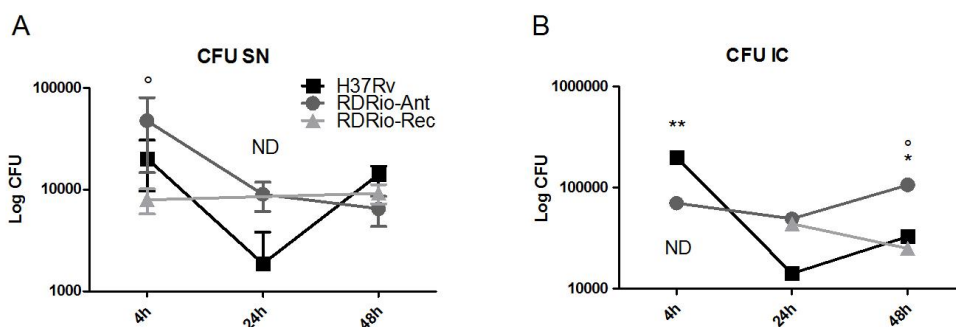
Para este experimento, foi seguido o mesmo protocolo realizado no t pico 5.4. Mantivemos este protocolo pois a concentra o de PMA utilizada foi ideal para manter as células aderidas, evitando perdas. Além disso, a alta concentra o de PMA, juntamente com o MOI 10, potencializou a infec o, permitindo uma melhor análise dos dados obtidos. Foi possível observar através de CFU que os dois experimentos apresentaram uma taxa de infec o próxima. Sendo assim, este resultado   representativo de dois experimentos independentes.

### 6.1. Quantifica o da carga bacteriana por CFU

Avaliamos a carga bacilar dos isolados clínicos nos sobrenadantes celulares após 6, 24 e 48h de infec o.

Os sobrenadantes das células infectadas com RDRio-Ant apresentaram maior carga bacilar em rela o as células infectadas com RDRio-Rec em 4h ( $p < 0,05$ ) (Fig. 29A). Em 48h de infec o, as 3 cepas apresentaram carga bacilar similar nos sobrenadantes celulares (Fig. 29A).

As células infectadas com H37Rv apresentaram maior carga bacilar intracelular em 4h de infec o em rela o as células infectadas com RDRio-Ant (Fig. 29B). Em 24h de infec o, os grupos RDRio-Ant e RDRio-Rec apresentaram carga bacilar intracelular similar. Em 48h, as células infectadas com RDRio-Ant apresentaram maior carga bacilar intracelular em rela o as células infectadas com H37Rv e RDRio-Rec ( $p < 0,05$ ) (Fig. 29B).



**Fig. 29 - CFU extracelular e intracelular**

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1). (A) Contagem de CFU dos sobrenadantes (SN) após cada tempo de infec o. (B) Contagem de CFU intracelular (IC) em células THP-1 aderidas lisadas com água e SDS 0,1% após cada tempo de infec o. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão \*\* $p > 0,01$  e \* e    $p < 0,05$ . Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv e ( ) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e RDRio-Rec. Não foi possível quantificar a carga bacilar de RDRio-Rec 24h pós infec o no sobrenadante das culturas e de RDRio-Rec 4h pós infec o na CFU intracelular, representado por ND = Não detectado.

## 6.2. Micobactérias de sub-linhagem RDRio induzem maior expressão de genes do complexo de inflamassoma em células THP-1 infectadas

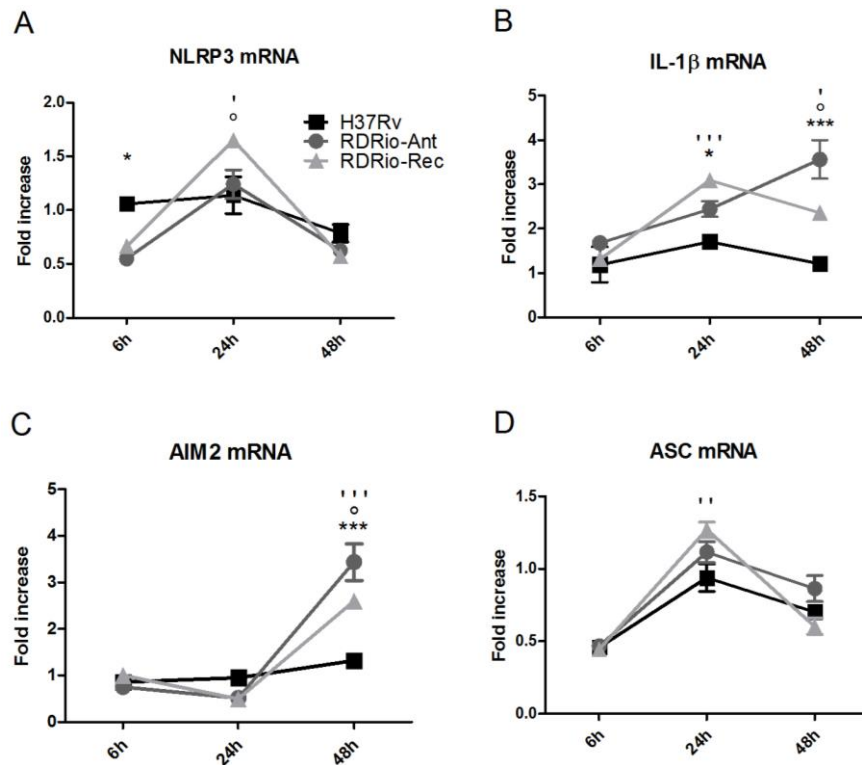
Para observar se as sub-linhagens de Mtb aumentam a expressão de genes relacionados ao inflamassoma, analisamos a expressão gênica de NLRP3, AIM2, IL-1 $\beta$  e ASC com as amostras após 6, 24 e 48h de infecção.

Após 6h, RDRio-Ant induziu a regulação negativa de NLRP3 em relação as células infectadas com H37Rv ( $p<0,05$ ) (Fig. 30A). Em 24h, apenas RDRio-Rec induziu alta expressão de NLRP3 em relação as células infectadas com RDRio-Ant e H37Rv ( $p<0,05$ ) (Fig. 30A).

