

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



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

Julia Perlingeiro Curvêllo Lopes

Estudo da ativação de Autofagia em macrófagos humanos infectados por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes no Brasil: evolução e influência de 20 anos de circulação na virulência da cepa RD^{Rio}

Rio de Janeiro

2021

JULIA PERLINGEIRO CURVÊLLO LOPES

Estudo da ativação de Autofagia em macrófagos humanos infectados por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes no Brasil: evolução e influência de 20 anos de circulação na virulência da cepa RD^{Rio}

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

JULIA PERLINGEIRO CURVÊLLO LOPES

Estudo da ativação de Autofagia em macrófagos humanos infectados por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes no Brasil: evolução e influência de 20 anos de circulação na virulência da cepa RD^{Rio}

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, _____

Orientadores:

Dra. Valeria Cavalcanti Rolla

Dr. Eric Henrique Roma de Lima

Dedico esta conquista à minha avó Thereza, que não mediu esforços para eu chegar até aqui. Seu amor e orgulho que tinha pela neta iluminam meus passos.

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À meus pais Cristina e João Luiz e irmãos Ana Clara e João Gabriel, que sempre me apoiaram e me dedicaram amor e cuidado. Vocês se dedicaram para que eu pudesse realizar além do sonho. Obrigada por fazerem questão de demonstrar seu orgulho por mim, isso me deu forças.

À minha avó Thereza, que não pode ver em vida essa conquista, mas que sinto me guiando e vibrando ao meu lado todos os dias. Obrigada por ter cuidado da nossa família e me ensinado sobre fé, dedicação e amor. Sua história segue viva em mim.

Ao meu marido Felipe, sempre tão cuidadoso e dedicado, agradeço pelas palavras de incentivo, pelo colo quando duvidei de mim mesma e me ajudar a enxergar e trilhar o meu caminho. Com você dividindo os problemas e multiplicando as alegrias, a vida é mais leve. Obrigada por me mostrar que posso sonhar e conquistar.

Agradeço a benção e felicidade de ter meus filhos de quatro patas Pagode, Pipoca e Pérola, que acalmam e alegam meus dias com seu amor e estripulias.

Ao “Time TB”, Andreia, Gabrielle e Yasmim, agradeço a amizade, a cumplicidade e união. Os dias mais tortuosos foram mais leves com o apoio de vocês. Sentirei saudade de tê-las em meu dia-a-dia.

À amiga Gabrielle Galdino, agradeço por me ajudar a levantar quando eu caí. Obrigada pelo seu jeito sempre doce, solícito e engraçado que me tirou gargalhadas mesmo quando não estava em um bom dia. Nosso encontro realmente foi de almas irmãs. Sou grata por todo seu esforço, ajuda e companheirismo ao longo de todos os experimentos e por nunca nos ter deixado na mão nos momentos mais difíceis.

À companheira de mestrado e amiga Yasmim Sampaio, agrção por ter dividido as dores e delícias desta caminhada, por ter me incentivado e auxiliado em tantos experimentos e análises.

Obrigada por todos os momentos de desabafo e apoio que me mostraram que eu não estava sozinha.

À Andreia Lamoglia, que me adotou como aluna e dedicou seu tempo e carinho a me ajudar, direcionar e acalmar quando preciso foi. Eu sempre soube que, com você, estaria amparada.

A minha orientadora Valeria Cavalcanti Rolla, agradeço por sempre estar disponível ao que me fosse necessário e por tornar os momentos tensos de apresentações mais leves com seu jeito espontâneo.

Ao meu co-orientador Eric Roma, agradeço pelos ensinamentos e por acreditar que eu seria capaz de realizar o projeto. Com você, amadureci e me tornei uma profissional mais dedicada e independente.

Ao Rubem Barreto, agradeço pelo aceite de ser meu revisor e acompanhar todo o desenvolvimento do trabalho, contribuindo para melhorias de minha dissertação.

À Glória Bonecini, agradeço por ter me recebido de braços e porta abertos em seu laboratório, por todo o cuidado comigo e com todos os no LAB-IMUNO e sua dedicação para uma ciência melhor no Brasil.

À Ana Teresa Fernandes, agradeço por todos os conselhos, pelo cuidado e carinho que sempre teve comigo. Obrigada por toda ajuda com o andamento da dissertação e por tornar os dias de trabalho mais divertidos com seu jeito extrovertido.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, agradeço por terem cedido as amostras da cepa RD^{Rio}.

Ao Otacilio todos os integrantes da plataforma de qPCR do HPP/Fiocuz, agradeço por terem nos ajudado a otimizar os dias de experimento de qPCR quando nosso aparelho quebrou.

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.

RESUMO

A tuberculose (TB), classificada como a principal doença infecciosa causadora de mortes no mundo, com 10 milhões de novos casos por ano, o que a configura como um grave problema de Saúde Pública global. Apesar de ser uma única espécie, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) pode ser dividido em diferentes linhagens e até sub-linhagens, que podem influenciar nos diversos espectros da doença. No Brasil, a cepa RD^{Rio}, pertencente à linhagem latino-americana e mediterrânea (LAM), é a de maior prevalência e está relacionada ao desenvolvimento de uma doença grave caracterizada por cavitações pulmonares e alta carga bacilar no escarro, que favorece sua disseminação. Além disso, RD^{Rio} está associada à resistência a antibióticos, e apesar da gravidade da doença causada por esta cepa, não há estudos demonstrando como ocorre a interação da RD^{Rio} com as células do sistema imune. A autofagia é um processo fisiológico de reciclagem de componentes intracelulares, intimamente ligado à resposta imune, e possui grande importância na eliminação de agentes patogênicos intracelulares como Mtb. O presente estudo avaliou a modulação de autofagia induzida pela infecção com a sub-linhagem RD^{Rio} em macrófagos humanos. Paralelamente, isolados de RD^{Rio} recentes (399-RD^{Rio}) foram comparados à cepa isolada em 1997 (R-RD^{Rio}) para observar se houve algum tipo de alteração genética na cepa durante esses 20 anos de circulação, que possa influenciar na modulação da resposta imune da célula infectada. Para tanto, macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 foram infectados com cepas RD^{Rio} e H37Rv durante 6, 24 e 48 horas e, após cada tempo, a carga bacilar e a expressão de genes autofágicos foram avaliados. Observamos que o isolado clínico 399-RD^{Rio} apresentou maior capacidade de infecção em relação à cepa H37Rv ($p < 0.01$). Entretanto, R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} promoveram uma maior expressão do gene LC3 em relação aos macrófagos não infectados em 48h ($p < 0.0001$ e $p < 0.001$), além de R-RD^{Rio} também ter promovido uma maior expressão do gene LC3 em relação à cepa H37Rv em 48h ($p < 0.05$) e uma maior expressão do gene ATG3 em relação aos macrófagos não infectados em 48h ($p < 0.05$). Ademais, ambos os isolados clínicos mostraram capacidade de diminuir a expressão de ATG5 após 6h ($p < 0.05$), porém, R-RD^{Rio} reverte para um aumento de expressão em 24h ($p < 0.01$). Concluímos que os isolados clínicos de RD^{Rio} ativam o processo de autofagia semelhantemente.

Descritores: *Mycobacterium tuberculosis*, RD^{Rio}, THP-1, autofagia.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), classified as the main infectious disease causing death in the world, is a serious global public health problem, causing 10 million new cases per year. Despite being a single species, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) can be divided into different strains and even sub-strains, which can influence the different spectra of the disease. In Brazil, the RD^{Rio} strain, belonging to the Latin American and Mediterranean strain (LAM), is the most prevalent and is related to the development of a spectrum of severe disease with records of cavitations due to the high bacillary load in the sputum, which favors the spread of mycobacteria. Studies show that RD^{Rio} is associated with antibiotic resistance, and despite the seriousness of the disease caused by this strain, there are no studies showing how RD^{Rio} interacts with immune system cells. Autophagy is a physiological process of recycling intracellular components, closely linked to the immune response, and has great importance in the elimination of intracellular pathogens such as Mtb. The present study evaluated the modulation of autophagy induced by infection with the RD^{Rio} sublineage in human macrophages. In parallel, recent RD^{Rio} isolates (399-RD^{Rio}) were compared to the strain isolated in 1997 (R-RD^{Rio}) to see if there was any type of genetic alteration in the strain during these 20 years of circulation, which could influence the modulation of the immune response of infected cell. Therefore, human macrophages derived from the THP-1 lineage were infected with RD^{Rio} and H37Rv strains for 6, 24 and 48 hours and, after each time, the bacillary load and the expression of autophagic genes were evaluated. We observed that the clinical isolate 399-RDRio had a greater capacity for infection compared to the H37Rv strain ($p < 0.01$). However, R-RD^{Rio} and 399-RD^{Rio} promoted a higher expression of the LC3 gene in relation to uninfected macrophages in 48h ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$), in addition to R-RD^{Rio} having also promoted a higher expression of the LC3 gene in relation to strain H37Rv in 48h ($p < 0.05$) and a higher expression of the ATG3 gene compared to uninfected macrophages in 48h ($p < 0.05$). Furthermore, both clinical isolates showed the ability to decrease ATG5 expression after 6h ($p < 0.05$), however, R-RD^{Rio} reverts to an increase in expression within 24h ($p < 0.01$). We conclude that clinical isolates of RD^{Rio} activate the autophagy process similarly.

Keywords: Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*. RD^{Rio}. THP-1. Autophagy

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Principais causas de morte em todo o mundo em 2016 e a relação estimada em número de mortes em todo o mundo por HIV/AIDS e tuberculose em 2019	19
Figura 2- Coeficiente de incidência de tuberculose/100 mil habitantes.....	20
Figura 3- Taxa de incidência por municípios de residência prioritários de tuberculose, no Estado do Rio de Janeiro, 2019	21
Figura 4- Definição e frequência global das sub-linhagens da linhagem 4.....	22
Figura 5- Distribuição global das sublinhagens da Linhagem 4/LAM	23
Figura 6- Proporções da sublinhagem LAM específicas de cada país	24
Figura 7- Mapa mundial mostrando números absolutos (diâmetro) e percentuais (cor) da família LAM dentro de cada país	25
Figura 8- A arquitetura das cavitações pulmonares causadas por TB.....	25
Figura 9- Diagrama mostrando os genes deletados ou alterados na derivação do LSP de RD ^{Rio}	26
Figura 10- Modelo aceito para formação de cavitações pulmonares por Mtb	28
Figura 11- Representação da parede celular da micobactéria	30
Figura 12- Células envolvidas na resposta imune inata humana à tuberculose ao longo da via aérea.....	31
Figura 13- Ciclo de vida e progressão de Mtb	33
Figura 14- Formação e estrutura de autofagossomos	35
Figura 15- Tipos de autofagia em células de mamíferos.....	36
Figura 16- Visão geral da macroautofagia	37
Figura 17- Regulação da via autofágica	39
Figura 18- O mecanismo central da autofagia e o processo de degradação e reciclagem das vesículas autofagossomas após a fusão com um lisossomo	40
Figura 19: Eliminação de Mtb por autofagia	43
Figura 20: Resposta cruzada entre autofagia e inflamação	44
Figura 21- qPCR dos genes LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.	58
Figura 22- CFU extracelular e intracelular.	60
Figura 23- qPCR dos genes autofágicos LC3 e mTOR.	61
Figura 24- qPCR dos genes autofágicos LC3 e mTOR.	62
Figura 25- qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5 e RAB7.	64
Figura 26- CFU extracelular e intracelular.	66
Figura 27- qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.	67
Figura 28- CFU extracelular e intracelular.	69
Figura 29- qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.	70
Figura 30: CFU extracelular e intracelular.	72
Figura 31: qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	Proteína cinase B
AMC	Autofagia mediada por chaperonas
AMP	5' adenosina monofosfato
AMPK	Cinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASL	Líquido de superfície das vias respiratórias
ATG	Genes relacionados à autofagia
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo de Calmette-Guérin
BECN1	Beclina-1
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidade formadora de colônia
CLR	Receptores de lectina do tipo C
CO ₂	Dióxido de carbono
Deis	Deleção do gene <i>eis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUSP16	Proteína fosfatase 16 de especificidade dupla
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
Eis	Gene de sobrevivência intracelular de Mtb
ESAT-6	Alvo antigênico de secreção inicial de 6 kDa
ESX-1	Sistema de secreção do tipo VII ESAT-6
FIP200	Proteína de interação com ULK
HBSS solution	Solução salina balanceada de Hank, do inglês Hank's balanced salt solution
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ	Interferon <i>gama</i>
IFN-I	Interferon do tipo I
IL	Interleucinas
IL-1 β	Interleucina 1 <i>beta</i>
JNK	Cinase c-jun NH2-terminal
kDa	Quilodáton
LAM	Latino-americano e Mediterrânea
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1
LAP	Fagocitose associada a LC3, do inglês “LC3-associated phagocytosis”
LC3	Proteína de cadeia leve 3
M2	Macrófagos antiinflamatórios
MAP1LC3	Microtubule associated protein 1 light chain 3 gamma
MDR	Multirresistente à medicamentos
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MOI	Razão da infecção, do inglês “multiplicity of infection”
mRNA	RNA mensageiro
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	Complexo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mTOR	Proteína mecanística alvo da rapamicina
NOD2	Domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo 2
NOS2	Óxido nítrico sintase 2
OADC	Albumina Dextrose Catalase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3K	fosfatidilinositol-4,5 bifosfato-3 cinase
PI3P	fosfatidilinositol-3-fosfato

PMA	Phorbol 12-miristato 13-acetato
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PtdIns3K	Fosfatidilinositol 3-cinase classe III
PtdIns3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
qPCR	PCR em tempo real
RABs	Família de pequenas GTPases Ras-like
RAPTOR	Proteína regulatória associada à mTOR
RICTOR	Proteína insensível a rapamicina ligada a mTOR, do inglês “Rapamycinin sensitive companion of mammalian target of rapamycin”
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Intermediários reativos de nitrogênio
ROI	Intermediários reativos de oxigênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês “Reactive Oxygen Species”
RPMI	meio do Instituto Memorial Roswell Park, do inglês “Roswell Park Memorial Institute medium”
RPL37A	Gene que codifica a proteína ribossomal L37a 60S em humanos
SARS-CoV2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STING	do inglês “Stimulator of interferon genes”
SQSTM1/p62	Gene que codifica a proteína Sequestossomo-1 em humanos. Também conhecida como proteína de ligação à ubiquitina p62
TB	Tuberculose
THP-1	Linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TRIS	Tampão para sistemas biológicos. Abreviação de tris(hidroximetil)aminometano
UF	Unidade Federativa
ULK-1	Cinase Unc-símile, do inglês “Unc-like kinase”

VPS34	Proteína de endereçamento vacuolar, “Vacuolar protein sorting” 34
XDR	Extensivamente resistente à medicamentos

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 História da tuberculose	18
1.2 A doença tuberculose e o agente <i>Mtb</i>	18
1.3 Cepa RD ^{Rio} de <i>Mtb</i>	22
1.3.1 Cavitação pulmonar	28
1.4 A infecção por <i>Mtb</i> e o sistema imune	29
1.5 Autofagia	34
1.5.1 Características gerais	34
1.5.2 Mecanismo de execução da Autofagia	36
1.6 Autofagia e infecção por <i>Mtb</i>	41
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVO GERAL	45
3.1 Objetivos Específicos	46
4 METODOLOGIA	46
4.1 Desenho experimental	46
5 MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS	47
5.1 Cultura de Cepas de <i>Mtb</i>	47
5.2 Cultivo de células da Linhagem THP-1 e Diferenciação em Macrófagos	47
5.3 Padronização da ativação de Autofagia em células THP-1	48
5.4 Experimentos de Infecção com isolados clínicos	48
5.5 Extração de DNA e RNA	49
5.6 Extração de Proteínas	49
5.7 Avaliação da ativação de Autofagia	50
5.7.1 qPCR.....	50

5.8 Análise estatística	50
6 RESULTADOS	50
6.1 Padronização dos experimentos.....	50
6.1.1 Análise da Indução de Autofagia em células THP-1	51
6.1.2 Análise da Ativação de Autofagia em células THP-1 pelos isolados clínicos	59
6.2 Análise da carga bacilar e capacidade de indução de autofagia em macrófagos THP- 1	70
6.2.1 Quantificação da carga bacteriana por CFU	71
6.2.2 Expressão de genes de autofagia em células THP-1 infectadas com Mtb.....	72
7 DISCUSSÃO	73
8 CONCLUSÃO	78
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 História da tuberculose

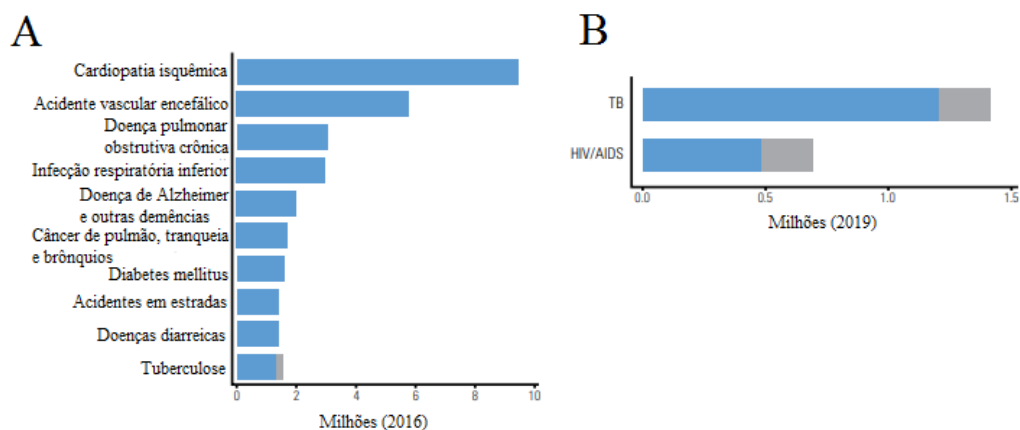
O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é caracterizado por 99,9% de similaridade genética, mas diferem em seus tropismos por hospedeiros e patogenicidade. Em um dado momento, aproximadamente 15.000-20.000 anos atrás, em decorrência da especiação, sugere-se que surgiu o ancestral comum de *Mycobacterium tuberculosis* (KAPUR; WHITTAM; MUSSER, 1994).

Com o passar dos anos, Mtb foi cada vez mais associado às populações humanas, difundidas sob condições sociais, ambientais e sanitárias problemáticas, gerando um reservatório de pessoas infectadas. A doença permaneceu uma incógnita até 24 de março de 1882, quando Robert Koch anunciou ser capaz de identificar, isolar e cultivar o bacilo responsável para reproduzir a doença em laboratório, permitindo que nas décadas seguintes, drogas e vacina anti-tuberculosas pudessem ser desenvolvidas. Apesar disto, a tuberculose segue como um problema de saúde pública global (KAPUR; WHITTAM; MUSSER, 1994).

1.2 A doença tuberculose e o agente *Mtb*

A tuberculose é uma doença grave ocasionada pela infecção por *Mtb*. A doença é classificada como uma das dez principais causas de morte no mundo e lidera o ranking entre as doenças infecciosas causada por um único agente infeccioso (“Global tuberculosis report”, 2020). Tal classificação se sobrepõem ao ranqueamento de HIV/AIDS como causadora de mortes no mundo. Apesar disto, o número de casos e morte aumenta quando levado em consideração a co-infecção por HIV (MÉNDEZ-SAMPERIO, 2017) (Figura 1).