Após 24h de infecção, RDRio-Ant induziu maior expressão de IL-1 $\beta$  nas células infectadas, em relação a células infectadas com H37Rv. No mesmo período, RDRio-Rec induziu maior expressão desse gene em relação ao mesmo grupo ( $p<0,001$ ) (Fig. 30B). Já em 48h, a infecção com RDRio-Ant induziu a maior expressão de IL-1 $\beta$  em relação as células infectadas com RDRio-Rec e H37Rv ( $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente) (Fig. 30B).

Em 48h, as células infectadas com RDRio-Ant apresentaram alta expressão do gene AIM2 em relação as células infectadas com RDRio-Rec e H37Rv ( $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente) (Fig. 30C).

Apesar de apresentar uma regulação negativa após 6h ( $p<0,001$ ), houve maior indução da expressão de ASC 24h após infecção nos grupos infectados com RDio-Rec em relação ao grupo infectado com H37Rv ( $p<0,01$ ) (Fig. 30D).

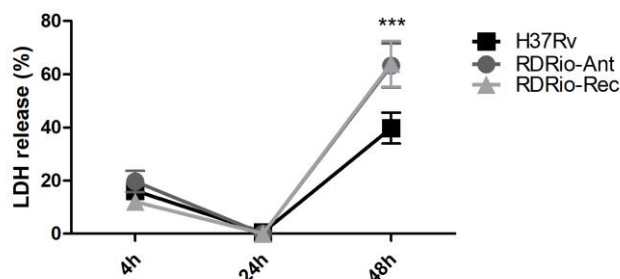


**Fig. 30** - qPCR dos genes NLRP3, IL-1 $\beta$ , AIM2 e ASC.

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1) nos tempos indicados. A expressão foi normalizada utilizando RPL37A como gene constitutivo. Os resultados foram expressos em relação ao controle não infectado, e como média e desvio padrão \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv, os (°) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e RDRio-Rec, e os (°) representam a diferença estatística entre RDRio-Rec e H37Rv.

### 6.3. Micobactérias de sub-linhagem RDRio induzem o aumento de morte em células THP-1

Fizemos o ensaio de liberação de LDH nos sobrenadantes celulares após 6, 24 e 48h de infecção para avaliar se houve morte celular. As células infectadas com RDRio-Ant e RDRio-Rec induziram a maior de liberação de LDH em relação as células infectadas com H37Rv ( $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) (Fig. 31).



**Fig. 31** - Liberação de LDH por células THP-1 infectadas com Mtb.

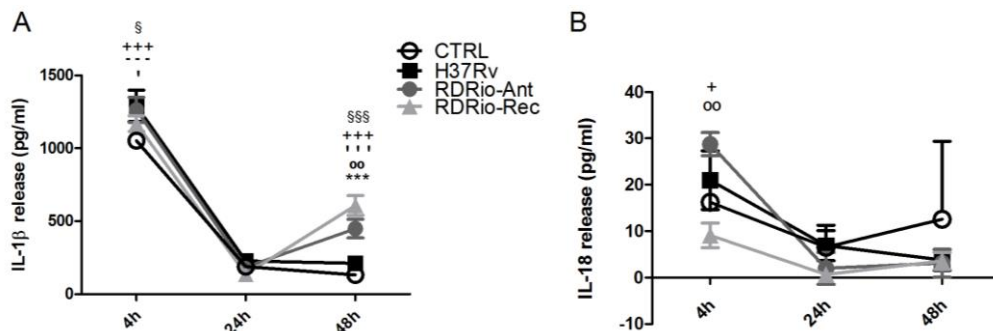
**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1) nos tempos indicados. A porcentagem de liberação de LDH foi calculada em relação a controles não infectados. Como média e desvio padrão \*\*\* $p < 0,001$ . Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv.

#### 6.4. Liberação de IL-1 $\beta$ e IL-18 nos sobrenadantes celulares

Fizemos ELISA para quantificar a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 nos sobrenadantes celulares após 6, 24 e 48h de infecção.

Houve alta produção de IL-1 $\beta$  em todos os grupos avaliados após 4h de cultura. Porém, apenas os grupos infectados com RDRio mantiveram níveis altos de produção dessa citocina 48h após infecção. Em 48h, as células infectadas com RDRio-Rec liberaram maior quantidade de IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes, em relação as células infectadas com RDRio-Ant ( $p < 0,01$ ) e H37Rv ( $p < 0,001$ ) (Fig. 32A).

Observamos que houve pouca liberação de IL-18 nos sobrenadantes das células infectadas. Em 4h de infecção apenas as células infectadas com RDRio-Ant liberaram maior quantidade de IL-18 em relação as células infectadas com RDRio-Rec ( $p < 0,01$ ) (Fig. 32B). Após 24 e 48h de infecção os valores para liberação de IL-18 ficaram abaixo do limite de detecção do teste (Fig. 32B).



**Fig. 32 - Liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 nos sobrenadantes celulares de células THP-1 infectadas com Mtb.**

**Nota:** Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados ou não (CTRL) pelas cepas H37Rv, RDRio-Ant e RDRio-Rec (MOI 10:1) nos tempos indicados. Os resultados foram expressos em relação a curva padrão, na qual o pico mais alto equivale a 250pg/ml. Como média e desvio padrão \*\*\*, +, -, §§§ e ‘‘’ $p < 0,001$ , \*\* e ° $p < 0,01$  e \*, + e ‘ $p < 0,05$ . Os (\*) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e H37Rv, (°) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e RDRio-Rec, (+) representam a diferença estatística entre RDRio-Ant e CTRL, (-) representam a diferença estatística entre H37Rv e CTRL, e (§) representam a diferença estatística entre RDRio-Rec e CTRL.



## 7. DISCUSSÃO

RDRio é uma sub-linhagem de *M. tuberculosis* (Mtb) com a maior circulação na América do Sul, e também no Brasil (LAZZARINI et al., 2008). Foi observado que pacientes com tuberculose pulmonar causada por RDRio desenvolvem um quadro clínico grave com a presença de cavitações pulmonares e hemoptise (LAZZARINI et al., 2008), o que pode facilitar a disseminação da bactéria entre os contatos.