Figura 1- Principais causas de morte em todo o mundo em 2016 e a relação estimada em número de mortes em todo o mundo por HIV/AIDS e tuberculose em 2019



Nota: No painel A, o ano em questão é o último ano para o qual estimativas para todas as causas estão atualmente disponíveis. Mortes por HIV/AIDS e tuberculose são oficialmente classificadas como mortes causada por HIV/AIDS na Classificação Internacional de Doenças. Mortes por HIV/AIDS e tuberculose são mostradas em cinza.

No painel B, as últimas estimativas do número de mortes para HIV/AIDS em 2019 foram publicados pelo UNAIDS. Para TB, as estimativas para 2019 são as publicadas no relatório Global tuberculosis report 2020. As mortes por TB entre pessoas HIV-positivas são oficialmente classificadas como mortes causadas pelo HIV/AIDS na Classificação Internacional de Doenças.

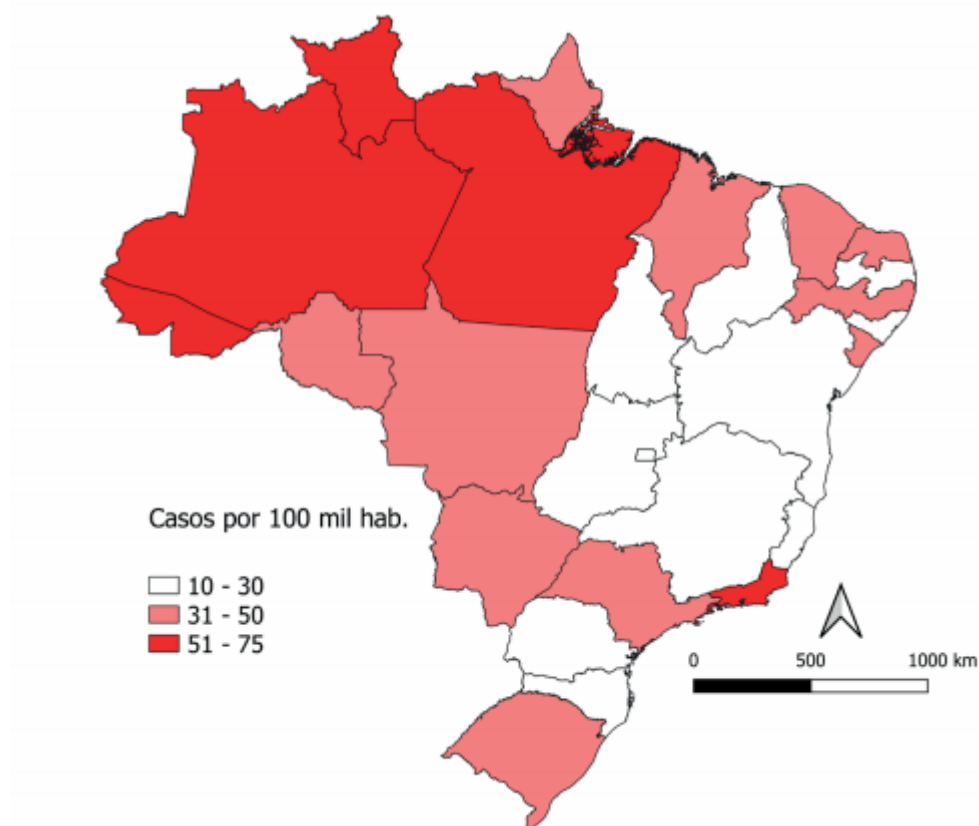
Fonte: Adaptado de Global tuberculosis report 2020

Estudos epidemiológicos revelam que, aproximadamente um quarto da população mundial está infectada com Mtb e, portanto, em risco de desenvolver a doença (“Global tuberculosis report”, 2020). Estima-se que, a cada ano, 10 milhões de novos casos da doença surjam. No ano de 2019, segundo dados do Global tuberculosis report 2020, cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,2 milhão morreram devido à doença no mundo. Quanto ao Brasil, em 2019, 96 mil casos da doença ocorreram e foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos. Já em 2020, o Brasil registrou 66.819 casos novos (“Global tuberculosis report”, 2020; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2017; ROMAGNOLI et al., 2018a).

No Brasil, a incidência de casos da doença é evidentemente heterogênea quando o mesmo é estratificado em UF (Figura 2), porém, dois estados se destacam pela taxa de incidência de TB: Amazonas e Rio de Janeiro. Em 2019, Amazonas apresentou um aumento de 68,3% para 72,4% em número de casos notificados e uma queda na incidência de 74,1 para 72,9. Já no Rio de

Janeiro, no mesmo ano, o percentual de casos notificados se manteve (61,7% em ambos os anos), mas a incidência aumentou de 63,5 para 66,3 casos/100 mil habitantes, o que tornou esse estado um dos maiores responsáveis pelo agravamento da transmissibilidade da doença no país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - RJ, 2021; SES-RJ, 2019). Com isso, a incidência de TB no estado do Rio de Janeiro é aproximadamente duas vezes superior à do Brasil (SES-RJ, 2019).

Figura 2- Coeficiente de incidência de tuberculose/100 mil habitantes.



Nota: Os maiores coeficientes de incidência de TB (acima de 51 casos/100 mil hab.) são observados nos estados do Rio de Janeiro, Amazonas, Pará, Roraima e Acre.

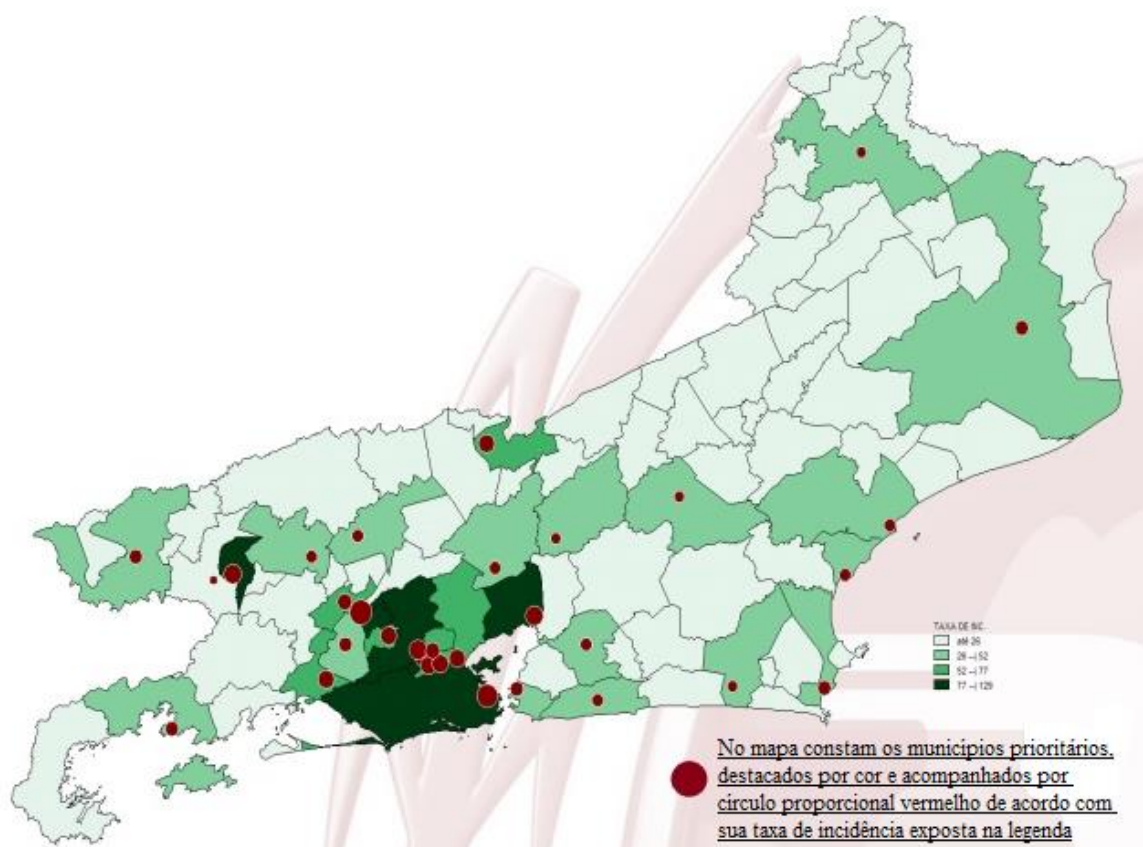
Fonte: Boletim Epidemiológico Especial - Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - RJ, 2021)

Tais dados podem ser suportados pelo fato de que a incidência de tuberculose está associada à precárias condições de vida da população e distribuição desigual de recursos no

Brasil, culminando, entre outros fatores, em altas taxas de desemprego e aglomeração domiciliar em municípios de situação socioeconômico baixa (PELLISSARI et al., 2018). Além disso, um baixo desempenho de programas do governo para o controle da doença não altera os graves coeficientes apresentados pelo país.

A desigualdade social, aliada ao aumento da incidência da doença no sistema prisional do Estado do Rio de Janeiro destacam alguns municípios quanto ao coeficiente de incidência. São eles: Angra dos Reis, Araruama, Barra do Piraí, Barra Mansa, Belford Roxo, Cabo Frio, Campo dos Goytacazes, Duque de Caxias, Itaboraí, Itaguaí, Itaperuna, Japeri, Macaé, Magé, Maricá, Mesquita, Nilópolis, Niterói, Nova Friburgo, Nova Iguaçu, Paracambi, Petrópolis, Queimados, Resende, Rio das Ostras, Rio de Janeiro, São Gonçalo, São João de Meriti, Teresópolis, Três Rios, Vassouras, Volta Redonda (Figura 3) (SES-RJ, 2019).

Figura 3- Taxa de incidência por municípios de residência prioritários de tuberculose, no Estado do Rio de Janeiro, 2019



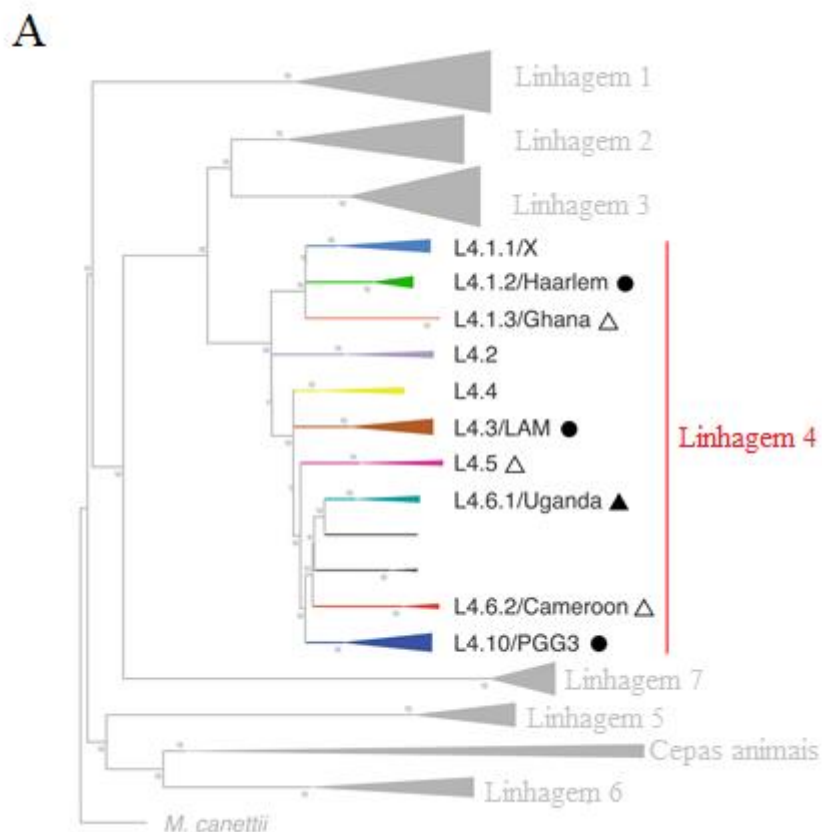
Fonte: (SES-RJ, 2019)

1.3 Cepa RD^{Rio} de *Mtb*

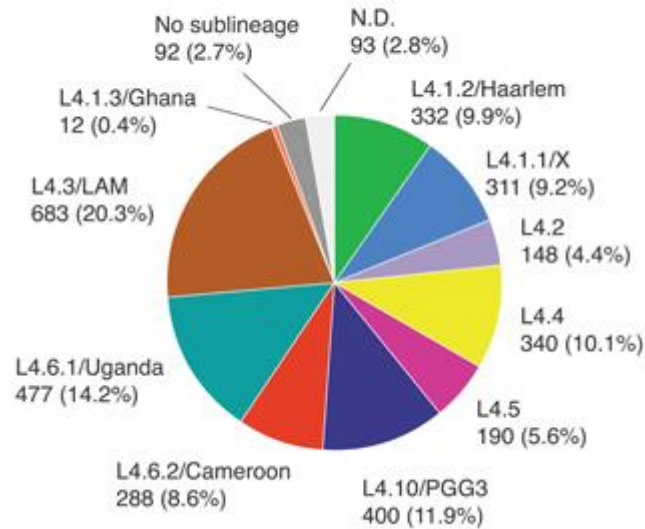
Mtb é diferenciada por variação genética e subdividida em linhagens. As linhagens são, então, agrupadas em famílias que possuem características semelhantes relacionadas, além de diferenças genéticas, às diferenças na evolução clínica, virulência, distribuição epidemiológica e resistência a drogas.

Em seu trabalho de 2016, Stucki rastreou uma coleção global de isolados clínicos de *Mtb* e mostrou que a família LAM é a sub linhagem com maior número de isolados clínicos atribuídos, representando 20,3% da frequência global, seguida pelas demais famílias L4.6.1/Uganda (14.2%), L4.10/PGG3 (11.9%), L4.4 (10.1%) e L4.1.2/Haarlem (9.9%) (Figura 4 A e B) (STUCKI et al., 2016). Dentre as linhagens de *M. tuberculosis*, destaca-se a família LAM, que é a mais prevalente no Brasil, sendo responsável por aproximadamente metade dos casos da doença no país (Figura 5) (BRUDEY et al., 2006).

Figura 4- Definição e frequência global das sub-linhagens da linhagem 4



B

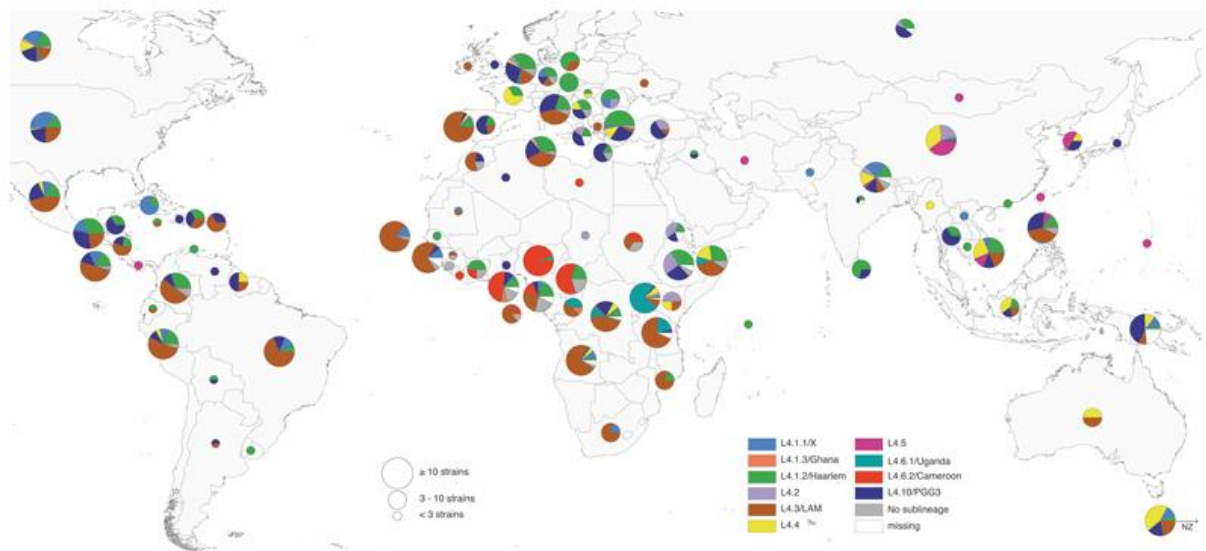


Nota: No painel A, foram definidas 10 sublinhagens com base na análise de 72 sequências genômicas de MTBC Linhagem 4 publicadas anteriormente pelo grupo. Triângulos pretos indicam sublinhagens identificadas como especialistas, círculos pretos indicam generalistas. As formas preenchidas indicam sublinhagens, para as quais o grupo realizou análises genômicas profundas.

No painel B é vista a proporção global de cada sublinhagem. Um total de 3.366 isolados MTBC da Linhagem 4 foram selecionados para SNPs específicos de sublinhagem. L4.3/LAM foi a sublinhagem mais frequente globalmente.

Fonte: Adaptado de (STUCKI et al., 2016)

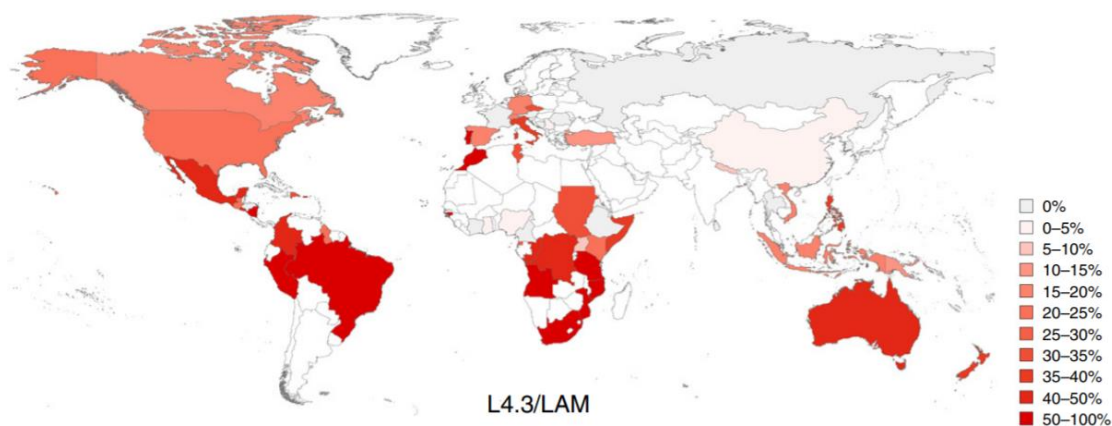
Figura 5- Distribuição global das sublinhagens da Linhagem 4/LAM



Fonte: (STUCKI et al., 2016)

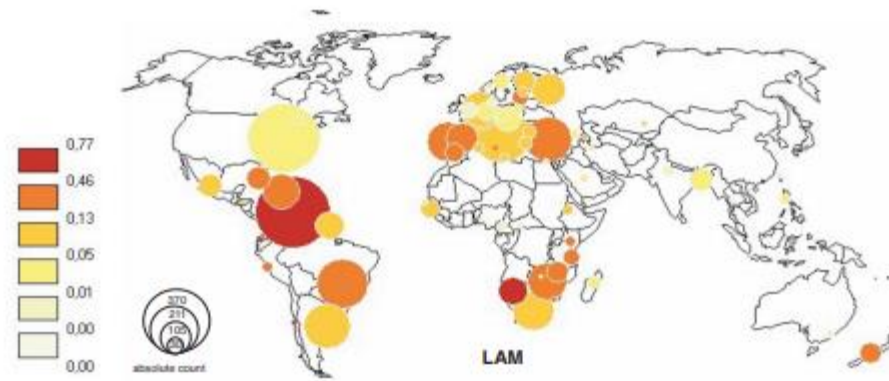
Cepas do genótipo LAM são responsáveis por aproximadamente metade dos casos de TB no Brasil (Figura 6) (BRUDEY et al., 2006; LAZZARINI et al., 2008). Dentro da família LAM, a cepa RD^{Rio}, isolada e identificada em 2007 no Rio de Janeiro por Lazzarini et al (2007), está associada à formas mais graves da doença e é indicada como a mais prevalente no Rio de Janeiro, além de em diversos outros Estados do Brasil (LAZZARINI et al., 2007; SOARES et al., 2013a). Adicionalmente, RD^{Rio} é uma cepa de alcance mundial, possuindo registros em outros continentes além das Américas, como África e Europa (Figura 7) (BRUDEY et al., 2006; LAZZARINI et al., 2008).