O Mtb é um bacilo intracelular facultativo, que infecta principalmente macrófagos alveolares, os principais responsáveis por eliminar os bacilos e conter a infecção através da formação de granulomas (SEGOVIA-JUAREZ; GANGULI; KIRSCHNER, 2004b). Para que a infecção seja contida, o hospedeiro deve ser capaz de ativar macrófagos e modular a ativação de quimiocinas e citocinas, controlando a inflamação de forma que não ocorra necrose tecidual e dano significativo (SAUNDERS; COOPER, 2000). Estudos anteriores demonstraram que cepas de Mtb são capazes de ativar diferentes vias de inflamação (BIRIKEN; AHLBRAND; SHAH, 2013; DORHOI et al., 2012; SAIGA et al., 2012; MISHRA et al., 2010b). Como RDRio de Mtb causa uma doença grave com formação de cavitações pulmonares, suspeitamos que a ativação de inflamação em macrófagos humanos derivados de linhagem THP-1 pudesse estar associada com esse processo.

Células derivadas de leucemia monocítica aguda (THP-1) são frequentemente utilizadas para a determinação *in vitro* das vias de sinal e das funções de macrófagos. Diversos trabalhos utilizam essa linhagem, sem que haja um protocolo definido para o uso do PMA para a diferenciação de monócitos em macrófagos, o que aumenta o viés para análises dos resultados na literatura disponível. Biriken, Yazihan e Yilmaz (2018) demonstraram que o uso do PMA em doses acima de 32,42nM causa citotoxicidade em células THP-1. Em contrapartida, Pinto et al. (2020), demonstrou que monócitos diferenciados com baixas concentrações de PMA (8,1nM por 48 horas, seguido de 3 horas de descanso) apresentaram baixa expressão de proteínas associadas com o processo de fagocitose, como CD11b e CD14. Além disso, estudos mostram que o estímulo com PMA pode aumentar o nível de resposta inflamatória basal de linhagens monocíticas, resultando em uma resposta pró-inflamatória mais elevada a muitos estimulantes inflamatórios, como o lipopolissacarídeo ou infecções por patógenos (BIRIKEN; YAZIHAN; YILMAZ, 2018). Wong e Jacobs Jr (2011), conseguiram detectar altos níveis de liberação de IL-1 $\beta$  durante a infecção com H37Rv em células THP-1 diferenciadas com 100nM de PMA por 3 dias seguido de 1 dia de descanso após o estímulo. Em nosso estudo, observamos que o estímulo de células THP-1 com uma baixa concentração de PMA (8,1 e 16,21nM)

resultou em menor infectividade das cepas e baixa responsividade das células, o que foi potencializado quando aumentamos a concentração do PMA para 100nM.

Foi observado que os níveis de expressão de genes de inflamação e secreção de citocinas pró-inflamatórias aumentam quando células THP-1 são diferenciadas com alta concentração de PMA (162,1nM) em comparação com as células THP-1 diferenciadas usando baixa concentração (8,1nM) (PARK et al., 2007). O aumento da expressão de IL-1 $\beta$  após a diferenciação com PMA foi relatado anteriormente a nível de transcriptoma por Kohro et al. (2004). Para confirmar esses dados, realizamos a análise da expressão de IL-1 $\beta$  nas células THP-1 diferenciadas apenas com PMA, sem outro estímulo após a diferenciação, e também observamos aumento na expressão de IL-1 $\beta$  ao longo de 48h (dados não mostrados). Esses efeitos podem justificar a alta liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 que observamos em nossos controles não infectados logo nas primeiras horas de análise, e que diminuiu ao longo do tempo. Ainda que os controles não infectados do nosso estudo tenham sofrido uma forte ativação e estresse celular devido a dose elevada de PMA, as respostas de macrófagos infectados foram altas a ponto de observarmos diferenças estatísticas entre elas. Sendo assim, chegamos à conclusão de que o estímulo de células THP-1 com 100nM de PMA, seguido por dois dias de descanso, seria o mais adequado para o nosso modelo de estudo.

De acordo com os dados existentes até o momento, é possível afirmar que RDRio age de forma diferente de outras cepas de Mtb já conhecidas, devido a suas características patológicas. Entretanto, não há estudos demonstrando os efeitos moleculares e celulares causados pela sub-linhagem RDRio após a infecção, seja *in vivo* ou *in vitro*. Em nosso estudo, demonstramos que RDRio induz ao aumento da expressão dos genes relacionados ao inflamassoma NLRP3, AIM2 e IL-1 $\beta$ , e causa a morte de células THP-1 com 48h de infecção, associada a liberação de IL-1 $\beta$  por essas células. Nossos resultados estão de acordo com estudos semelhantes que já foram publicados. No trabalho de Mishra et al. (2010) a cepa H37Rv de Mtb foi capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 de forma dependente da liberação de ESAT-6 por meio do sistema de secreção ESX-1, e induziu a liberação de IL-1 $\beta$  por macrófagos THP-1 após 18h de infecção. Como o inflamassoma NLRP3 é uma importante via de ativação de IL-1 $\beta$ , nossos resultados sugerem que NLRP3 esteja envolvido com a resposta inflamatória durante a infecção por RDRio.

Em nosso modelo, tanto RDRio-Ant quanto RDRio-Rec induziram uma alta expressão do gene AIM2, em relação ao controle não infectado e a cepa H37Rv. O envolvimento do inflamassoma AIM2 na resposta imune durante a infecção pelo Mtb foi observado por Saiga et al. (2012), quando macrófagos AIM2<sup>-/-</sup> infectados com a cepa H37Rv apresentaram ativação

defeituosa de caspase-1 e comprometimento na secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (SAIGA et al., 2012). A infecção por micobactérias em camundongos AIM2<sup>-/-</sup> também induz respostas de IFN- $\gamma$  super-reativa, com conseqüente redução da resposta protetora, levando a cargas de infecção mais altas e patologia mais grave (YAN et al., 2018). Em nossos experimentos, a cepa H37Rv não induziu aumento na expressão do gene AIM2 ou na liberação de IL-1 $\beta$ . Essas diferenças podem ser justificadas por diferenças nos protocolos em relação ao tratamento das bactérias e do tipo de célula utilizada.

Apesar de não observamos aumento na expressão gênica de ASC nas células THP-1 estimuladas com LPS e ATP, não podemos afirmar que houve um mal funcionamento do primer, já que sinais de *priming* não parecem afetar os níveis de expressão de ASC (BAUERNFEIND et al., 2009). Além disso, apesar da proteína ASC, também conhecida como Pycard, estar presente em todos os inflamassomas (STUTZ et al., 2013), observamos uma regulação negativa e baixa expressão desse gene em nosso modelo estudo. Diversos estudos mostraram que o complexo Pycard, caspase-1 e NLRP3 é essencial para a maturação de IL-1 $\beta$  em macrófagos durante a resposta contra estímulos incluindo bactérias e fungos (ICHINOHE et al., 2009; MARIATHASAN et al., 2006; WILLINGHAM et al., 2007). Além de ser necessário para que haja piroptose e pironecrose (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2007; TING; WILLINGHAM; BERGSTRALH, 2008). Em 2010, McElvania Tekippe et al. demonstrou que camundongos Pycard<sup>-/-</sup> desenvolveram uma formação desorganizada de granulomas, com ausência de células dendríticas no pulmão, confirmando a hipótese de que Pycard afeta o agregado de células que formam adequadamente o granuloma. Sendo assim, a baixa expressão de ASC que observamos em células THP-1 infectadas com Mtb, pode estar associada com algum mecanismo de virulência dessas cepas, e escape do granuloma. Em outro trabalho, feito por Yan et al. em 2018, foi demonstrado que a expressão de ASC foi inversamente correlacionada com os níveis de IFN- $\beta$  em PBMCs de pacientes com tuberculose. Outros relatos apontam que os IFNs tipo 1 prejudicam a resposta Th1, inibindo as respostas antimicrobianas induzidas por IFN- $\gamma$  em macrófagos e monócitos durante a infecção por cepas virulentas de Mtb (MANCA et al., 2001; ORDWAY et al., 2007). Sendo assim, a diminuição da expressão de ASC que observamos pode colaborar com a alta produção de IFNs tipo 1 e menor eficiência da resposta Th1.

AIM2 e NLRP3 são importantes vias de ativação de IL-1 $\beta$ , IL-18 e morte celular por piroptose. Sendo assim, o aumento de expressão desses genes condiz com o aumento de morte celular e liberação de IL-1 $\beta$  observada em nosso modelo de estudo, o que pode representar uma inflamação exacerbada causada por RDRio. A IL-18, que faz parte da família IL-1, está

relacionada com a imunidade protetora contra vários patógenos intracelulares como *Leishmania*, *Toxoplasma* e *Salmonella* (NAKANISHI et al., 2001). Alguns estudos demonstraram que IL-18 desempenha papel importante na resposta protetora contra tuberculose. Nesse cenário, a ausência de IL-18 pode trazer impactos negativos, como diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$ , bem como de moléculas efetoras a jusante, como NOS-2, NO e IDO, tornando o ambiente de tecido menos favorável à ativação macrofágica clássica e mais propício desenvolver uma infecção descontrolada (SCHNEIDER et al., 2010).

Camundongos deficientes de IL-18 e/ou MyD88, sucumbiram rapidamente à infecção por micobactérias em contraste com camundongos WT, além de apresentarem diminuição da resposta Th1 (SCHNEIDER et al., 2010; TAKEDA et al., 1998). Em nosso estudo observamos uma baixa produção de IL-18 pelas células infectadas, o que pode contribuir para uma menor resposta Th1 e menor atividade antimicrobiana, induzida diferencialmente por cepas da sublinhagem RDRio.

Até o momento, os estudos que mostram a interação de cepas virulentas de micobactérias com o hospedeiro e a participação de inflamassomas durante a infecção são controversos. Muitos dados demonstram que o Mtb é capaz de ativar o inflamassoma, e ressaltam a importância da ativação de certas vias durante a infecção (MCELVANIA TEKIPPE et al., 2010; MISHRA et al., 2010a; SAIGA et al., 2012). Enquanto outros estudos demonstram o inverso, no qual NLRP3 é aparentemente dispensável para o controle da tuberculose pulmonar (DORHOI et al., 2012), ou que o Mtb é capaz de inibir a ativação de AIM2 (SHAH et al., 2013). A diferença observada entre esses resultados pode ser justificada pela variedade de linhagens de células e bactérias incluídas em cada estudo, MOI utilizado, tempo de infecção ou até mesmo nos efeitos que o PMA pode ter na expressão de alguns genes, considerando que não há um protocolo padrão para o uso de PMA para diferenciação celular de monócitos em macrófagos.

Diferentes cepas de Mtb podem ser amplamente diferenciadas em relação a sua virulência e apresentação da doença, que pode variar de assintomática a doença grave. Em parte, a variabilidade na manifestação da doença está relacionada com o tipo da cepa responsável pela infecção, além do fundo genético e ambiental do hospedeiro. Neste trabalho, observamos que RDRio-Rec apresentou maior taxa de infecção, maior indução de expressão do gene NLRP3 e liberação de IL-1 $\beta$  em relação a RDRio-Ant. Esses resultados apontam para uma possível diferença na imunogenicidade dessas cepas, já que as diferenças observadas na expressão desses genes não poderiam estar associadas com a quantidade de bactérias intracelulares, pois em alguns momentos, as duas cepas apresentaram quantidades semelhantes de bactérias intracelulares. Nossos resultados sugerem que possa ter havido mudanças na estrutura de cepas

com a deleção RDRio ao longo de 20 anos de circulação. Porém, seriam necessários estudos de caracterização genética, por técnicas moleculares, para se determinar as diferenças e origens filogenéticas de RDRio-Ant e RDRio-Rec.