Figura 6- Proporções da sublinhagem LAM específicas de cada país



Fonte: Adaptado de (STUCKI et al., 2016)

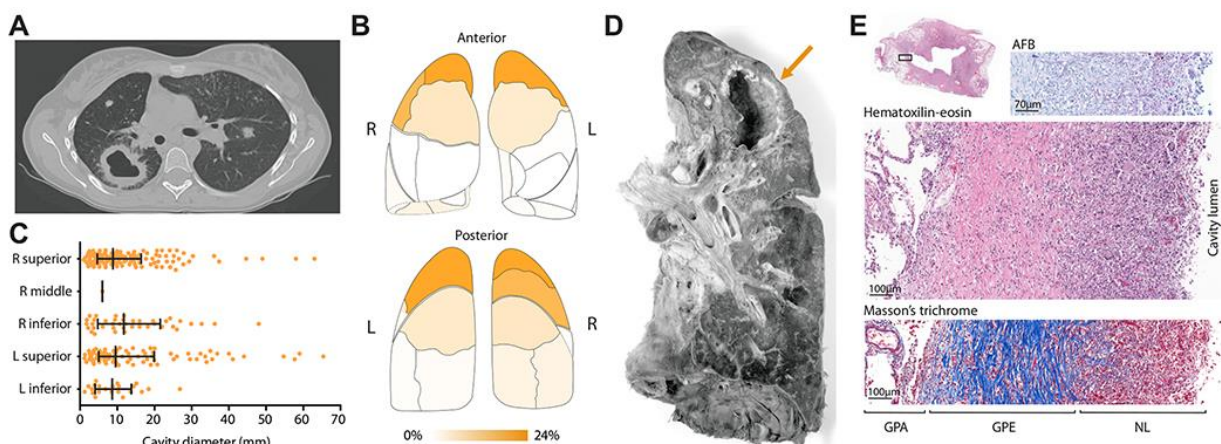
Figura 7- Mapa mundial mostrando números absolutos (diâmetro) e percentuais (cor) da família LAM dentro de cada país



Fonte: Adaptado de (BRUDEY et al., 2006)

A cepa RD^{Rio} causa forma clínica distinta e grave, com registros de lesões pulmonares pela alta carga bacilar nos escarros, expectoração, hemoptise, febre, sudorese noturna e perda de peso. Estudos apontam que a apresentação de cavitações nos pulmões (Figura 8) favorece a disseminação da micobactéria por facilitar a dispersão dos bacilos por entre as lesões (LAZZARINI et al., 2007, 2008). Indivíduos com doença cavitária possuem uma íntima relação do aumento da tosse durante o tratamento com uma maior probabilidade de risco de transmissão à comunidade, pois são mais propensos a aerossolizar e liberar bacilos no ar.

Figura 8- A arquitetura das cavitações pulmonares causadas por TB



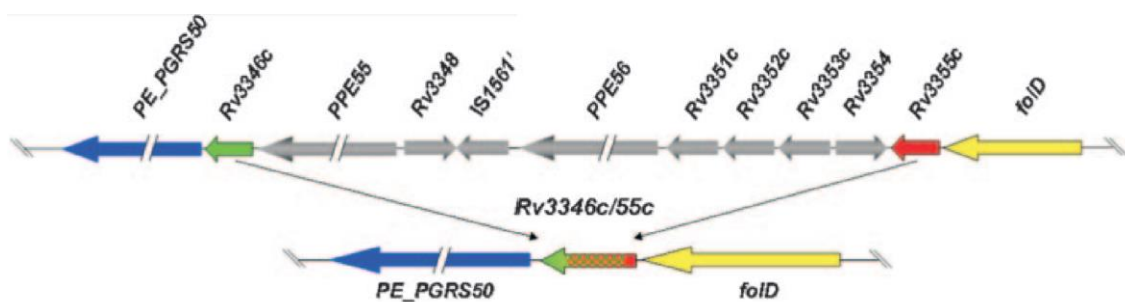
Nota: A) Uma reconstrução de TC de campo pulmonar transversal de um paciente com TB mostrando uma grande cavidade. (B) A distribuição do segmento broncopulmonar de 287 cavidades do banco de dados do TB Portals

Program é representada como um mapa de calor da % do total de cavidades avaliadas. (C) Localização e tamanho das cavidades analisadas em B. (D) Uma imagem grosseira de uma grande cavidade apical de um paciente com TB. A imagem foi obtida do registro de autópsia do Hospital Johns Hopkins e usada com permissão do Arquivo Médico Chesney da Universidade Johns Hopkins. (E) Histologia da parede da cavidade de um paciente humano imunocompetente com TB pulmonar. Cada imagem de alta ampliação é uma seção serial do campo identificado pela caixa na imagem de baixa ampliação de toda a cavidade.

Fonte: Adaptado de (URBANOWSKI et al., 2020)

Variações genéticas específicas em espécies, linhagens e cepas chocam com a teoria de que complexo Mtb (MTC) seja um grupo geneticamente homogêneo. Portanto, técnicas com base na amplificação de regiões de deleção são usadas para diferenciar membros do MTC e informar a respeito da filogenia, preferências geográficas e de hospedeiro, virulência, transmissibilidade, resistência antimicrobiana adquirida e capacidade de induzir ou evitar respostas imunes. Especula-se que tais variações genéticas em MTC originam-se com exclusões, inserções, inversões e duplicações no genoma, que são conhecidos como loci de região de diferença (RD). Em 2007, por PCR, Lazzarini et al mostrou que 30% dos isolados clínicos de Mtb de seu estudo não conseguiu amplificar o locus IS1561. Esses isolados clínicos formaram a cepa RD^{Rio}, contendo uma deleção cromossômica de mais de 26,317 kb, equivalente a 0,6% de todo o genoma em relação à cepa padrão de laboratório H37Rv, e que representa a maior deleção cromossômica já identificada em uma cepa de Mtb (Figura 9) (LAZZARINI et al., 2007).

Figura 9- Diagrama mostrando os genes deletados ou alterados na derivação do LSP de RD^{Rio}



Fonte: (LAZZARINI et al., 2007)

A deleção em RD^{Rio} resultou na exclusão ou modificação de 10 genes. Entre os genes excluídos estão dois genes PPE (Rv3347c e Rv3350c) de superfície extracelular de Mtb que atuam como antígenos em resposta à infecção no hospedeiro. Esses genes codificam as proteínas

PPE55 e PPE56, conhecidos por terem sua expressão induzida quando micobactérias são fagocitados por macrófagos ativados por interferon gama. Sendo assim, sua mutação ou exclusão atuam como estratégia de controle dos bacilos ao reconhecimento imunológico do hospedeiro, o que sublinha o sucesso da cepa RD^{Rio} em maior transmissibilidade e vantagem sob as demais cepas em circulação (LAZZARINI et al., 2007).

A ruptura do gene *pks15/1*, gerando mutantes naturais em *Mtb*, inibe a ação dos genes *mas* e *ppsA-E*, responsáveis então pela biossíntese e translocação de DIMs, DIPs e PGLs. Esses derivados de ftiocerol são constituintes do envelope de células micobacterianas, portanto, estão diretamente relacionados à patogenicidade do bacilo de *Mtb* e à resistência aos antibióticos (CONSTANT et al., 2002).

Além disso, foi demonstrado que RD^{Rio} possui uma deleção que promove modificação ou perda de genes, incluindo dois anticorpos monoclonais conhecidos por estarem atribuídos a imunidade do hospedeiro (GIBSON et al., 2008; SINGH et al., 2005), característica que pode promover uma maior debilidade do sistema de defesa do hospedeiro e agravar a evolução da doença.

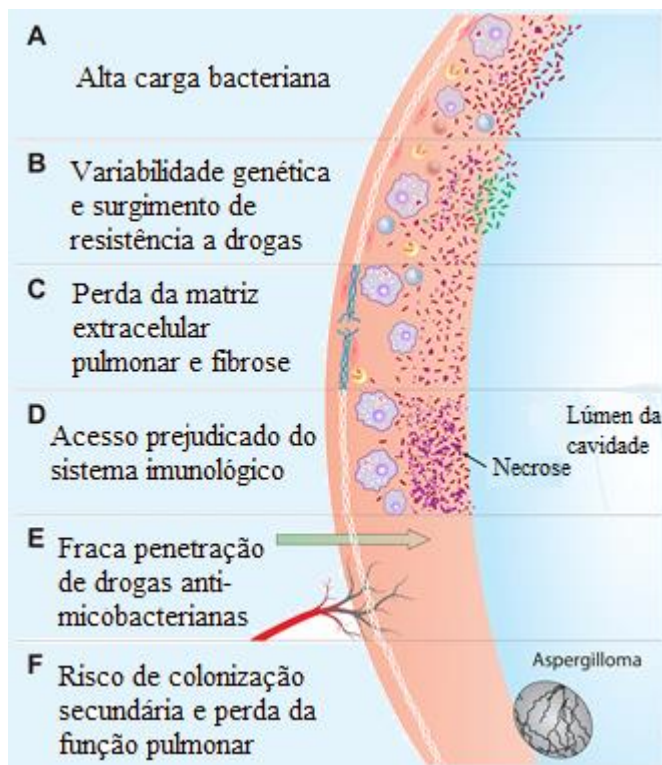
O Complexo *Mtb* engloba diferentes cepas capazes de promover TB, culminando em diferentes espectros de doença e respostas inflamatórias. Mesmo com a diversidade de cepas existentes, a cepa RD^{Rio} se apresenta como possível responsável por cerca de 30-50% dos casos de TB do Brasil (GIBSON et al., 2008; MORAES et al., 2017; OELEMANN et al., 2011). A maioria dos casos relatados no Brasil está concentrada no Sudeste, onde a RD^{Rio} é responsável por cerca de 37% dos casos de TB em Belo Horizonte e cidades circundantes (LAZZARINI et al., 2008). Paralelamente, 28,7% dos casos de TB de São Paulo, e 26,5% no Rio de Janeiro são atribuídos à cepa RD^{Rio} (LAZZARINI et al., 2008). A região Sul do Brasil também concentra grande número de casos de TB causados por RD^{Rio}, com 38% de prevalência na cidade de Porto Alegre (MORAES et al., 2017). De forma geral, dentre as cidades do Brasil, o Rio de Janeiro manifesta a maior incidência de TB (PEREIRA et al., 2015).

Estudos anteriores do nosso grupo identificaram a circulação da cepa RD^{Rio} no Rio de Janeiro 10 anos antes de sua caracterização, em 2007. Este estudo foi realizado entre 1995 e 1997, onde se buscava determinar quais eram as cepas de circulação presentes no Rio de Janeiro (dados não publicados).

1.3.1 Cavitação pulmonar

As cavitações pulmonares criam um ambiente capaz de aumentar a transmissão, taxa de incidência e a mortalidade pela doença (Figura 10). Inicialmente, há a formação de um abscesso granulomatoso com centro necrótico que, posteriormente, migra para um via aérea, enquanto isso, detritos necróticos permanecem nessa cavidade. As células de defesa recrutadas, fagócitos e granulócitos, encontram dificuldade em penetrar nessas cavidades necróticas, o que gera uma zona protegida para crescimento e replicação bacteriana. Além disso, o alto nível de oxigênio na cavidade robustece o ambiente para a replicação no fator de 10^7 a 10^9 bactérias, tornando uma área de alta carga bacilar que, em pouco tempo, será expelida durante o processo de transmissão da doença. Essa rápida proliferação bacteriana aumenta a frequência de mutações que podem desenvolver resistência aos medicamentos. Como agravante, o ambiente interno das cavitações é pouco vascularizado, o que também limita a penetração de drogas antimicrobianas, aumentando a probabilidade de reaparecimento da doença ou de um sintoma após período de cura (URBANOWSKI et al., 2020).

Figura 10- Modelo aceito para formação de cavitações pulmonares por Mtb



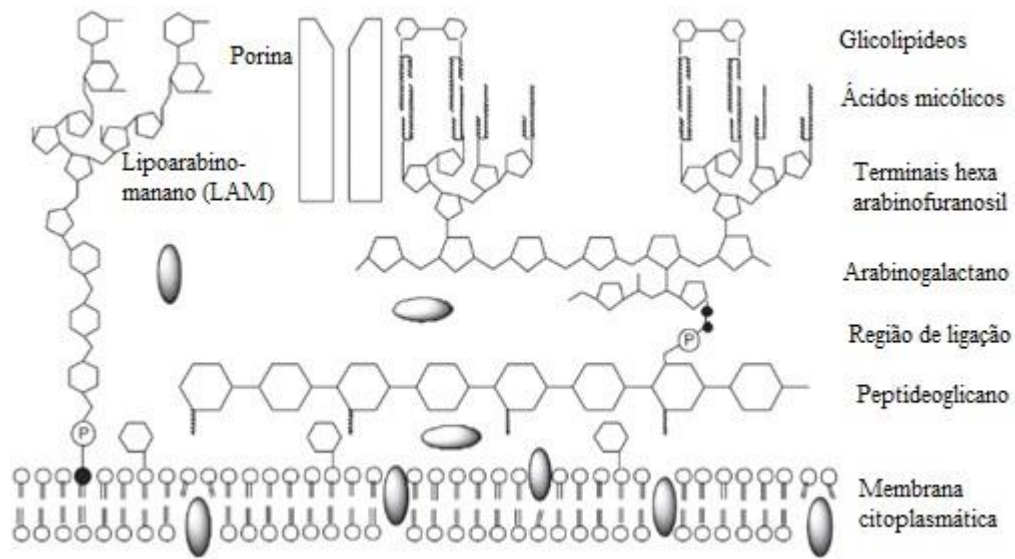
Fonte: Adaptado de (URBANOWSKI et al., 2020)

1.4 A infecção por Mtb e o sistema imune

Dos estimados dois bilhões de pessoas no mundo infectadas por Mtb, apenas 5-10% delas irão desenvolver a doença ativa ao longo da vida. A maior parte da população mundial é capaz de controlar o bacilo eficientemente e desenvolver apenas o estado de infecção latente, caracterizado pela ausência de sinais clínicos (“Global tuberculosis report”, 2020; ROSEMBERG, 2001).

O Mtb é um bacilo em forma de bastão, aflagelado, não capsulado, álcool-ácido resistente (BAAR), intracelular facultativo, aeróbio obrigatório, de crescimento lento, que pode se multiplicar dentro dos macrófagos alveolares, e em outras células do organismo, levando a formação de granulomas, estruturas com o papel de controle da doença (DUCATI et al., 2006; SEGOVIA-JUAREZ; GANGULI; KIRSCHNER, 2004). A sua estrutura da parede celular é formada por ácidos graxos e rica em ácidos micólicos e arabinogalactano, que se ligam ao peptidoglicano e confere ao bacilo a característica de resistência ao álcool-ácido, além de antissépticos e uma gama de antibióticos (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; JARLIER; NIKAIDO, 1994; MCNEIL; BRENNAN, 1991) (Figura 11). Além disso, a parede celular micobacteriana permite a sobrevivência do bacilo dentro do macrófago (BRENNAN; NIKAIDO, 1995). A transmissão, quase na totalidade dos casos, se dá por via aérea, através da inalação do aerossol contendo gotículas com um a três bacilos de uma pessoa com a doença ativa (CAMBIER; FALKOW; RAMAKRISHNAN, 2014). Quando exalados, os bacilos podem se manter em suspensão no ar por horas e, por isso, a TB é considerada uma doença altamente contagiosa (BLOOM; MURRAY, 1992). É uma doença majoritariamente pulmonar, entretanto, pode acometer também os tratos gastrointestinal e genital-urinário, pleura, ossos, articulações, sistema nervoso, linfonodos, pele, entre outros, sob a forma de tuberculose extrapulmonar (BARBERIS et al., 2017).

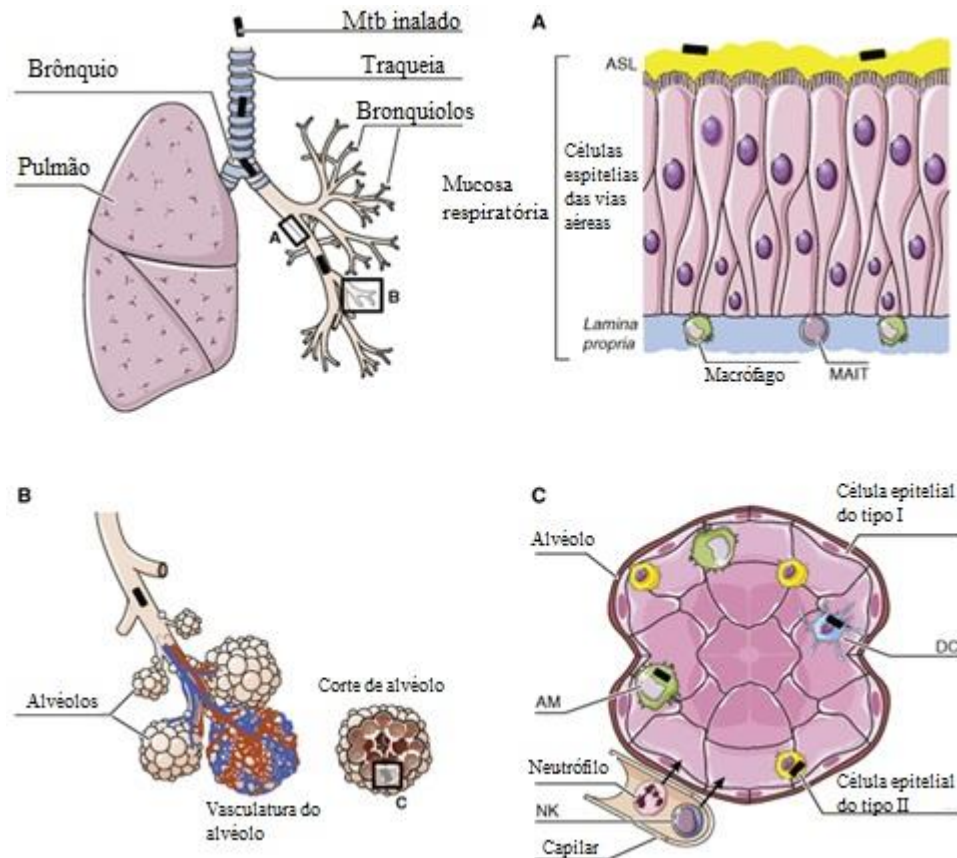
Figura 11- Representação da parede celular da micobactéria



Fonte: Adaptado de (DUCATI et al., 2006)

Os bacilos são inalados por nariz e boca e passam ao longo da traqueia, brônquios e bronquíolos até chegarem aos alvéolos do pulmão (Figura 12). Em seguida, fagócitos profissionais e as células epiteliais das vias aéreas formam a primeira linha de defesa através de uma barreira física que é capaz de reconhecer receptores de reconhecimento padrão (PRRs) de Mtb como toll-like, dectina-1, receptores de lectina do tipo C (CLRs), NOD2 e modular a composição de seu líquido de superfície (ASL), que passa a produzir citocinas para ativação de células T e estimular a produção de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (DE MARTINO et al., 2019). Ocorre então o acúmulo dessas células nos pulmões, que são infectadas pela crescente população de micobactérias, formando os granulomas, que possuem numerosos linfócitos, macrófagos e fibroblastos na periferia (ERNST, 2012).

Figura 12- Células envolvidas na resposta imune inata humana à tuberculose ao longo da via aérea



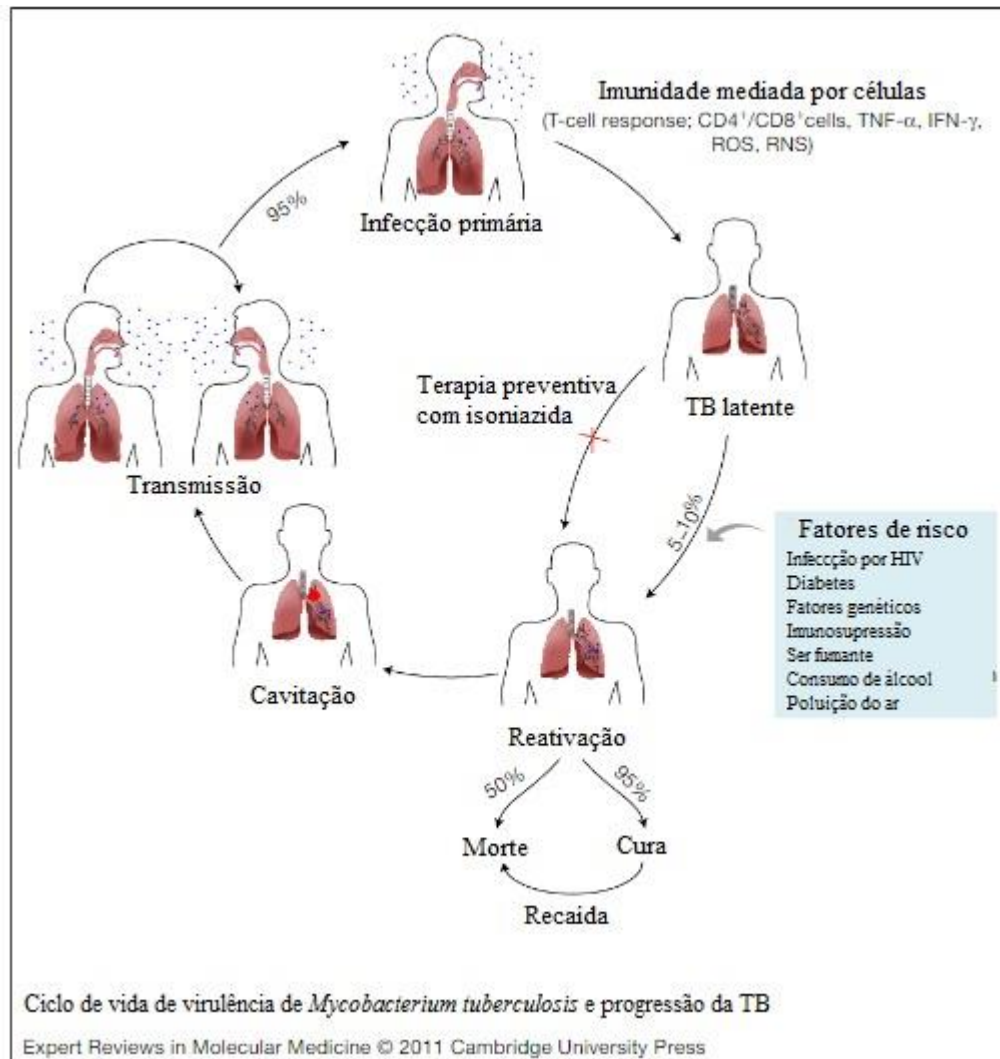
Fonte: Adaptado de (LERNER; BOREL; GUTIERREZ, 2015)

Com a formação de granulomas completos, inicia-se a necrose caseosa, que se estende de um granuloma a outro e, ao atingir os brônquios e serem drenadas, formam as cavitações (BLOOM; MURRAY, 1992). Contudo, a maioria dos bacilos que chegam aos alvéolos, são vencidos pela imunidade inata. Entretanto, se ocorre a formação de granulomas antes da contenção dos bacilos, há a instalação de uma infecção latente já que os bacilos seguem vivos podendo promover uma reativação da doença (DUCATI et al., 2006). O mecanismo imunitário na TB engloba o sistema macrófago-célula T para o controle de Mtb, com eventos que incluem a expressão de citocinas antimicrobianas como $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ que estimula a produção de NOS-2, produção de ROI e outros radicais intermediários de nitrogênio (RNI), diminuição do pH intrafagossômico (em torno de 4.0 a 5.0) e a lise no fagolisossomo. No entanto, o Mtb pode evadir dos mecanismos de defesa dos macrófagos e permanecer em circulação, dentro do

granuloma. O macrófago alveolar se apresenta como a principal célula de defesa, que além da citocina chave IFN- γ (principal molécula ativadora de macrófago), necessita da presença de vitamina D para promover a maturação do fagossomo e a produção de peptídeos antimicrobianos através da regulação de genes autofágicos (DE MARTINO et al., 2019).

Após exposição ao Mtb e fagocitose dos bacilos, os mesmos terão seus antígenos apresentados para células T pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) presente nos macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. As células T mais potentes na ativação dos macrófagos são TCD4⁺ e TCD8⁺. As células dendríticas, chamadas apresentadoras de antígeno (APCs) produzem citocinas como TNF, IL-1 e IL-12, induzindo a resposta pró inflamatória e recrutando neutrófilos e monócitos. Além disso, mesmo após a infecção dos macrófagos no pulmão, antígenos de Mtb são secretados e apresentados via MHC-I, estimulando células TCD8⁺ produtoras de IFN- γ , além de liberarem grânulos enzimáticos que degradam lipídios e promovem a lise de células infectadas por apoptose e destruição do bacilo. Contudo, a evolução de Mtb gerou sistemas de escape dos mecanismos antimicrobianos do hospedeiro. Portanto, o sucesso do controle do Mtb e da doença depende da capacidade anti-microbiana intrínseca do hospedeiro e dos fatores de virulência de Mtb (LERNER; BOREL; GUTIERREZ, 2015).

Figura 13- Ciclo de vida e progressão de Mtb



Fonte: Adaptado de (KUMAR et al., 2011)

O Mtb é capaz de subverter o sistema imune do hospedeiro e permanecer viável por muitos anos nos tecidos dos indivíduos infectados. Porém, muitos destes mecanismos de escape ainda não foram elucidados. Dentre os principais mecanismos de escape conhecidos do Mtb estão a instalação da micobactéria no fagossomo e consequente inibição da acidificação e maturação do fagolisossomo, a inibição da autofagia, acesso ao citosol, a indução da morte da célula hospedeira e a neutralização de componentes tóxicos como espécies reativas de oxigênio e metais tóxicos (DE MARTINO et al., 2019). Ademais, micobactéria promove a produção de moléculas capazes de inibir IL-12 e IFN- γ , que são essenciais na eliminação de Mtb em macrófagos e,

também, no escape do fagossomo para o citosol. Ainda, as membranas celulares bacterianas possuem formação complexas de ácidos graxos de cadeia ramificada de metil que promove proteção contra as enzimas do hospedeiro (ZHAI et al., 2019). Tais mecanismos permite-lhes escapar das respostas imunológicas e favorecem sua sobrevivência e a multiplicação dos bacilos no interior do fagócito.

A história da TB mudou após a introdução das primeiras drogas com atividade antimicobacteriana. No entanto, não muito depois que o primeiro antibiótico foi introduzido em 1944, a resistência aos medicamentos surgiu. A resistência de *Mtb* aos medicamentos tem sido atribuída à estrutura de sua parede celular de ácido micólico, o que faz com que as micobactérias tenham uma baixa permeabilidade para muitos antibióticos e outros agentes quimioterápicos (ALMEIDA DA SILVA; PALOMINO, 2011).

Ao sobreviver ao tratamento, ocorre a origem de espécies multirresistentes (MDR) e mutantes bacterianos amplamente resistentes a drogas (XDR), o que se torna um obstáculo maior no tratamento da doença (DE ALMEIDA et al., 2019a). Em seu trabalho, (DE ALMEIDA et al., 2019a) mostra uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre a sub-linhagem RD^{Rio} e cepas MDR oriundas de amostras de escarro e lavado bronco alveolar de pacientes de Minas Gerais. Em conjunto a resultados de CFU mais altos em pacientes infectados por RD^{Rio}, o grupo mostra que a rápida proliferação bacteriana promove uma alta taxa de transmissão entre a comunidade, o que justifica uma baixa ação do tratamento.

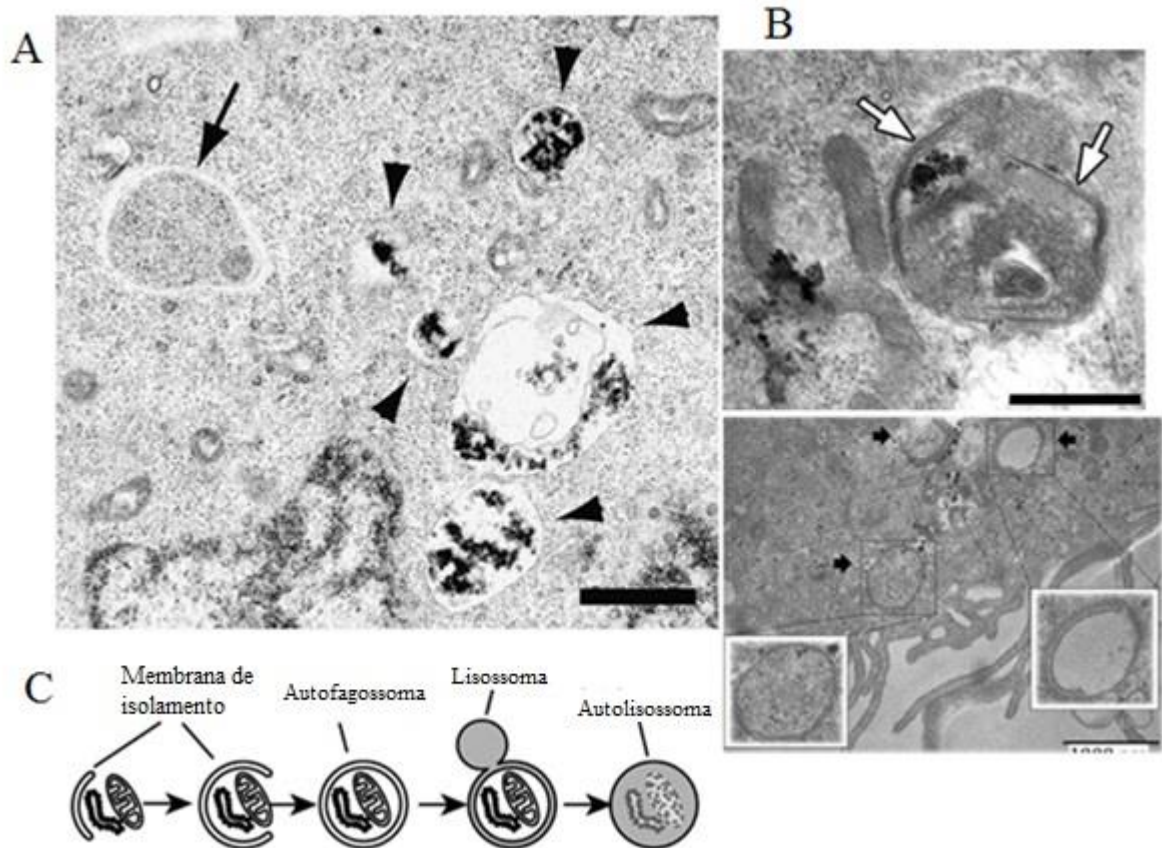
1.5 Autofagia

1.5.1 Características gerais

O termo autofagia (do grego, “comer a si mesmo”) surgiu em 1967, cunhado por Christian de Duve, também responsável pela descoberta dos lisossomos, nomeia o processo relacionado à degradação de compostos citosólicos por lisossomos (KLIONSKY, 2008).

Autofagia é um processo fisiológico constitutivo de digestão e reciclagem de organelas e componentes intracelulares não funcionais, podendo também ser ativada em condições de estresse celular como ausência de nutrientes. Portanto, é responsável pela manutenção do equilíbrio entre a síntese, a degradação e a reciclagem dos componentes celulares capturados em organelas de dupla membrana denominadas autofagossomos (Figura 14) (MIZUSHIMA; OHSUMI; YOSHIMORI, 2002).

Figura 14- Formação e estrutura de autofagossomos



Nota: A: a seta preta indica um autofagossomo e as pontas de seta indicam autofagolisossomos. Abaixo mostra a formação do autofagossomo: Uma porção do citoplasma é envolvida pela membrana de isolamento autofágico, que eventualmente resulta na formação de uma estrutura de membrana dupla, chamada autofagossomo. A membrana externa do autofagossomo então se funde com o lisossoma, onde os materiais derivados do citoplasma são degradados. B: setas brancas indicam autofagossomo delimitado por uma membrana dupla circundando mitocôndria e glicogênio citoplasmático e setas pretas indicam vesículas autofagossômicas de membrana dupla típicas no citoplasma de THP1-HsCD5L MF. C: Esquema representativo das vesículas autofágicas.

Fonte: Adaptado de (FLOREZ-MCCLURE et al., 2004; MIZUSHIMA, 2005; SANJURJO et al., 2015)

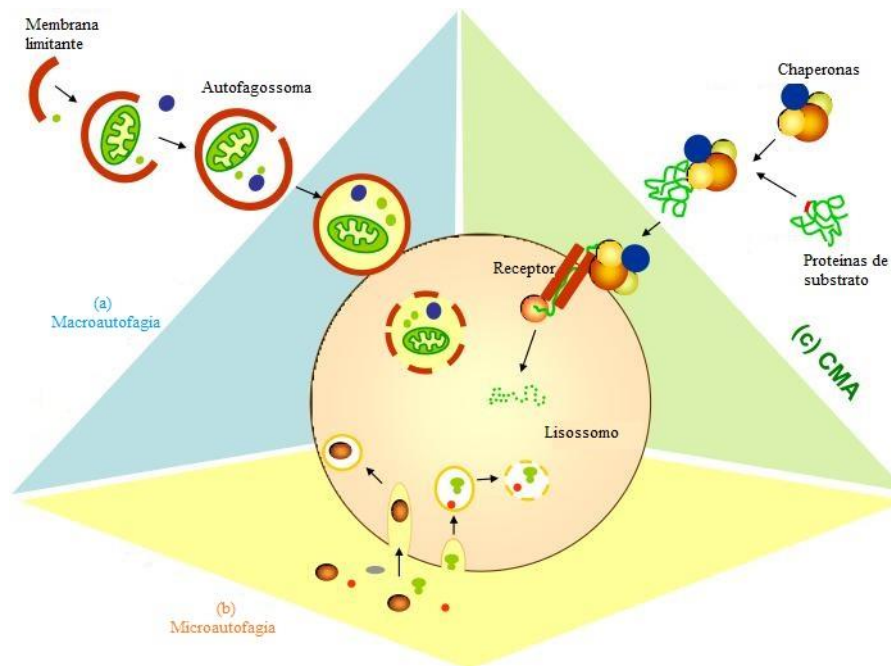
Ao longo do tempo, os organismos desenvolveram estratégias de utilização do processo de autofagia como resposta protetora para eliminação de patógenos intracelulares durante as infecções.

Com a identificação dos genes relacionados à autofagia (ATG – autophagy-related genes) em leveduras na década de 1990 pelo grupo do Dr. Ohsumi, houve um avanço no entendimento e na caracterização da via autofágica (KLIONSKY et al., 2003; OHSUMI; OHSUMI; BABA, 1993).

A autofagia em células eucarióticas é um processo conservado e regulado por uma série de mais de 30 proteínas ATG e classificado em três vias principais: macroautofagia, única via

com presença de autofagossomas, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (AMC), divergentes apenas nos meios de entrega de carga para o lisossomo (Figura 15) (MURROW; DEBNATH, 2013).

Figura 15- Tipos de autofagia em células de mamíferos



Nota: Três tipos diferentes de autofagia foram descritos em células de mamíferos: (a) Macroautofagia, (b) Microautofagia e (c) Autofagia mediada por chaperonas (CMA).

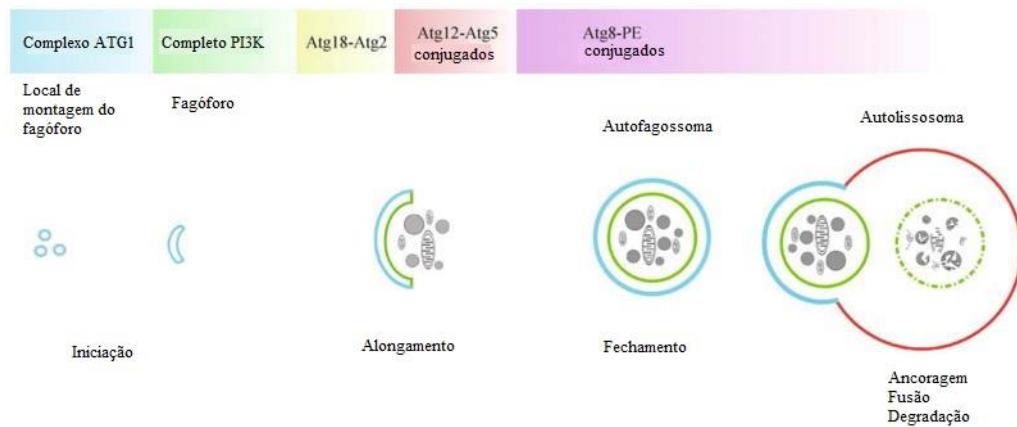
Fonte Adaptado de (CUERVO, 2010)

1.5.2 Mecanismo de execução da Autofagia

A indução de autofagia se caracteriza pela execução de três processos morfológicos: a iniciação, o alongamento e a maturação (Figura 16). A macroautofagia, aqui denominada autofagia, é uma via totalmente diferente das demais e classificada, a partir estudos anteriores, como uma via canônica e sua maquinaria é a melhor já descrita (ROMAO; MÜNZ, 2014; VAN LIMBERGEN et al., 2009).

A característica chave da autofagia é que alvos citoplasmáticos são capturados em autofagossomos, os quais, subsequentemente, se fundem a lisossomos, formando os autofagolisossomos, onde a carga capturada é degradada ou eliminada (VAN LIMBERGEN et al., 2009).