O aumento que observamos na expressão de genes de inflamassoma, morte celular e liberação de IL-1 $\beta$  na infecção com cepas da sub-linhagem RDRio, sugerem que a ativação de inflamassomas e morte por piroptose esteja associada com a patologia causada por elas. Por ser uma morte inflamatória, a piroptose em excesso, pode induzir necrose tecidual por hiperativação inflamatória, com consequente formação de cavitações pulmonares. Nesse contexto, os eventos que observamos podem ter ligação com a alta formação de cavitação pulmonar observada no quadro clínico de pacientes. Entretanto, experimentos para análise da clivagem de proteínas associadas a morte por piroptose, como por exemplo, caspase-1 e gasdermina-D, seriam o ideal para confirmar essa hipótese.

Nesse contexto, sabemos que diferentes cepas de Mtb ativam diferencialmente os inflamassomas, porém, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a associação entre as cepas virulentas RDRio e a ativação de inflamassomas em macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1. Atualmente, as respostas imunológicas de pacientes com tuberculose são incompletamente caracterizadas e devem ser exploradas para permitir o estabelecimento de novas vacinas, diagnósticos e tratamentos. Sendo assim, entender melhor como os inflamassomas estão envolvidos nesses processos corrobora para o conhecimento da sua patogênese, bem como questionamentos sobre diferentes abordagens de terapias, como por exemplo, o bloqueio da ativação de inflamassomas para maior controle da inflamação local e de formação de granulomas. Tal como o estudo de Xie et al., (2021), sugeriu que regular a translocação de NF $\kappa$ B para o núcleo celular resulta na diminuição da transcrição de genes envolvidos na formação do complexo NLRP3 e consequentemente na liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 e morte celular de células da microglia infectadas com a cepa H37Ra de Mtb.

Nossos dados salientam a importância da realização de estudos que incluam cepas com relevância clínica para nosso país e de disseminação global, como é o caso da sub-linhagem RDRio, considerando que as respostas celulares induzidas por determinadas cepas podem ser diferentes. Além disso, cepas padrão de laboratório como a H37Rv não são a melhor opção para usar como modelo de comparação com cepas clínicas, devido a diminuição da sua virulência e patogenicidade e por isso não reproduzem a infecção como realmente ocorre no hospedeiro. Além disso, mostramos que cepas da mesma sub-linhagem induzem respostas diferentes dependendo do seu tempo de circulação. O monitoramento da evolução de um patógeno ao longo dos anos pode ser de grande importância para melhor compreensão sobre o seu

comportamento em termos de patogenicidade, favorecendo a elaboração de esforços futuros no combate à doença. No caso de RDRio, estudos nesse âmbito, colaboram para o desenvolvimento de estratégias de controle de saúde pública para TB em escala regional.

## **8. CONCLUSÕES**

Este é o primeiro estudo que aborda a interação da sub-linhagem de maior circulação no Brasil, com macrófagos humanos. Nossos resultados demonstram, que RDRio pode ter sofrido alterações que favoreceram a sua virulência nos tempos atuais. Concluimos que RDRio modula diferencialmente a expressão dos genes relacionados à ativação de inflamassoma, em células THP-1 infectadas, em relação a cepa padrão de laboratório H37Rv, com consequente morte celular e liberação de IL-1 $\beta$ . Esses mecanismos podem estar associados com a facilidade de RDRio de se disseminar e causar doença grave, o que foi potencializado ao longo de 20 anos de circulação.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, E. et al. Polymorphisms in CARD8 and NLRP3 are associated with extrapulmonary TB and poor clinical outcome in active TB in Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3126, dez. 2019.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Immunology cellular and molecular**. 8. ed. [s.l.] Elsevier, 2015.

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787–793, out. 1996.

BAI, X. et al. Caspase-3-independent apoptotic pathways contribute to interleukin-32 $\gamma$ -mediated control of Mycobacterium tuberculosis infection in THP-1 cells. **BMC Microbiology**, v. 15, 21 fev. 2015.

BARBOSA, C. DE B. et al. Tuberculosis caused by RDRio Mycobacterium tuberculosis is not associated with differential clinical features. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, n. 10, p. 1377–1382, out. 2012.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 183, n. 2, p. 787–791, 15 jul. 2009.

BAZAN, J. F.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A. A newly defined interleukin-1? **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 591, 15 fev. 1996.

BİRİKEN, D.; YAZIHAN, N.; YILMAZ, Ş. Değişik Konsantrasyonlarda ve Sürelerde Phorbol-12-Myristate-13-Acetate ile Uyarılan İnsan THP-1 Lösemi Hücrelerinin Sitokin ve Midkin Yanıtlarının Araştırılması. **MİKROBİYOLOJİ BÜLTENİ**, p. 9, [s.d.].

BRENNAN, M. J.; DELOGU, G. The PE multigene family: a ‘molecular mantra’ for mycobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 246–249, maio 2002.

BRIKEN, V.; AHLBRAND, S. E.; SHAH, S. Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, 9 out. 2013.

BROZ, P. et al. Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 288–291, out. 2012.

BROZ, P. Recognition of Intracellular Bacteria by Inflammasomes. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 22 mar. 2019.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407–420, jul. 2016.

BROZ, P.; MONACK, D. M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 8, p. 551–565, ago. 2013.



BRUDEY, K. et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 23, 6 mar. 2006.

CAMBIER, C. J.; FALKOW, S.; RAMAKRISHNAN, L. Host Evasion and Exploitation Schemes of Mycobacterium tuberculosis. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1497–1509, dez. 2014.

CANDIA, N. et al. First insight into Mycobacterium tuberculosis genetic diversity in Paraguay. **BMC microbiology**, v. 7, p. 75, 8 ago. 2007.

CARDOSO OELEMANN, M. et al. The Forest behind the Tree: Phylogenetic Exploration of a Dominant Mycobacterium tuberculosis Strain Lineage from a High Tuberculosis Burden Country. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e18256, 25 mar. 2011.

CHRISTGEN, S.; PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T.-D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. **Cell Research**, v. 30, n. 4, p. 315–327, abr. 2020.

CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 1, p. 257–270, 1 jan. 1995.

COLE, S. T. Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 10, p. 2919–2928, out. 2002.

CORBETT, E. L. et al. The Growing Burden of Tuberculosis: **Global Trends and Interactions With the HIV Epidemic**. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 9, p. 1009, 12 maio 2003.