Figura 16- Visão geral da macroautofagia



Fonte: Adaptado de (CHEW; YIP, 2014)

Um dos principais reguladores da via autofágica é mTOR (alvo da rapamicina nos mamíferos), proteína serina/treonina cinase que detecta os níveis nutricionais celulares, regula crescimento e sobrevivência celular, além de inibir diretamente a autofagia (HALE et al., 2013). mTOR é formada por dois complexos proteicos: mTORC1 e mTORC2, sendo o primeiro um ativador de p70S6 cinase-1 (S6K1) para aumentar a síntese de proteínas (DE MARTINO et al., 2019; ERNST, 2012); e o segundo complexo ativa Akt (proteína cinase B) (ZHAI et al., 2019) para promover a sobrevivência. Akt, um membro da família de proteínas serina/treonina cinase, funciona tanto como ativador de mTOR quanto como alvo de fosforilação de mTOR. Tais funções divergentes de mTOR são mediadas pela interação entre seus complexos, que se diferenciam pela presença de duas proteínas: sensível à rapamicina (raptor) em mTORC1 e a insensível à rapamicina (riCTOR) em mTORC2 (HARSTON et al., 2011). Sob condição fisiológica, a via autofágica está inibida pela fosforilação de mTOR sob o complexo ULK1/FIP200/ATG13, que se mantém ativa via Akt (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006).

Em contraste, sob estresse nutricional, o complexo ULK1/FIP200/ATG13 se desfosforila, liberando mTOR do complexo e disparando a via. Outra maneira de ativar autofagia por inativação de mTOR seria tanto por déficit energético com sinalização AMPK (cinase ativada por AMP), quanto por uso de fármacos como a Rapamicina.

Com ULK1 desassociado de mTOR e fosforilando ATG13 e FIP200, o complexo chega na membrana, majoritariamente, do retículo endoplasmático, e promove a formação e início da projeção de uma estrutura chamada omegassoma, ainda preso na membrana de origem,

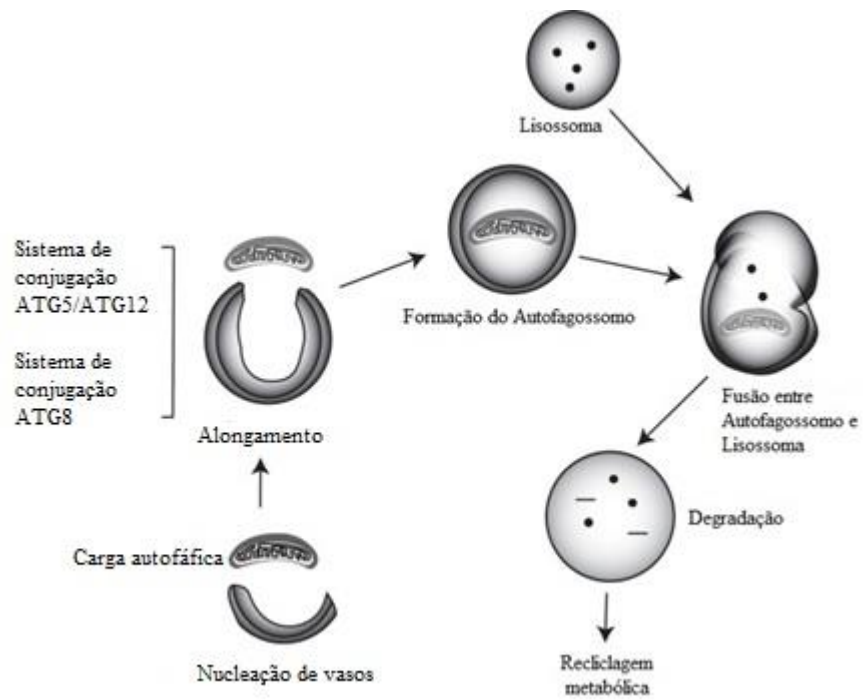
caracterizando o processo de iniciação (HE; KLIONSKY, 2009). Posteriormente, o complexo VPS34/VPS15/Beclin1/ATG14, ativa fosfatidilinositol 3-cinase classe III (PtdIns3K) que fosforila fosfatidilinositol para fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P), adicionando PI3P, outros complexos e lipídeos à membrana do fagóforo, caracterizando o processo de nucleação.

O processo de alongamento do fagóforo se dá com a mudança de forma da proteína chave da via LC3 (Figuras 17 e 18), que pode ocorrer através de dois sistemas de conjugação. No primeiro, ATG12 é ativado e conjugado à ATG5 por ATG10, permitindo a interação com ATG16L1. Então, o complexo ATG12/ATG5/ATG16L1 lipida LC3-I em LC3-II e, após o alongamento completo, os componentes desassociados do complexo retornam ao citoplasma. Já o segundo sistema induz a modificação de MAP1LC3 quando ATG4 cliva os 22 resíduos do terminal C do precursor LC3 (pró LC3) produzindo LC3-I, que é conjugado então à fosfatidiletanolamina (PE) por ATG7 e ATG3, migra do citoplasma para a membrana do fagóforo na forma de LC3-II, ou seja, lipídada, quando é ligada à membrana do fagóforo com fosfatidiletanolamina do lipídio.

A parte final do processo ocorre quando, coordenada pela proteína RAB7, as extremidades desse fagóforo se fundem e resulta no fechamento e maturação de um compartimento delimitado, o autofagossomo, com a carga a ser degradada (GUTIERREZ et al., 2004; WIRAWAN et al., 2012). Após a entrega desta vesícula ao lisossoma, a carga é degradada por ação de hidrolases lisossomais e as macromoléculas resultantes são liberadas de volta no citosol para reutilização (LEVINE; MIZUSHIMA; VIRGIN, 2011).

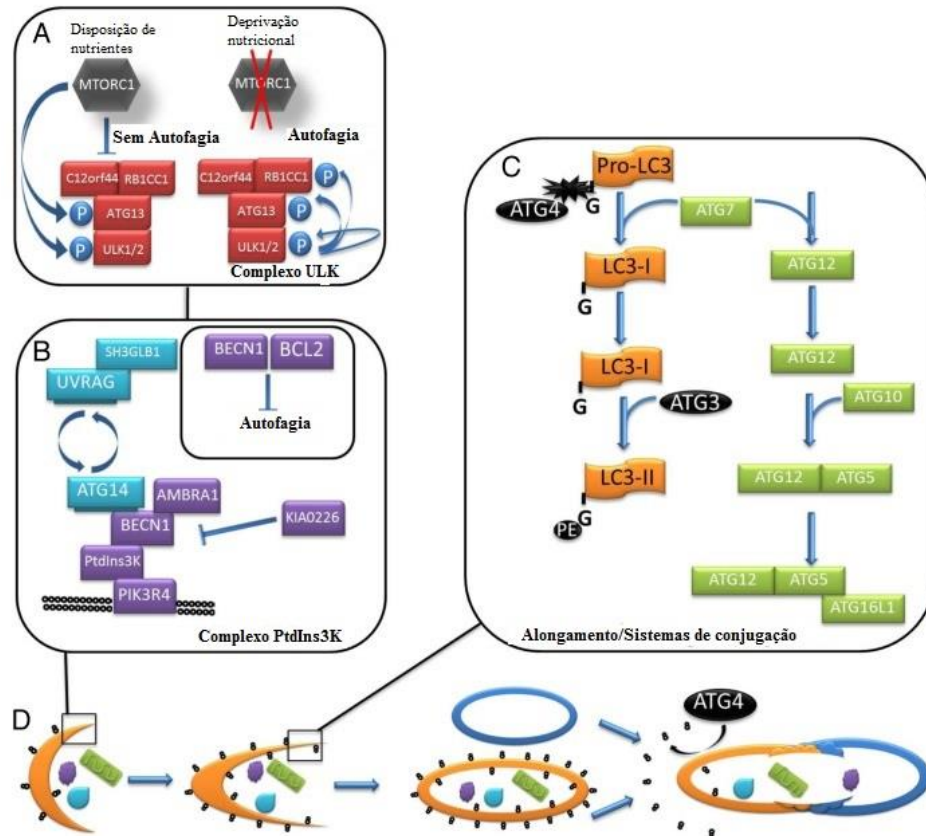
Até esta etapa, LC3-II está associado com a membrana externa, porém, com a fusão do autofagossoma e lisossoma, LC3-II se dissocia e, agora associada com a membrana interna, é degradada junto com a carga autofagossômica (HALE et al., 2013).

Figura 17- Regulação da via autofágica



Fonte: Adaptado de (RYTER; CLOONAN; CHOI, 2013)

Figura 18- O mecanismo central da autofagia e o processo de degradação e reciclagem das vesículas autofagossomas após a fusão com um lisossomo



Nota: (A) ULK1 desfosforilado dissocia-se do complexo mTOR para, juntamente ao complexo ATG13 e RB1CC1, induzir a fase de nucleação. (B) O complexo PtdIns3K é montado no local da membrana autofagossômica nascente. UVRAG e ATG14 são encontrados em complexos BECN1 de maneira mutuamente exclusiva. BECN1 é inibido quando ligado por BCL2 anti-apoptótico, o que resulta em autofagia regulada negativamente. (C) Os dois sistemas de conjugação do tipo ubiquitina essenciais para o alongamento da membrana são descritos esquematicamente. (D) A membrana autofagossômica (crescente laranja) é cravada com LC3-PE (estilizado em preto). O alongamento da membrana é dependente do sistema de conjugação ATG12–ATG5–ATG16L1. Durante a fusão com o lisossomo (círculo azul), o LC3-PE associado à membrana externa é clivado e reciclado pelo ATG4, enquanto o LC3-PE associado à membrana interna é degradado por proteases lisossomais juntamente com a carga do autofagossomo.

Fonte: Adaptado de (HALE et al., 2013)

LC3 é uma proteína constituinte da membrana autofagossômica que possui duas formas, sendo a forma citosólica de 18kDa (LC3-I) e a forma lipídica de 16kDa (LC3-II) (KABEYA et al., 2000). A diferença entre elas se dá pela exposição do penúltimo resíduo C-terminal de LC3, a

glicina, após uma remoção proteolítica da arginina C-terminal, que é conjugada à fosfatidiletanolamina. Essa conjugação permite a ligação de LC3 à membrana autofágica, onde auxilia no alongamento do autofagossomo (REGGIORI; KLIONSKY, 2002).

1.6 Autofagia e infecção por Mtb

A autofagia responde ao sinal clássico de privação de nutrientes, que pode ser causado por baixos níveis de aminoácidos, energia ou ausência de fatores de crescimento, como também a sinais de imunidade inata e estimulação de citocinas durante as respostas imunológicas (DERETIC, 2014). Em 2004, Gutierrez et al demonstraram pela primeira vez o papel da autofagia no combate aos bacilos do complexo Mtb. Quando macrófagos foram infectados com H37Rv de *Mtb*, há uma menor taxa de sobrevivência e consequente sobrevida do bacilo, quando a autofagia é induzida por inanição ou rapamicina (aproximadamente 40% de sobrevida) em comparação com macrófagos infectados sem tratamento ou tratados com um fármaco inibidor de autofagia 3-MA (100% e 80% de sobrevida, respectivamente), assim como quando macrófagos foram infectados com BCG de *Mycobacterium bovis* e induzidos por inanição ou por tratamento com rapamicina, os fagossomos foram acidificados, bacilos se encontravam dentro dos fagolisossomos e houve aumento da co-localização de *M. bovis* com LC3 e Beclin 1 em relação ao controle. O grupo também mostrou que IFN- γ promove efeitos semelhantes à inanição (GUTIERREZ et al., 2004). Tais dados suportam a importância do processo de autofagia no controle da infecção por Mtb.

Sabe-se que a autofagia é uma das principais vias de eliminação de micobactérias através da formação do autofagossoma, potencializando a destruição de micobactérias. A capacidade de Mtb inibir a maturação e acidificação de fagossomos depende da sua virulência, isto é, é preciso que a carga bacilar seja alta. Porém, mesmo que sua multiplicação seja contida pela ação de macrófagos, é possível que Mtb se replique dentro desses macrófagos infectados, o que interrompe a maturação e acidificação do fagossomo.(ADIKESAVALU et al., 2021; DUCATI et al., 2006).

Mtb também interfere na formação e função do compartimento fagocítico ao produzir lipídios que mimetizam fosfatidilinositóis ligados à formação de PI3P via VPS34. Além disso, Mtb interfere na entrega de subunidades V-ATPase e hidrosais lisossomais ao fagossoma, bloqueando sua função final. Portanto, Mtb possui a capacidade de bloquear, além do processo autofágico, as vias de tráfego dependentes de PI3P, como a formação do local de nucleação e a via de alongamento e maturação do fagóforo (BENTO; EMPADINHAS; MENDES, 2015). Porém,

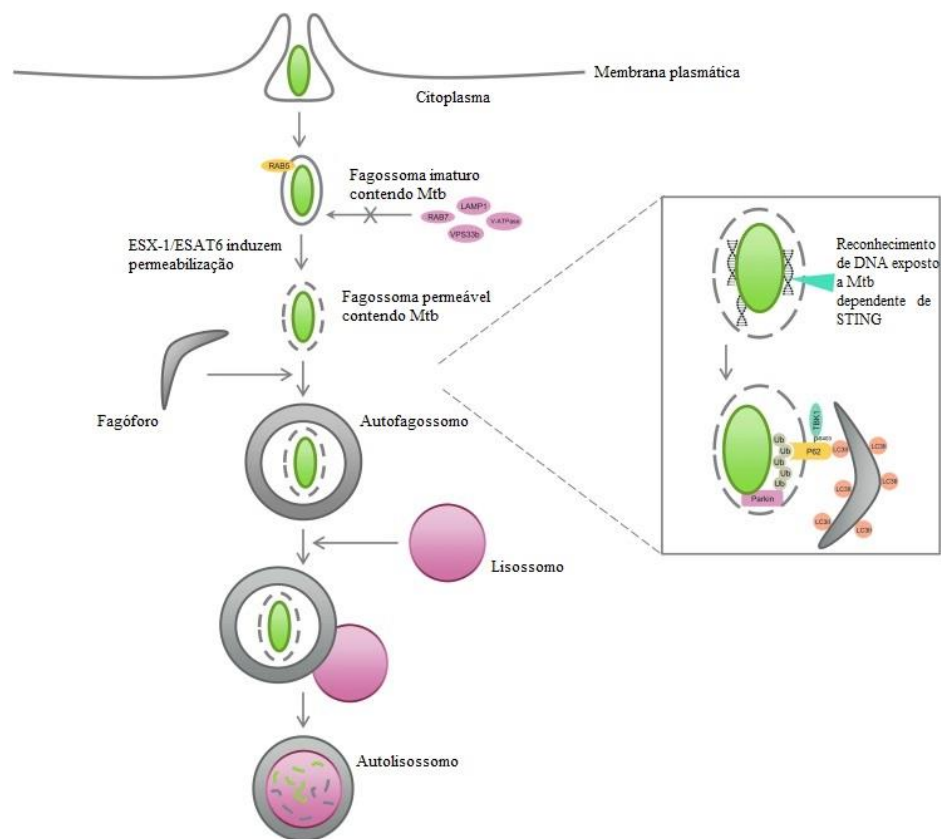
Gutierrez et al (2004) mostrou que a indução de autofagia pode reverter o bloqueio da biogênese dos fagolisossomos por BCG de Mtb e afetar a sobrevivência dos bacilos em macrófagos infectados, além de também afetar a sobrevivência dos bacilos em macrófagos infectados com a cepa H37Rv de Mtb.

O gene codificador da proteína eis (sobrevivida intracelular aprimorada) aumenta a sobrevivência de Mtb, diminuindo a autofagia e pró-inflamação (SHIN et al., 2010; WEI et al., 2000). A infecção por Mtb com deleção desse gene (Mtb-Deis) permite a formação das estruturas principais da via de autofagia: os autofagossomos. Esse mutante também regula positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, além de ROS, desencadeadores de autofagia e resposta pró-inflamatória. Mtb sem a deleção promove a acetilação de Lys55 da proteína fosfatase 16 de especificidade dupla (DUSP16), resultando na diminuição da formação de ROS, o que parece ser o evento inicial de inibição da autofagia.

Entretanto, o sistema imune do hospedeiro também evoluiu, usando mecanismos da micobactéria em razão de mecanismos de combate ao Mtb invasor. As gotículas lipídicas regulam o gene Eis (gene de sobrevivência intracelular) que acetila Lys55 em fosfatase JNK. Sob condições não estressantes, a proteína apoptótica Bcl-2 se mantém ligada à Beclin-1, porém, a ativação da fosfatase JNK promove a fosforilação de Bcl-2, liberando Beclin1 para agir sob o início da promoção de autofagia (WEI et al., 2008). Além disso, outros fatores bacterianos como a conformação de seu envelope com lipoarabinomanano que evita a aquisição de VPS34 ativo pelo fagossomo, e a presença do sistema ESX-1 que secreta ESAT-6 para permeabilizar o fagóforo e escapar para o citosol. Os sistemas de secreção tipo VII ESX-1 e ESAT-6 foram associados à permeabilidade do fagossomo contendo Mtb aos componentes citosólicos mediados por ubiquitina da via autofágica, o que permite acesso ao bacilo. Sendo assim, o estimulador do gene do interferon (STING) do hospedeiro reconhece o DNA bacteriano extracelular que foi anteriormente exposto por macrófagos e promove a ubiquitinação do bacilo e recrutamento de LC3. Com isso, há a formação da estrutura de autofagossomo contendo os bacilos em seu interior e que, posteriormente, fusionará ao lisossomo e maturará em autofagolisossomo. Já o ESAT-6, proteína de 6kDa do bacilo e principal substrato secretado por ESX-1, exerce papel como estimulante da imunidade celular ao mobilizar células imunitárias em ação conjunta ao IFN- γ (Figura 19). No entanto, apenas um terço das bactérias intracelulares são direcionadas ao sistema “de emergência” de ubiquitinação, o que leva a entender que o controle da infecção aumenta o nível de autofagia de todas as células do hospedeiro para evitar a evasão deste sistema por Mtb (BENTO;

EMPADINHAS; MENDES, 2015). A ativação de autofagia via ESX-1/ESAT-6 também foi comprovada em células infectadas por *Mycobacterium marinum*, uma diferente cepa do complexo MTB, porém, promove um direcionamento dos bacilos à degradação de forma diferente, sugerindo que a indução de autofagia e ubiquitinação de bacilos em Mtb seja dependente do sistema ATG5 (COLLINS et al., 2009; WATSON; MANZANILLO; COX, 2012a).