CRAVEN, R. R. et al. Staphylococcus aureus  $\alpha$ -Hemolysin Activates the NLRP3-Inflammasome in Human and Mouse Monocytic Cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 14 out. 2009.

DALLA COSTA, E. R. et al. Mycobacterium tuberculosis of the RDRio Genotype Is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1071–1077, abr. 2013.

DAVID, S. et al. Implication of the RDRio Mycobacterium tuberculosis sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1362–1367, out. 2012.

DE ALMEIDA, I. N. et al. Frequency of the Mycobacterium tuberculosis RDRio genotype and its association with multidrug-resistant tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, 25 jun. 2019.

DE JONG, B. C. et al. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by M. tuberculosis lineage in The Gambia. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 7, p. 1037–1043, 1 out. 2008.

DICK, M. S. et al. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11929, 1 set. 2016.

DINARELLO, C. et al. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

DINARELLO, C. A. Biology of interleukin 1. **FASEB J**, p. 108–115, 1988.

DINARELLO, C. A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **BLOOD**, v. 87, n. 6, p. 2095–2147, 15 mar. 1996.

DING, J. et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 111–116, 7 jul. 2016.

DORHOI, A. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis: Immunity to infection. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 374–384, fev. 2012.

EVAVOLD, C. L. et al. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 35–44.e6, 16 2018.

FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, n. 1, p. 1–11, jan. 1999.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 9, p. 1590–1604, set. 2007.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity against *Francisella tularensis*. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 385–393, maio 2010.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1812–1825, nov. 2006.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 93–129, abr. 2001.

FLYNN, J. L.; ERNST, J. D. Immune responses in tuberculosis. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 4, p. 432–436, ago. 2000.

FREMOND, C. M. et al. IL-1 Receptor-Mediated Signal Is an Essential Component of MyD88-Dependent Innate Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1178–1189, 15 jul. 2007.

GAGNEUX, S. et al. Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2869–2873, 21 fev. 2006.

GIBSON, A. L. et al. Application of Sensitive and Specific Molecular Methods To Uncover Global Dissemination of the Major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotype Family. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1259–1267, abr. 2008.

**Global tuberculosis report 2020.** Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240013131>>. Acesso em: 10 abr. 2021.

GRACIE, J. A.; ROBERTSON, S. E.; MCINNES, I. B. Interleukin-18. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 213–224, fev. 2003.

GUERRA, J. et al. Active and latent tuberculosis among inmates in La Esperanza prison in Guaduas, Colombia. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, 25 jan. 2019.

GUINN, K. M. et al. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular microbiology**, v. 51, n. 2, p. 359–370, jan. 2004.

HE, Y. et al. Nek7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. **Nature**, v. 530, n. 7590, p. 354–357, 18 fev. 2016.

HEILIG, R. et al. The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 $\beta$  secretion in mice. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 4, p. 584–592, 2018.

HUBER, F. D. et al. Insights into the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* using spoligotyping and RDRio in a southeastern Brazilian prison unit. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 26, p. 194–202, ago. 2014.

ICHINOHE, T. et al. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 79–87, 19 jan. 2009.

IGNATOVA, A. et al. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. Pt 10, p. 1413–1418, out. 2006.

IRMLER, M. et al. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 5, p. 1917–1922, 1 maio 1995.

JONES, J. W. et al. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 21, p. 9771–9776, 25 maio 2010.

JORGENSEN, I. et al. IL-1 $\beta$ , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 12, p. 2761–2766, 2016a.

JORGENSEN, I. et al. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 10, p. 2113–2128, 19 set. 2016b.

JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunological reviews**, v. 265, n. 1, p. 130–142, maio 2015.

JUFFERMANS, N. P. et al. Interleukin-1 Signaling Is Essential for Host Defense during Murine Pulmonary Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 3, p. 902–908, set. 2000.

- JULIANA, C. et al. Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 43, p. 36617–36622, 19 out. 2012.
- KAWAKAMI, K. et al. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN-gamma production. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 159, n. 11, p. 5528–5534, 1 dez. 1997.
- KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117–121, nov. 2011.
- KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666–671, out. 2015.
- KEMPKER, R. R. et al. Additional Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates From Resected Cavities Among Patients With Multidrug-Resistant or Extensively Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 6, p. e51–e54, 15 mar. 2012.
- KLEINNIJENHUIS, J. et al. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 $\beta$  production by *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 7, p. 1914–1922, 2009.
- KOHNO, K. et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 4, p. 1541–1550, 1997.
- KOHRO, T. et al. A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-myristate 13-acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-derived Macrophage. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 11, n. 2, p. 88–97, 2004.
- KRISHNAN, N. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Lineage Influences Innate Immune Response and Virulence and Is Associated with Distinct Cell Envelope Lipid Profiles. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 8 set. 2011.
- KUSNER, D. J.; BARTON, J. A. ATP Stimulates Human Macrophages to Kill Intracellular Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Via Calcium-Dependent Phagosome-Lysosome Fusion. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3308–3315, 15 set. 2001.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 397–411, jun. 2013.
- LAZZARINI, L. C. O. et al. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 3891–3902, 1 dez. 2007.
- LAZZARINI, L. C. O. et al. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* Infection Is Associated with a Higher Frequency of Cavitory Pulmonary Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2175–2183, 1 jul. 2008.
- LISTON, A.; MASTERS, S. L. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 3, p. 208–214, mar. 2017.

- LIU, C.-W. et al. The association of inflammasome and TLR2 gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis in the Han Taiwanese population. **Scientific Reports**, v. 10, 23 jun. 2020.
- LIU, X. et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 153–158, jul. 2016.
- LÓPEZ, B. et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 133, n. 1, p. 30–37, jul. 2003.
- MANCA, C. et al. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\alpha/\beta$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5752–5757, 8 maio 2001.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228–232, 9 mar. 2006.
- MARTINON, F.; BURNS, K. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, v. 10, p. 417–426, 2002.
- MASTER, S. S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Prevents Inflammasome Activation. **Cell host & microbe**, v. 3, n. 4, p. 224–232, 17 abr. 2008.
- MASUMOTO, J. et al. ASC, a Novel 22-kDa Protein, Aggregates during Apoptosis of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 33835–33838, nov. 1999.
- MAYER-BARBER, K. D. et al. Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 $\beta$  Production Is Critical for Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3326–3330, 1 abr. 2010.
- MCDONOUGH, K. A.; KRESS, Y.; BLOOM, B. R. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2763–2773, jul. 1993.
- MCELVANIA TEKIPPE, E. et al. Granuloma Formation and Host Defense in Chronic *Mycobacterium tuberculosis* Infection Requires PYCARD/ASC but Not NLRP3 or Caspase-1. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12320, 20 ago. 2010.
- MISHRA, B. B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome: Inflammasome activation during *M. tuberculosis* infection. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046–1063, ago. 2010a.
- MISHRA, B. B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome: Inflammasome activation during *M. tuberculosis* infection. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046–1063, ago. 2010b.