Figura 19: Eliminação de Mtb por autofagia



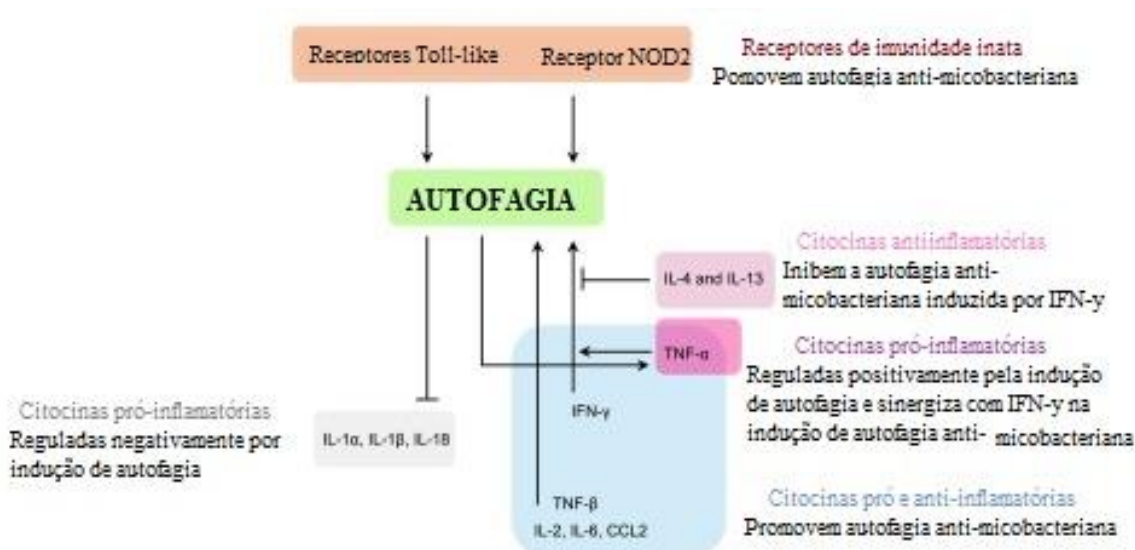
Fonte: Adaptado de (BENTO; EMPADINHAS; MENDES, 2015)

2 JUSTIFICATIVA

Embora a cepa RD^{Rio} de *Mtb* tenha uma grande importância clínica, não existem trabalhos que caracterizem a interação com o sistema imune do hospedeiro e como se desenrola o processo de autofagia e sua possível modulação. De fato, a supressão da autofagia pode ser um mecanismo de virulência do bacilo, entretanto, estudos de caracterização do processo autofágico durante a

infecção por *Mtb* se concentram em cepas padrão de laboratório e não circulantes no Brasil, como H37Ra, H37Rv e Beijing. Além disso, o processo de autofagia conversa com outros mecanismos celulares, como a produção de citocinas. Ambos os sistemas parecem ser mutuamente regulados, sugerindo que uma aparente regulação positiva ou negativa de diferentes vias e mecanismos esteja associada a uma posterior resposta bem sucedida contra a infecção (Figura 20) (BENTO; EMPADINHAS; MENDES, 2015). Por isso, nosso estudo se mostra pioneiro em pesquisa que visa caracterizar a interação da célula hospedeira com a micobactéria, mais precisamente, com a cepa RD^{Rio}, frente o sistema imune do hospedeiro.

Figura 20: Resposta cruzada entre autofagia e inflamação



Fonte: Adaptado de (BENTO; EMPADINHAS; MENDES, 2015)

A cepa RD^{Rio}, mais prevalente, tanto no Brasil, quanto na cidade do Rio de Janeiro, provoca graves lesões pulmonares e, por conta da alta carga bacilar nos indivíduos infectados, é de fácil disseminação. A patogenia da doença depende da capacidade de sobrevivência da micobactéria no citoplasma do macrófago. Embora quando fagocitado, o bacilo promova o recrutamento de macrófagos e posterior aumento da secreção de IFN- γ e IL-2, indicativo de ativação linfocitária (HERZMANN et al., 2017), já foi demonstrado que a cepa RD^{Rio} de *Mtb* apresentam deleções em seu genoma que desfavorecem a resposta imune do hospedeiro ao diminuírem a capacidade de reconhecimento imunológico do mesmo e aumentar (antígenos de superfície (PPE55 e PPE56) a sua patogenicidade pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (deleção no

gene pks15/1) (CONSTANT et al., 2002; LAZZARINI et al., 2007, 2008). Com isso, é observada uma diferente taxa de ativação de autofagia entre as diferentes cepas de Mtb pela redução da atividade pró-inflamatória (ROMAGNOLI et al., 2018b).

Durante o estágio de imunidade inata, a pouca restrição de crescimento bacteriano no pulmão leva a expansão dessa população que atinge subconjuntos de células a serem infectadas (ERNST, 2012). Algumas cepas de TB, além da Mtb, como *M. bovis* e o *M. leprae* possuem a capacidade de se evadir do sistema de *killing* do hospedeiro e permanecer em circulação. Livres de intervenção do sistema imune, o que pode aumentar a sinalização para o processo de autofagia, a cepa RD^{Rio} é capaz de promover doença grave com cavitações pulmonares. Portanto, nossa hipótese é que este processo está ligado à modulação da indução de autofagia em macrófagos.

Uma modulação negativa da cinética de ativação do processo autofágico pode ser associada à reprogramação dos macrófagos hospedeiros de Mtb. Após instalado nos macrófagos, Mtb ativa mTOR, aumenta o nível de gotículas de lipídios citoplasmáticas no macrófagos (WEI et al., 2008). Sendo assim, reduz a capacidade autofágica dos macrófagos como uma forma de burlar sua eliminação e manter sua permanência intracelular (SINGH et al., 2012).

Já foi demonstrado em estudos anteriores que a cepa padrão H37Rv, utilizada em ensaios imunológicos para Mtb, possui um alto grau de variação na sequência genética em relação a um grande painel de isolados clínicos de Mtb (FLEISCHMANN et al., 2002). Logo, o estudo da interação específica entre a cepa RD^{Rio} e a célula hospedeira pretende ampliar a gama de conhecimentos sobre a cepa de maior circulação no Brasil e sua estratégia de modulação da autofagia. Paralelamente, procura-se entender se, após os mais de 20 anos de circulação, houve mutações que pudessem alterar a capacidade de resposta inflamatória dessa cepa que justifique sua prevalência com relação às demais cepas. A partir disso, possibilitaremos a ampliação do campo de conhecimento sobre esta cepa e a doença e desenvolvimento de novos tratamentos específicos.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar como os isolados clínicos, de circulação antiga e recente, da cepa RD^{Rio} são capazes de modular o processo de autofagia em macrófagos humanos infectados.

3.1 Objetivos Específicos

Determinar as diferenças de indução de autofagia entre os diferentes isolados clínicos de RD^{Rio}, em macrófagos humanos infectados;

Avaliar a carga bacilar dos diferentes isolados clínicos de RD^{Rio} em macrófagos infectados.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho experimental

Para a padronização de protocolo seguindo as melhores condições de cultivo e estímulo de células, cultura de cepas, carga e tempo de infecção, diversos experimentos foram executados para a então avaliação da ativação de autofagia.

Macrófagos humanos, derivados da linhagem THP-1, foram infectados com cepas de Mtb (3 ou 5) em duas diferentes proporções (MOI 5:1 ou MOI 10:1). A cepa H37Rv foi utilizada como cepa de referência e macrófagos não infectados foram utilizados como controle não-infectado dos experimentos. Foram usados isolados clínicos provenientes de pacientes acometidos por TB 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. Entre os isolados clínicos, a cepa A apresentou baixa homologia (50%) a RD^{Rio} e a cepa P apresentou alta homologia (91%) a RD^{Rio}, enquanto o isolado R apresentou 100% de homologia a cepa RD^{Rio}, o que demonstra circulação desta sub-linhagem no Brasil anos antes da sua identificação. Paralelamente, um isolado de RD^{Rio} de circulação recente foi utilizado nos experimentos como grau de comparação com o isolado de RD^{Rio} de circulação há 20 anos atrás. Este isolado, proveniente de pacientes com tuberculose pulmonar entre 2008 e 2011 foi identificado como 399 e foi cedido pelo Laboratório de Pesquisa em Micobactérias/UFMG. Os macrófagos foram infectados ao longo dos tempos de até 48 ou 120 horas e, após o término de cada tempo de infecção (6, 24, 48, 72, 96 e 120h), foram avaliados aspectos como a carga bacilar e a indução do processo de autofagia. Proteínas totais foram extraídas por Trizol ou solução de lise (1% SDS, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1% inibidor de proteases, pH 8.0) para ensaios posteriores. RNA total e DNA foram extraídos por Trizol ou *mirVana* miRNA Isolation Kit. A carga bacilar, assim como os genes ativos durante o processo de autofagia, foram avaliados por contagem de CFU e por qPCR. A expressão dos genes autofágicos foi avaliada por qPCR.

Os resultados foram obtidos através de 2 experimentos independentes planejados.

5 MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

5.1 Cultura de Cepas de Mtb

Para a padronização de protocolo seguindo as melhores condições de cultura das cepas, diferentes condições foram testadas.

Os isolados clínicos de Mtb foram cultivados em meio Middlebrook 7H9, suplementado com Albumina Dextrose Catalase (OADC, 10%) a 37°C a 5% de CO₂ durante 3-4 semanas, quando foram congeladas a -70°C, em PBS, para posterior uso. Após o congelamento, a carga bacteriana foi mensurada por contagem de CFU para definição da quantidade a ser descongelada e usada no experimento de infecção seguinte. Ou os isolados clínicos de Mtb foram cultivados em meio Middlebrook 7H9, suplementado com Albumina Dextrose Catalase (OADC, 10%) e Tyloxapol 0,25% ou 0,025% à 37°C a 5% de CO₂ durante 15-20 dias, quando atingem a fase exponencial de crescimento, garantindo sua viabilidade para uso nos experimentos. Sempre que a cultura se mostrou entrando em estabilidade de crescimento, foi feita a adição de meio fresco. A carga bacteriana foi mensurada e acompanhada por espectrofotometria, considerando a OD 1 = 1x10⁸ bactérias/ml.

Os isolados foram quantificados por contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Para a contagem de CFU, as micobactérias foram plaqueadas em diluição seriada (fator de 10), e espalhadas em placas de petri com meio de cultura sólido Middlebrook 7H10, suplementado com OADC 10%, a 37°C a 5% de CO₂. De duas a quatro semanas após o crescimento, as colônias foram contadas para quantificação bacteriana.

5.2 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 CO₂. As células foram expandidas e mantidas por passagens sucessivas por duas semanas até atingirem massa necessária 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 2×10^6 , 5×10^5 ou 5×10^3 células/poço, respectivamente, por 48h em meio RPMI completo e 8,1nM, 16,21nM ou 100nM de PMA a 37°C a 5% de CO₂.

5.3 Padronização da ativação de Autofagia em células THP-1

Em placas de 6 poços, células THP-1 foram tratadas com PMA à 8,1nM por 48 horas para diferenciação e ativação de monócitos em macrófagos. Após a ativação dos macrófagos, o meio foi trocado por 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) e as placas foram deixadas em repouso por 48 horas em 37°C a 5% de CO₂. Após, as células foram registradas em fotos para posterior análise de comparação e, então os macrófagos foram estimulados com Rapamicina (0,2ug/ml) e HBSS para simular ambiente de inanição (substituição do meio por 1ml de HBSS) durante 2, 4, 24 e 48 horas. As células não estimuladas foram usadas como controle (meio completo).

Ao longo da estimulação, após o término de cada tempo estipulado, as placas foram fotografadas para posterior análise de comparação, o sobrenadante foi coletado para contagem de células viáveis e não viáveis e as células aderidas foram lisadas com solução de Trizol para isolamento de RNA total, de acordo com as informações do fabricante. As amostras foram congeladas no Trizol e as extrações de RNA total foram realizadas posteriormente.

A partir da extração de RNA dos macrófagos através do protocolo Trizol, e os mRNAs isolados, convertidos em cDNA pela enzima transcriptase reversa GoScript (Sigma), vinte nanogramas do cDNA convertido foram utilizadas em qPCR, pelo método EVA Green, para expressão dos genes e consequente confirmação da presença do processo de autofagia nos macrófagos.

5.4 Experimentos de Infecção com isolados clínicos

Para a padronização de protocolo seguindo as melhores condições de estímulo celular, MOI e tempo de infecção, diversos experimentos foram executados para a avaliação da ativação de autofagia.

Células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos por PMA 8,1nM, 16,21nM ou 100nM em 48h e após o tempo de estímulo, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e a infecção com os isolados clínicos foi feita na proporção MOI 5:1 ou 10:1 em meio RPMI com BSA 5% por 4 horas a 37°C a 5% de CO₂.

Células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos por PMA 5ng/ml ou 100nM em 48h e após o tempo de estímulo, o meio foi trocado por 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) e as placas foram deixadas em repouso por 24 ou 48 horas a 37°C a 5% de CO₂. Após o tempo de repouso, as placas foram infectadas na proporção MOI 10:1 por 4 horas em meio RPMI suplementado com BSA 5% e armazenadas a 37°C a 5% de CO₂. Após os tempos de infecção, as células foram lavadas 1, 3 ou 5 vezes com PBS para retirar bactérias não internalizadas pelos macrófagos, os sobrenadantes foram coletados e congelados e as células aderidas foram lisadas com solução de lise (1% SDS, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1% inibidor de proteases, pH 8.0) referente ao *mirVana* miRNA Isolation Kit ou Trizol seguindo o protocolo de Trizol™ (Invitrogen) para isolamento de DNA, RNA total e proteínas, de acordo com as informações do fabricante.

5.5 Extração de DNA e RNA

Após cada tempo de infecção, as células foram lisadas seguindo o protocolo de Trizol™ (Invitrogen) ou com solução de lise (1% SDS, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1% inibidor de proteases, pH 8.0) referente ao *mirVana* miRNA Isolation Kit para extração e isolamento de DNA e RNA total, e proteínas. DNA e RNA foram quantificados por espectrofotometria através do cálculo de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

5.6 Extração de Proteínas

Após cada tempo de infecção, as células foram lisadas com Trizol, seguindo o protocolo de Trizol™ (Invitrogen), e as proteínas foram extraídas e isoladas pelo método de diálise. Alternativamente, as células foram lisadas com solução de lise (1% SDS, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1% inibidor de proteases, pH 8.0).

5.7 Avaliação da ativação de Autofagia

5.7.1 qPCR

Após infecção, o RNA total das amostras foi extraído pelos métodos Trizol ou mirVana miRNA Isolation Kit e convertido em cDNA pela enzima transcriptase reversa GoScript (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um termociclador Mastercycler (Eppendorf) para avaliação da expressão gênica por ensaios de qPCR.

O cDNA foi utilizado para qPCR por método EVA Green (Fast Evagreen qPCR Master Mix, Biotium) de acordo com as instruções do fabricante. Primers específicos para os genes alvo foram desenhados através da plataforma primer Blast para amplificação específica (LC3, BECLIN-1, ATG3, ATG5, mTOR e RAB7), e a expressão do gene RPL37A foi utilizada como controle interno da quantificação relativa da expressão. Os primers foram utilizados à 3 μ M para amplificação. As placas foram montadas manualmente ou utilizando o robô epMotion 5070 (Eppendorff) e as amostras foram amplificadas no equipamento QuantStudio™ 3 System (ThermoFisher) ou no equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (ThermoFisher). Os resultados de quantificação relativa foram calculados pela fórmula $Q=2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde um controle não-infectado/não-estimulado foi utilizado como base para o cálculo.

5.8 Análise estatística

Os dados foram coletados e armazenados em planilhas do software Excel. Foram realizados testes de análise de variância (ANOVA-two-way) associado ao pós-teste Bonferroni para comparação entre as cepas ao longo dos tempos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). Foi considerado um valor de $p < 0.05$ para significância estatística. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

6 RESULTADOS

6.1 Padronização dos experimentos

Para a padronização de protocolo, diversos experimentos foram executados alterando a concentração de PMA, o MOI e o tempo de infecção, de modo a determinar as condições ideais para avaliação da ativação de autofagia em células THP-1 infectadas com as diferentes cepas de

Mtb. Para isso, foram realizados 5 experimentos apresentados a seguir. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

6.1.1 Análise da Indução de Autofagia em células THP-1

Para confirmar a especificidade dos primers desenhados para os genes alvo LC3-II, ATG3, ATG5, mTOR, RAB7 e BECLIN-1 foi feito um experimento controle de indução de autofagia após a ativação dos macrófagos com os mesmos sendo estimulados com Rapamicina (0,2ug/ml) e HBSS para simular ambiente de inanição (substituição do meio por 1ml de HBSS) durante 2, 4, 24 e 48 horas. As células não estimuladas (meio completo) foram usadas como controle dos grupos Rapamicina e HBSS. Após, respectivamente, as células foram registradas em fotos para posterior análise de comparação.

Após 4 horas, o estímulo com Rapamicina induziu uma maior expressão do gene ATG5 em relação ao controle não estimulado e ao estímulo de inanição ($p < 0.0001$). (Figura 21C).

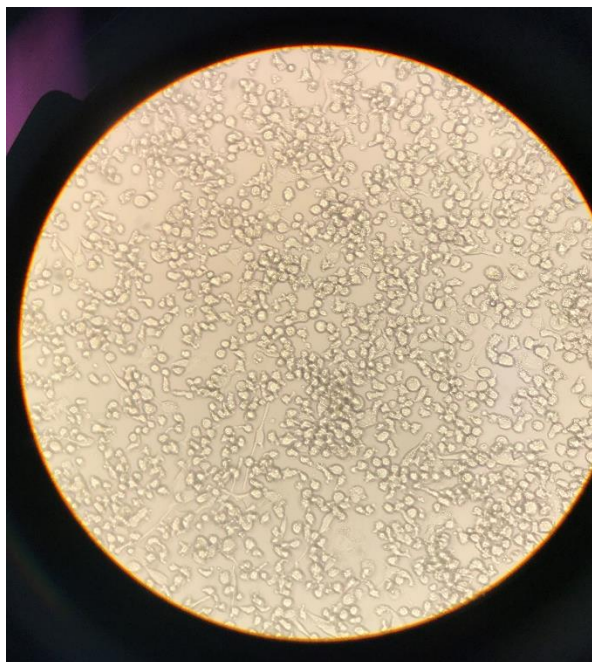
O estímulo com Rapamicina induz uma maior expressão do gene BECLIN1 em relação ao controle não estimulado e ao estímulo de inanição após 4 e 24 horas de infecção ($p < 0.0001$ e $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 21D).

Os registros fotográficos 1, 4, 7 e 10 dizem respeito às células não estimuladas (controle) nos tempos de 2, 4, 24 e 48 horas de estímulo, respectivamente.

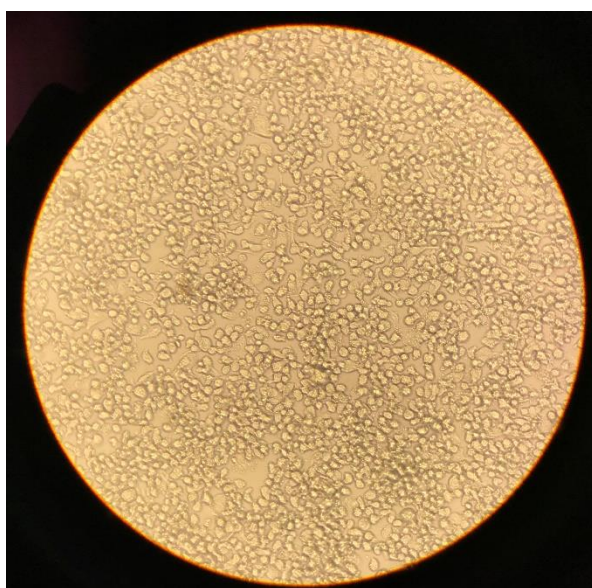
Os registros fotográficos 2, 5, 8 e 11 dizem respeito às células pós-estímulo com Rapamicina 0,2ug/ml nos tempos de 2, 4, 24 e 48 horas de estímulo, respectivamente.

Os registros fotográficos 3, 6, 9 e 12 dizem respeito às células pós-estímulo com HBSS (meio completo) nos tempos de 2, 4, 24 e 48 horas de estímulo, respectivamente.

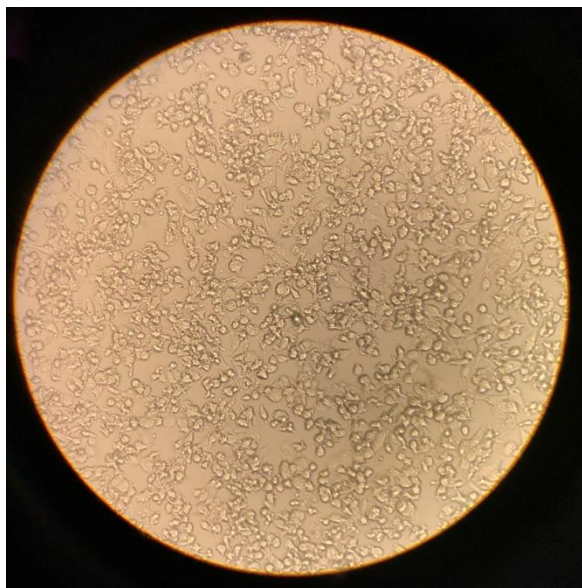
Registro fotográfico 1: Células antes de receberem algum tipo de estímulo em 2 horas



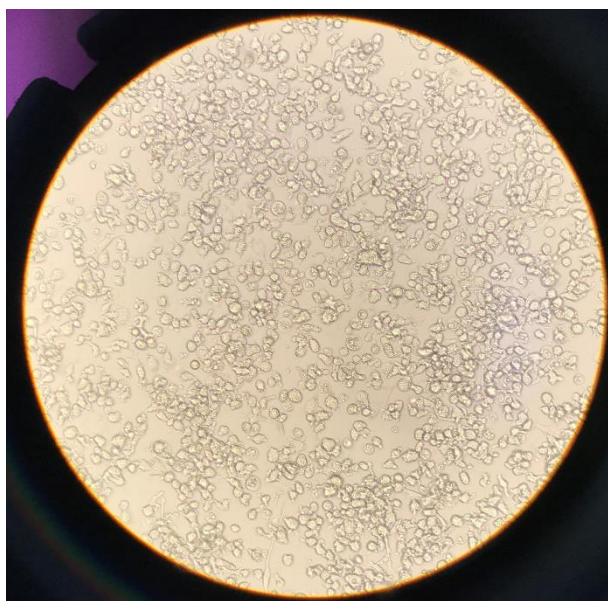
Registro fotográfico 2: Células após o estímulo com Rapamicina em 2 horas



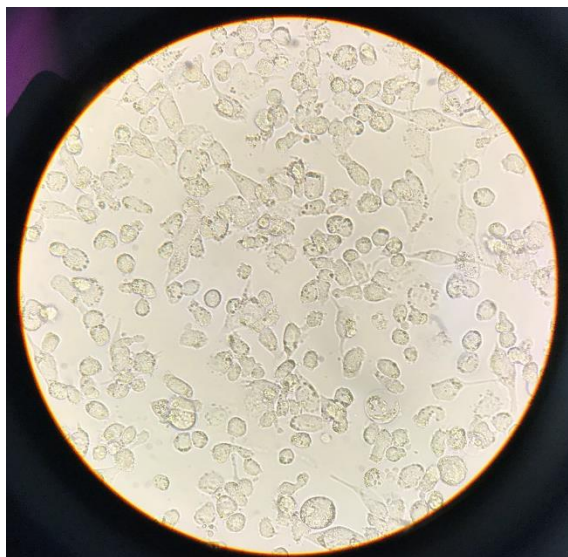
Registro fotográfico 3: Células após estímulo com HBSS em 2 horas



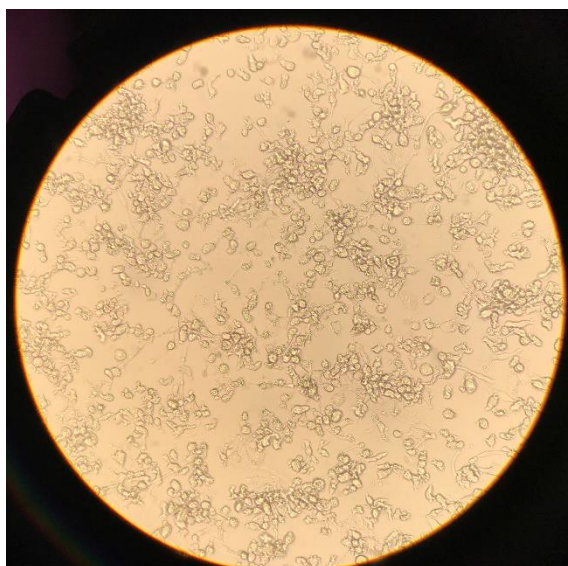
Registro fotográfico 4: Células antes de receber algum tipo de estímulo em 4 horas



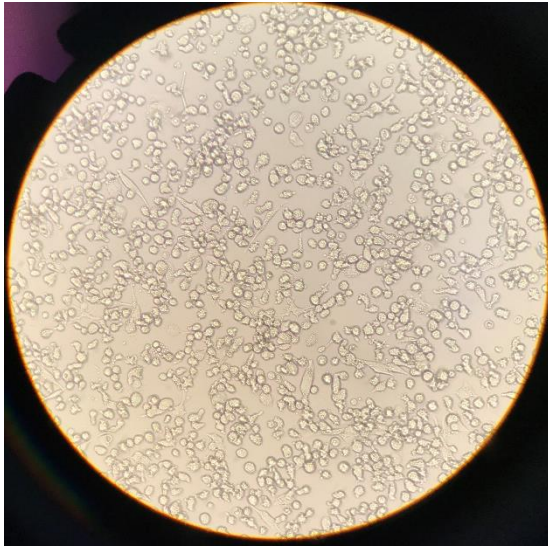
Registro fotográfico 5: Células após estímulo com Rapamicina em 4 horas



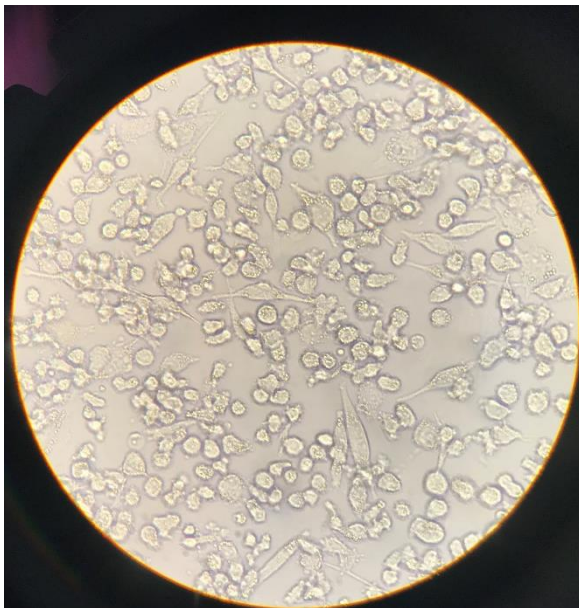
Registro fotográfico 6: Células após receber estímulo com HBSS em 4 horas



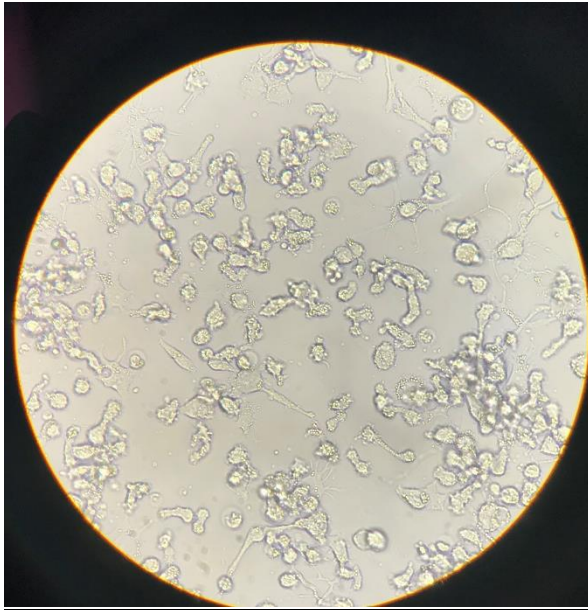
Registro fotográfico 7: Células antes de receber qualquer estímulo em 24 horas



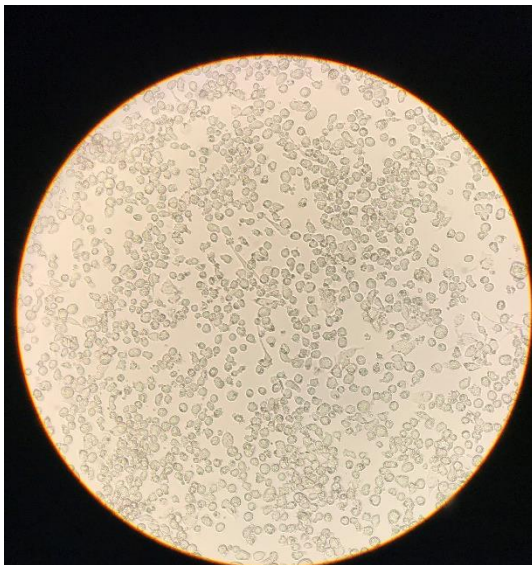
Registro fotográfico 8: Células após receberem estímulo com Rapamicina em 24 horas



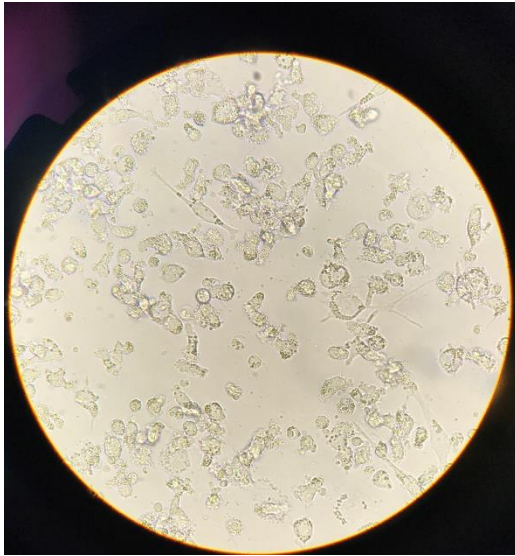
Registro fotográfico 9: Células após receberem estímulo com HBSS em 24 horas



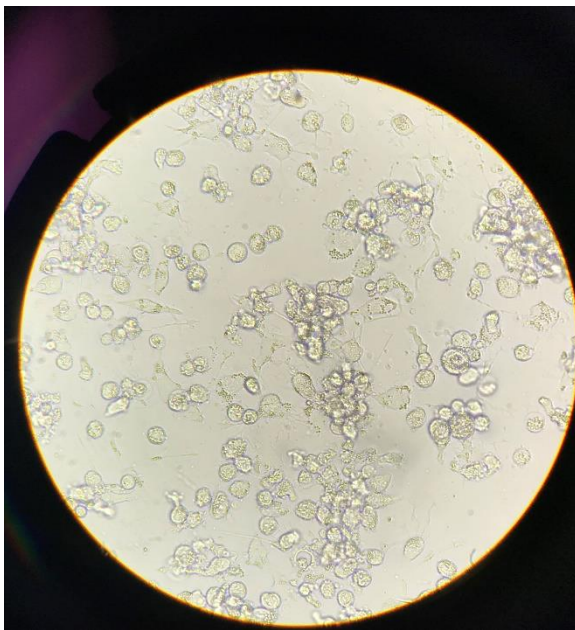
Registro fotográfico 10: Células antes de receber qualquer estímulo em 48 horas



Registro fotográfico 11: Células após receberem estímulo com Rapamicina em 48 horas



Registro fotográfico 12: Células após receberem estímulo com HBSS em 48 horas



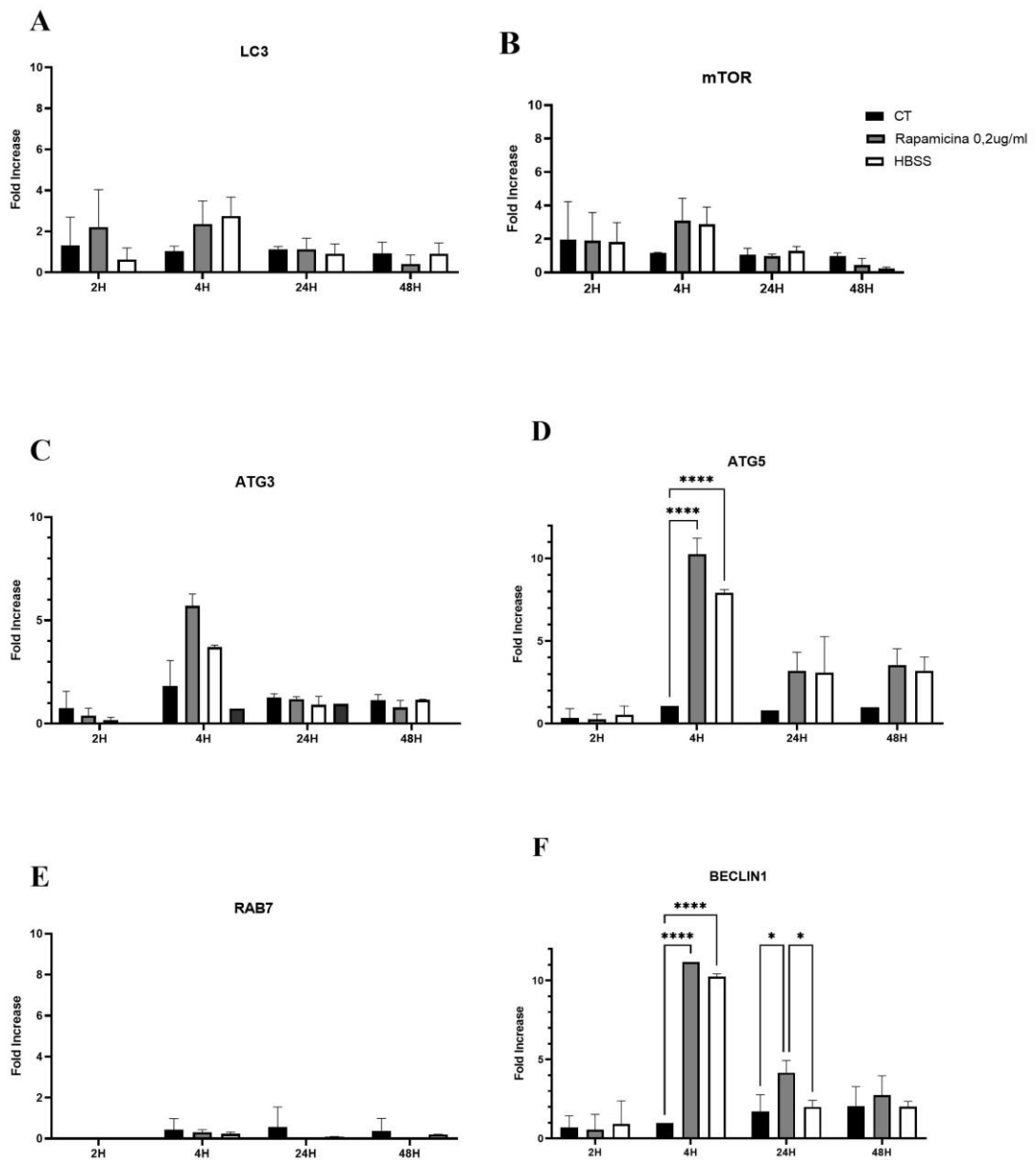


Figura 21- qPCR dos genes LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram tratados com rapamicina (0,2ug/ml) e HBSS para simular ambiente de inanição (substituição do meio por 1ml de HBSS) durante 2, 4, 24 e 48 horas. As células não estimuladas foram usadas como controle (meio completo). A expressão foi normalizada utilizando RPL37A como gene constitutivo. Os resultados foram expressos em relação ao controle não ativado e com média e erro padrão. (*) representam a diferença estatística $p < 0.05$ e (***) representam a diferença estatística $p > 0.0001$. $n = 3$.

6.1.2 Análise da Ativação de Autofagia em células THP-1 pelos isolados clínicos

Para identificar a ativação do processo de autofagia pelas cepas de Mtb, foi feito qPCR dos genes LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN-1 a partir do cDNA das amostras provenientes dos experimentos de infecção.

6.1.2.1 Experimento de infecção 1

Células THP-1 foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços para experimentos de qPCR, e a 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços para experimentos de CFU. As células foram diferenciadas em macrófagos por PMA a 8,1nM durante 48h e, após o tempo de estímulo, as células foram lavadas três vezes com PBS e a infecção com as cepas na concentração MOI 5:1 durante 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os isolados clínicos foram usados após descongelamento (-80°C) no dia da infecção. Inicialmente, foram usados os isolados clínicos A e P como homólogos (50% e 91% de homologia, respectivamente) à cepa RD^{Rio} para comparação entre suas características de infecção, além da cepa H37Rv como cepa padrão e o isolado clínico R-RD^{Rio}, como isolado de circulação antiga. Neste momento, ainda não havia disponibilidade do isolado clínico 399-RD^{Rio} como isolado de circulação recente para comparação entre o perfil do mesmo isolado clínico em relação à época de circulação. Após cada tempo de infecção, foram feitos pools de cada triplicata (totalizando 2×10^6 células) e sua coleta para execução do experimento de CFU no sobrenadante. Sequencialmente, foi feita a lise das células pelo método Trizol para posterior extração de RNA e avaliação da expressão gênica de componentes de autofagia, além da execução do experimento de CFU a partir do lisado celular. Ambas as condições para o experimento de CFU foram feitas em placas de 7H11.

6.1.2.1.1 Quantificação da carga bacteriana por CFU

Sobre a quantificação bacteriana no sobrenadante das células infectadas, após 6 horas de infecção, R-RD^{Rio} promove uma maior carga bacilar em relação à P ($p < 0.0001$) e cepa H37Rv ($p < 0.0001$), porém, é menor do que A- RD^{Rio} ($p < 0.05$). Além disso, A promove uma maior carga bacilar em relação à P ($p < 0.0001$) e H37Rv ($p < 0.0001$) (Figura 22A).

Após 48 horas de infecção, R-RD^{Rio} promove uma menor carga bacilar em relação à A ($p < 0.05$) (Figura 22A). Após 72 horas de infecção, a CFU de R-RD^{Rio} é menor em relação à A ($p < 0.05$) e A promove uma maior CFU em relação à P ($p < 0.01$) e H37Rv ($p < 0.05$) (Figura 22A).

Em 96 horas de infecção, R-RD^{Rio} apresenta menor carga bacilar do que H37Rv ($p<0.01$). Já H37Rv tem um aumento da carga bacilar em relação à P ($p<0.01$) e à A ($p<0.05$) (Figura 22A). Em 120 horas de infecção, R-RD^{Rio} apresenta menor carga bacilar do que A ($p<0.0001$) e A apresenta maior carga bacilar do que H37Rv ($p<0.0001$) (Figura 22A).

Sobre a quantificação bacilar intracelular das células infectadas, após 4 horas de infecção, R-RD^{Rio} e à P apresentam menor carga bacilar do que A ($p<0.05$ e $p<0.01$, respectivamente) (Figura 22B). Tanto em 48, quanto em 72 horas de infecção, R-RD^{Rio} apresenta maior carga bacilar em relação à P e H37Rv ($p<0.01$) e ($p<0.001$ e $p<0.05$, respectivamente). Também em 72 horas, A apresenta maior carga bacilar em relação à P e H37Rv ($p<0.001$ e $p<0.05$, respectivamente) (Figura 22B). Em 96 horas de infecção, A apresenta maior carga bacilar em relação à R-RD^{Rio} e P ($p<0.001$) (Figura 22B). Em 120 horas de infecção, R-RD^{Rio} apresenta maior carga bacilar em relação à H37Rv e P ($p<0.05$ e $p<0.001$, respectivamente) (Figura 22B). Já A apresenta maior carga bacilar em relação à H37Rv e P ($p<0.05$ e $p<0.001$, respectivamente) (Figura 22B).