- MIZUTANI, H. et al. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 821–825, 1 out. 1991.
- MIZUTANI, H.; BLACK, R.; KUPPER, T. S. Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 3, p. 1066–1071, mar. 1991.
- MOKROUSOV, I. et al. Stranger in a strange land: Ibero-American strain of *Mycobacterium tuberculosis* in Tibet, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 26, p. 323–326, ago. 2014.
- MONTERO, M. T. et al. Geranylgeraniol Regulates Negatively Caspase-1 Autoprocessing: Implication in the Th1 Response against *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 8, p. 4936–4944, 15 out. 2004.
- MORAES, E. B. et al. Tuberculosis associated factors caused by *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio genotype. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 182–187, mar. 2017.
- MUÑOZ-PLANILLO, R. et al. K<sup>+</sup> efflux is the Common Trigger of NLRP3 inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142–1153, 27 jun. 2013.
- MURAKAMI, P. S. et al. DETECTION OF RD<sup>RIO</sup> STRAIN OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN TAPIRS ( *TAPIRUS TERRESTRIS* ) FROM A ZOO IN BRAZIL. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 4, p. 872–875, 14 dez. 2012.
- NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 Regulates Both Th1 and Th2 Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 423–474, abr. 2001.
- NETEA, M. G. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Induces Interleukin-32 Production through a Caspase-1/IL-18/Interferon- $\gamma$ -Dependent Mechanism. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, ago. 2006.
- NEWTON, S. M. et al. A deletion defining a common Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* associates with immune subversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15594–15598, 17 out. 2006.
- NOVIKOV, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Triggers Host Type I IFN Signaling To Regulate IL-1 $\beta$  Production in Human Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2540–2547, 1 set. 2011.
- OKAMURA, H. et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. **Nature**, v. 378, n. 6552, p. 88–91, 2 nov. 1995.
- ORDWAY, D. et al. The Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* Strain HN878 Induces a Potent TH1 Response followed by Rapid Down-Regulation. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 522–531, 1 jul. 2007.

ORME, I. M.; COOPER, A. M. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. **Immunology Today**, v. 20, n. 7, p. 307–312, jul. 1999.

O'TOOLE, R. F.; GAUTAM, S. S. Limitations of the Mycobacterium tuberculosis reference genome H37Rv in the detection of virulence-related loci. **Genomics**, v. 109, n. 5–6, p. 471–474, out. 2017.

PALITTAPONGARNPIM, P. et al. Evidence for Host-Bacterial Co-evolution via Genome Sequence Analysis of 480 Thai Mycobacterium tuberculosis Lineage 1 Isolates. **Scientific Reports**, v. 8, 2 ago. 2018.

PARK, E. K. et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 45–50, 1 jan. 2007.

PERDIGÃO, J. et al. Using genomics to understand the origin and dispersion of multidrug and extensively drug resistant tuberculosis in Portugal. **Scientific Reports**, v. 10, 13 fev. 2020.

PINTO, S. M. et al. Dose-dependent phorbol 12-myristate-13-acetate-mediated monocyte-to-macrophage differentiation induces unique proteomic signatures in THP-1 cells. **bioRxiv**, p. 2020.02.27.968016, 28 fev. 2020.

PUREN, A. J. et al. Interleukin-18 (IFN $\gamma$ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 $\beta$  via TNF $\alpha$  production from non-CD14 $^{+}$  human blood mononuclear cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 3, p. 711–721, 1 fev. 1998.

PY, B. F. et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. **Molecular Cell**, v. 49, n. 2, p. 331–338, jan. 2013.

RATHINAM, V. A. K. et al. The AIM2 inflammasome is essential for host-defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 395–402, maio 2010.

RATHINAM, V. A. K. et al. TRIF Licenses Caspase-11-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation by Gram-Negative Bacteria. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 606–619, 3 ago. 2012.

REED, M. B. et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. **Nature**, v. 431, n. 7004, p. 84–87, 2 set. 2004.

RENGARAJAN, J. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv2224c modulates innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 1, p. 264–269, 8 jan. 2008.

ROCHA, A. et al. Genotyping did not evidence any contribution of Mycobacterium bovis to human tuberculosis in Brazil. 2011.

ROHDE, K. et al. Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome. **Immunological Reviews**, v. 219, n. 1, p. 37–54, out. 2007.

RÜHL, S.; BROZ, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K $^{+}$  efflux. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 10, p. 2927–2936, 2015.

SADEK, M. I. et al. Chemokines Induced by Infection of Mononuclear Phagocytes with Mycobacteria and Present in Lung Alveoli during Active Pulmonary Tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 19, n. 3, p. 513–521, set. 1998.

SAIGA, H. et al. Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. **International Immunology**, v. 24, n. 10, p. 637–644, 1 out. 2012.

SALIE, M. et al. Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 34, p. 221–229, 1 ago. 2015.

SAUER, J.-D. et al. Listeria monocytogenes that lyse in the macrophage cytosol trigger AIM2-mediated pyroptosis. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 5, p. 412–419, 20 maio 2010.

SAUNDERS, B. M.; COOPER, A. M. Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 334–341, ago. 2000.

SCHETT, G.; DAYER, J.-M.; MANGER, B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 14–24, jan. 2016.

SCHNEIDER, B. E. et al. A role for IL-18 in protective immunity against Mycobacterium tuberculosis. **European journal of immunology**, v. 40, n. 2, p. 396–405, fev. 2010.

SCHURZ, H. et al. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139711, 2 out. 2015.

SEGOVIA-JUAREZ, J. L.; GANGULI, S.; KIRSCHNER, D. Identifying control mechanisms of granuloma formation during M. tuberculosis infection using an agent-based model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 231, n. 3, p. 357–376, dez. 2004a.

SEGOVIA-JUAREZ, J. L.; GANGULI, S.; KIRSCHNER, D. Identifying control mechanisms of granuloma formation during M. tuberculosis infection using an agent-based model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 231, n. 3, p. 357–376, dez. 2004b.

SES et al. (EDS.). **CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO: TUBERCULOSE NO ESTADO RJ**, 11 out. 2020.

SHAH, S. et al. Cutting Edge: *Mycobacterium tuberculosis* but Not Nonvirulent Mycobacteria Inhibits IFN- $\beta$  and AIM2 Inflammasome-Dependent IL-1 $\beta$  Production via Its ESX-1 Secretion System. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 7, p. 3514–3518, 1 out. 2013.

SHEMYAKIN, I. G. et al. Characterization of drug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis derived from Russian inmates. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 10, p. 1194–1203, out. 2004.

SHI, H. et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. **Nature immunology**, v. 17, n. 3, p. 250–258, mar. 2016.



SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660–665, out. 2015.

SKIBA, Y. et al. Mycobacterium tuberculosis RD-Rio Strain in Kazakhstan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 604–606, mar. 2019.

SOARES, R. O. et al. Mycobacterium tuberculosis belonging to family LAM and sublineage RDRio: common strains in Southern Brazil for over 10 years. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1251–1255, 10 mar. 2014.

SONG, N. et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. **Molecular Cell**, v. 68, n. 1, p. 185–197.e6, out. 2017.

STAMM, C. E.; COLLINS, A. C.; SHILOH, M. U. Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, p. 204–219, mar. 2015.

STUCKI, D. et al. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. **Nature Genetics**, v. 48, n. 12, p. 1535–1543, dez. 2016.

STUTZ, A. et al. ASC Speck Formation as a Readout for Inflammasome Activation. In: DE NARDO, C. M.; LATZ, E. (Eds.). **The Inflammasome**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 1040p. 91–101.

STUTZ, A. et al. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 6, p. 1725–1736, 5 jun. 2017.

SU, W.-L. et al. Association of Reduced Tumor Necrosis Factor Alpha, Gamma Interferon, and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) but Increased IL-10 Expression with Improved Chest Radiography in Patients with Pulmonary Tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 17, n. 2, p. 223–231, fev. 2010.

SUGAWARA, I. et al. Role of Interleukin-18 (IL-18) in Mycobacterial Infection in IL-18-Gene-Disrupted Mice. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2585–2589, maio 1999.

TAKEDA, K. et al. Defective NK Cell Activity and Th1 Response in IL-18-Deficient Mice. **Immunity**, v. 8, n. 3, p. 383–390, mar. 1998.

TING, J. P.-Y. et al. The NLR gene family: An official nomenclature. **Immunity**, v. 28, n. 3, p. 285–287, mar. 2008.

TING, J. P.-Y.; WILLINGHAM, S. B.; BERGSTRALH, D. T. NLRs at the intersection of cell death and immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 5, p. 372–379, maio 2008.

TSUTSUI, H. et al. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. **Immunological Reviews**, v. 174, n. 1, p. 192–209, abr. 2000.

TUFARIELLO, J. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 9, p. 578–590, set. 2003.

URBANOWSKI, M. E. et al. Cavitory tuberculosis: the gateway of disease transmission. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. e117–e128, 2004.

VALONE, S. E. et al. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and mycobacterial antigens. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 12, p. 3313–3315, 1988.

VAN DER WEL, N. et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1287–1298, jun. 2007.

VINHAS, S. A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* DNA fingerprint clusters and its relationship with RDRio genotype in Brazil. **Tuberculosis**, v. 93, n. 2, p. 207–212, mar. 2013.

VON GROLL, A. et al. Fitness study of the RD<sup>Rio</sup> lineage and Latin American–Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 119–127, fev. 2010.

VON MOLTKE, J. et al. Recognition of Bacteria by Inflammasomes. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 73–106, 2013.

WARREN, S. E. et al. Cutting Edge: Cytosolic Bacterial DNA Activates the Inflammasome via Aim2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 2, p. 818–821, 15 jul. 2010.

WEISENBERG, S. A. et al. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 664–670, jun. 2012.

WELIN, A. et al. Human Macrophages Infected with a High Burden of ESAT-6-Expressing *M. tuberculosis* Undergo Caspase-1- and Cathepsin B-Independent Necrosis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 26 maio 2011.

WELIN, A.; LERM, M. Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 92, n. 2, p. 113–120, mar. 2012.

WILLINGHAM, S. B. et al. Microbial Pathogen-Induced Necrotic Cell Death Mediated by the Inflammasome Components CIAS1/Cryopyrin/NLRP3 and ASC. **Cell host & microbe**, v. 2, n. 3, p. 147–159, 13 set. 2007.

WONG, K.-W.; JACOBS JR, W. R. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*: NLRP3 mediates *M. tuberculosis*-promoted necrosis. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 1371–1384, set. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2019**. S.l.: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019.

WU, J.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; ALNEMRI, E. S. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 Inflammasomes in Caspase-1 Activation by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 5, p. 693–702, set. 2010.

XIE, Z. et al. By Regulating the NLRP3 Inflammasome Can Reduce the Release of Inflammatory Factors in the Co-Culture Model of Tuberculosis H37Ra Strain and Rat

Microglia. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 637769, 13 abr. 2021.

YAN, S. et al. Deficiency of the AIM2–ASC Signal Uncovers the STING-Driven Overreactive Response of Type I IFN and Reciprocal Depression of Protective IFN- $\gamma$  Immunity in Mycobacterial Infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 200, n. 3, p. 1016–1026, 1 fev. 2018.

YU WANG et al. **Polymorphisms in Toll-Like Receptor 10 and Tuberculosis Susceptibility: Evidence from Three Independent Series**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5829065/>>. Acesso em: 22 set. 2020.