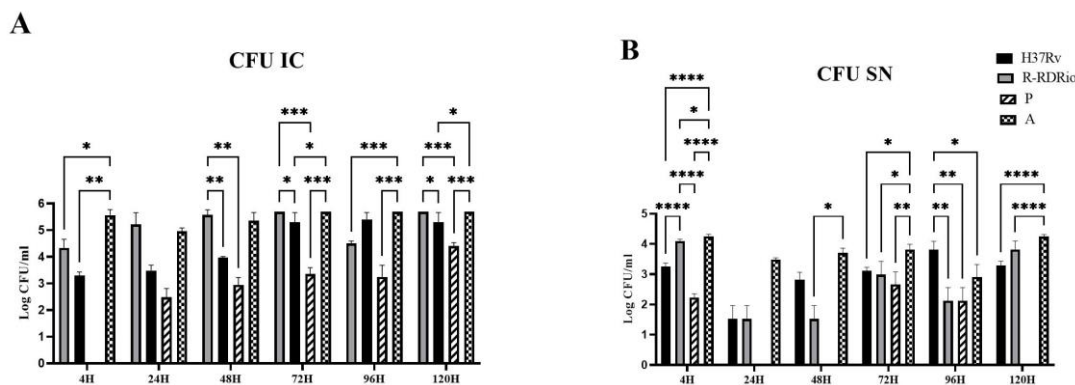


Figura 22- CFU extracelular e intracelular.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio}, A e P e cepa H37Rv (MOI 5:1). (A) Contagem de CFU intracelular (IC) em células THP-1 aderidas lisadas com água e Triton X-100 0,1% após cada tempo de infecção. (B) Contagem de CFU dos sobrenadantes (SN) após cada tempo de infecção. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. (*) representam a diferença estatística $p<0.05$, (**) representam a diferença estatística $p<0.01$, (***) representam a diferença estatística $p<0.001$ e (****) representam a diferença estatística $p<0.0001$. n=3.

6.1.2.1.2 Expressão de genes de autofagia em células THP-1 infectadas com Mtb

Foi avaliada a expressão dos genes autofágicos LC3 mTOR e de amostras pós 6, 24 e 48 horas de infecção. As amostras de 72, 96 e 120 horas não foram utilizadas, pois as células contaminaram ao longo do experimento de infecção.

A expressão de ambos os genes se dá de forma semelhante para todos os isolados clínicos ao longo de toda a infecção, porém, em 48 horas, é possível observar que a infecção pela cepa H37Rv induziu uma maior expressão do gene mTOR em relação ao controle não infectado ($p < 0.05$) (Figura 23B).

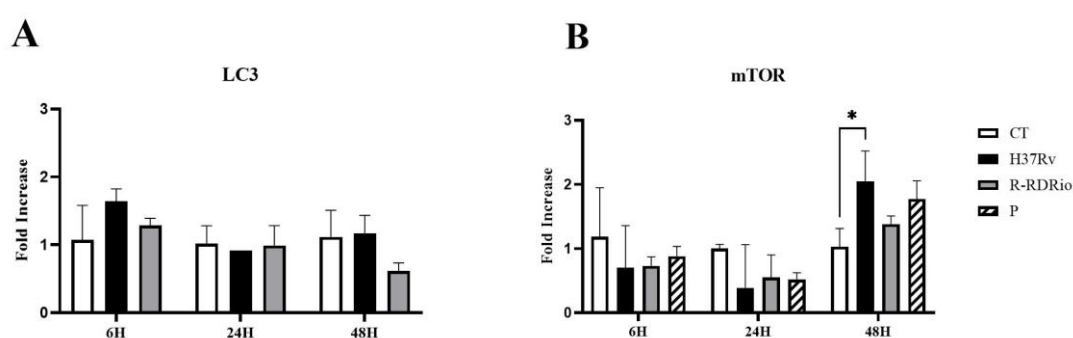


Figura 23- qPCR dos genes autofágicos LC3 e mTOR.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio}, A e P e cepa H37Rv (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 com média e erro padrão. (*) representa a diferença $p < 0.05$. $n = 3$.

6.1.2.2 Experimento de infecção 2

Células THP-1 foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços para experimentos de qPCR. As células foram diferenciadas em macrófagos por PMA a 16,21nM durante 48h e, após o tempo de estímulo, as células foram deixadas em repouso por 24 horas em meio RPMI completo. Após o descanso, as células foram lavadas três vezes com PBS e a infecção com as cepas na concentração MOI 10:1 durante 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os isolados clínicos foram usados após descongelamento (-80°C) no dia da infecção. Inicialmente, foram usados os isolados clínicos A e P como homólogos (50% e 91% de homologia, respectivamente) à cepa RD^{Rio} para comparação entre suas características de infecção, além da cepa H37Rv como cepa padrão e o isolado clínico R-RD^{Rio}, como isolado de circulação antiga. Neste momento, ainda não havia disponibilidade do isolado clínico 399-RD^{Rio} como isolado de circulação recente para

comparação entre o perfil do mesmo isolado clínico em relação à época de circulação. Após cada tempo de infecção, foram feitos três pools de quadruplicatas (totalizando 2×10^6 células/n) para lise das células pelo kit de extração mirVana miRNA Isolation. Não foi possível apresentar experimento de CFU neste momento, pois as micobactérias plaqueadas em diluição seriada não cresceram no meio de cultura proposto, portanto, esses dados ficaram desfalcados.

6.1.2.2.1 Expressão de genes de autofagia em células THP-1 infectadas com Mtb

Foi avaliada a expressão dos genes autofágicos LC3 e mTOR e de amostras pós 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de infecção.

R-RD^{Rio} apresentou uma menor expressão de LC3 em relação ao isolado clínico P nos tempos de infecção de 24, 48, 72 e 120 horas ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$ e $p < 0.05$, respectivamente). Além disso, P apresentou uma maior expressão sob a cepa H37Rv e ao isolado clínico A nos tempos de 48 e 72 horas ($p < 0.0001$; $p < 0.05$ e $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente). Também em 48, 72 e 120 horas de infecção, P apresentou uma maior expressão do gene em relação ao controle não infectado ($p < 0.0001$, $p < 0.01$ e $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 24A).

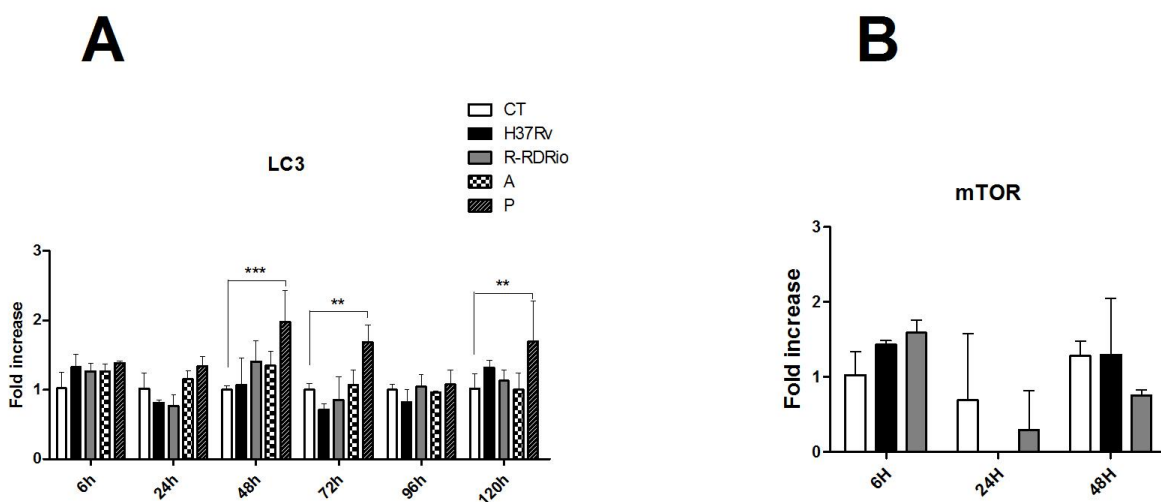


Figura 24- qPCR dos genes autofágicos LC3 e mTOR.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio}, A e P e cepa H37Rv (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 com média e erro padrão. (**) representa a diferença estatística $p < 0.01$ e (***) representa a diferença estatística $p < 0.001$. n=3.

6.1.2.3 Experimento de Infecção 3

Células THP-1 foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços para experimentos de qPCR. As células foram diferenciadas em macrófagos por PMA a 16,21nM durante 48h e, após o tempo de estímulo, as células foram deixadas em repouso por 48 horas em meio RPMI completo. Após o descanso, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e a infecção com os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, além da cepa H37Rv como cepa padrão, na concentração MOI 10:1 durante 6, 24 e 48 horas. Apenas os isolados clínicos que divergem em tempo de circulação foram usados com o objetivo de comparar e diferenciar seu perfil de infecção em relação a essa diferença. Os isolados clínicos foram usados após serem cultivados em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,25% de tyloxapol e terem seu crescimento acompanhado através de comparação visual com escala McFarland. Tais bactérias foram usadas para o experimento de infecção ao atingirem a fase log de crescimento, em, geralmente, 15 dias de cultivo. Para calcular a quantidade de bactérias para realizar o experimento foi coletado 60ul da suspensão para leitura de densidade ótica (OD) por espectrofotometria e o resultado foi incluído na equação da curva da escala McFarland. Após cada tempo de infecção, foram feitos pools de cada triplicata representada por uma quadruplicata (totalizando 2×10^6 células) para lise das células pelo kit de extração mirVana miRNA Isolation. Não foi possível apresentar experimento de CFU neste momento, pois as micobactérias plaqueadas em diluição seriada não cresceram no meio de cultura proposto, portanto, esses dados ficaram desfalcados.

6.1.2.3.1 Expressão de genes de autofagia em células THP-1 infectadas com Mtb

Foi avaliada a expressão dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5 e RAB7 de amostras pós 6, 24 e 48 horas de infecção.

Após 6 horas de infecção, os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} apresentaram menor expressão do gene ATG5 em relação ao controle não infectado ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 25D). De fato, os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} se comportaram de maneira semelhante ao longo da infecção.

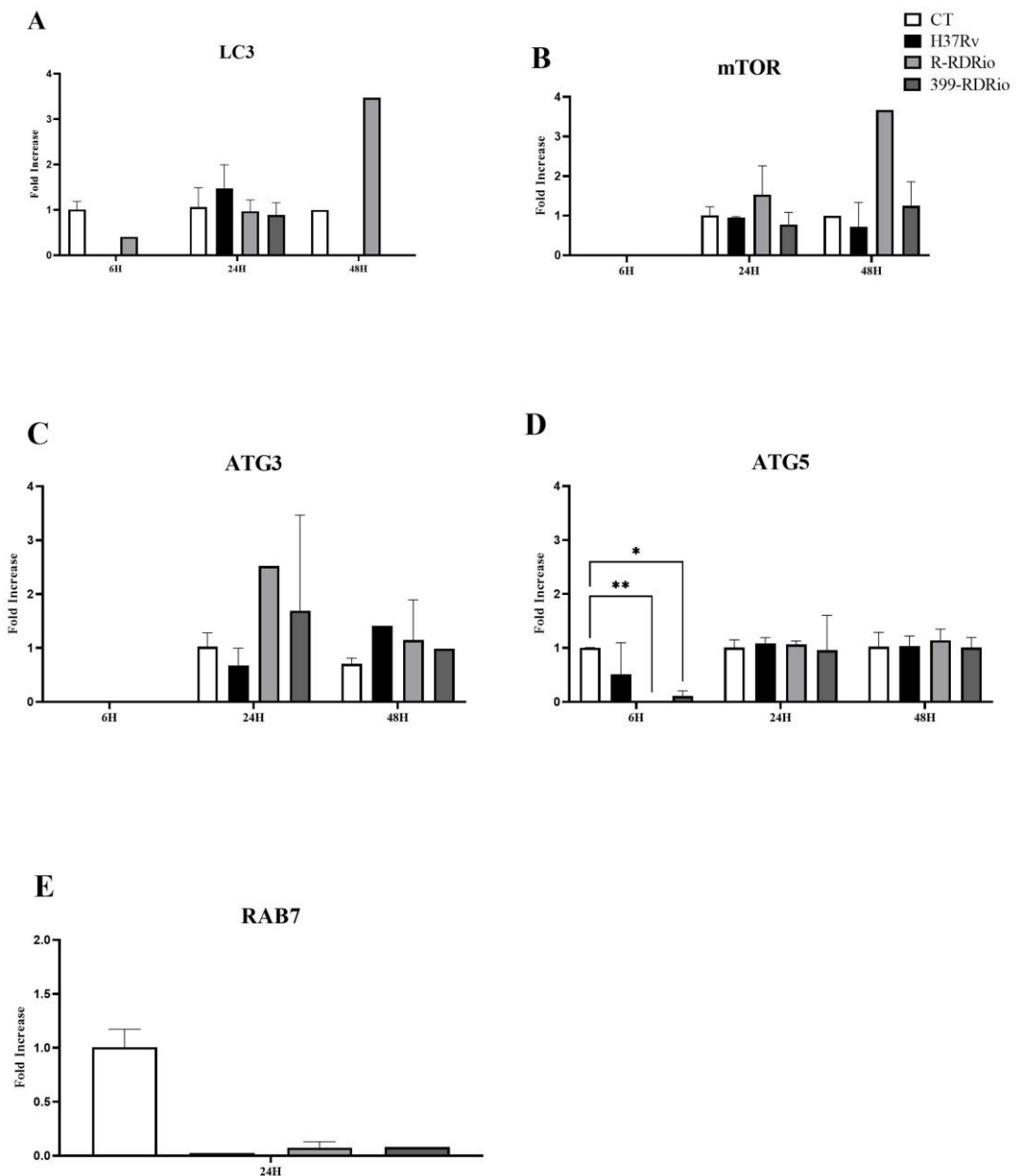


Figura 25- qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5 e RAB7.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} e cepa H37Rv (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 com média e erro padrão. (*) representa a diferença estatística $p < 0.05$ e (**) representa a diferença estatística $p < 0.01$. $n = 3$.

6.1.2.4 Experimento de Infecção 4

Células THP-1 foram plaqueadas a 2×10^6 células/poço em placas de 6 poços para experimentos de qPCR e a 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços para experimentos de CFU.

As células foram diferenciadas em macrófagos por PMA a 100nM durante 48h e, após o tempo de estímulo, as células foram deixadas em repouso por 48 horas em meio RPMI completo. Após o descanso, o meio de cultura das células foi trocado por meio RPMI completo fresco e a infecção foi feita com os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, além da cepa H37Rv como cepa padrão, na concentração MOI 10:1 durante 6, 24 e 48 horas. Apenas os isolados clínicos que divergem em tempo de circulação foram usados com o objetivo de comparar e diferenciar seu perfil de infecção em relação a essa diferença. Os isolados clínicos foram usados após serem cultivados em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,025% de tyloxapol e terem seu crescimento acompanhado através de comparação visual com escala McFarland. Foi adicionado meio de cultura fresco duas vezes por semana. Tais bactérias foram usadas para o experimento de infecção ao atingirem a fase log de crescimento, em, geralmente, 15 dias de cultivo. Para calcular a quantidade de bactérias para realizar o experimento foi coletado 60ul da suspensão para leitura de densidade ótica (OD) por espectrofotometria e o resultado foi incluído na equação da curva da escala McFarland. Após cada tempo de infecção, foram feitos pools de cada triplicata representada por uma quadruplicata (totalizando 2×10^6 células) representando a carga bacilar do sobrenadante para experimento de CFU e, também, lise das células pelo método Trizol para posterior extração de RNA e para execução do experimento de CFU representando a carga bacilar do lisado celular. Ambas as condições para o experimento de CFU foram feitas em placas de 7H10.

6.1.2.4 .1 Quantificação da carga bacteriana por CFU

Por conta de problemas de contaminação, os dados de 399-RD^{Rio} referente ao sobrenadante de 48h pós infecção não puderam ser usados.

Após 4 horas de infecção, 399-RD^{Rio} apresentou uma maior carga bacilar no sobrenadante em relação a R-RD^{Rio} e H37Rv ($p < 0.0001$) (Figura 26A).

As células infectadas com a cepa H37Rv e isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} apresentaram carga bacilar intracelular similar durante todo o período de infecção avaliado.

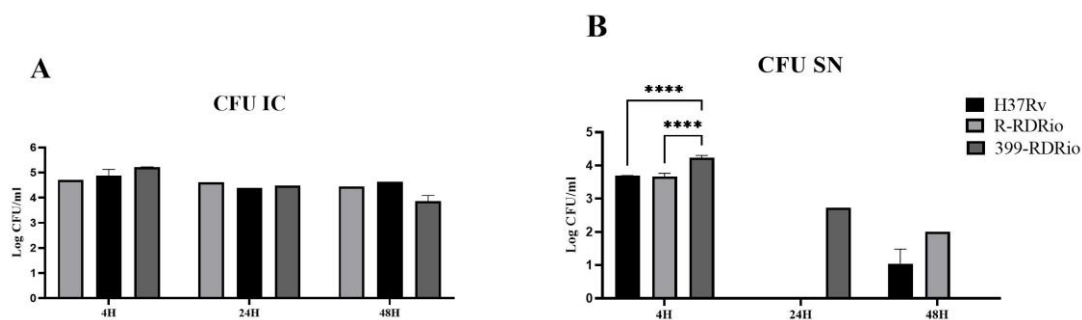


Figura 26- CFU extracelular e intracelular.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, além da cepa H37Rv (MOI 10:1). (A) Contagem de CFU intracelular (IC) em células THP-1 aderidas lisadas com água e SDS 0,1% após cada tempo de infecção. (B) Contagem de CFU dos sobrenadantes (SN) após cada tempo de infecção. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. (****) representam a diferença estatística $p < 0.0001$. $n = 3$.

6.1.2.4 .2 Expressão de genes de autofagia em células THP-1 infectadas com Mtb

Em 48 horas de infecção, R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} aumentam a expressão do gene LC3 em relação às células do controle não infectado ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 27A).

399-RD^{Rio} é capaz de diminuir a expressão do gene ATG3 em relação ao controle não infectado após 6 horas de infecção ($p < 0.05$) (Figura 27C).

R-RD^{Rio} promove queda na expressão do gene ATG5 nos tempos de 6, 24 e 48 horas de infecção quando em comparação às células do controle não infectado ($p < 0.05$, $p < 0.001$ e $p < 0.001$, respectivamente). Além disso, após 6 horas de infecção, R-RD^{Rio} apresenta queda de expressão gênica em relação à 399-RD^{Rio} ($p < 0.01$), porém, 399-RD^{Rio} apresenta aumento em relação à H37Rv ($p < 0.05$). Em 24 horas de infecção, 399-RD^{Rio} e H37Rv demonstram queda sob controle não infectado ($p < 0.0001$ e $p < 0.05$, respectivamente). Após 48 horas de infecção, R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} promovem diminuição da expressão de ATG5 em relação à H37Rv ($p < 0.0001$ e $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 27D).

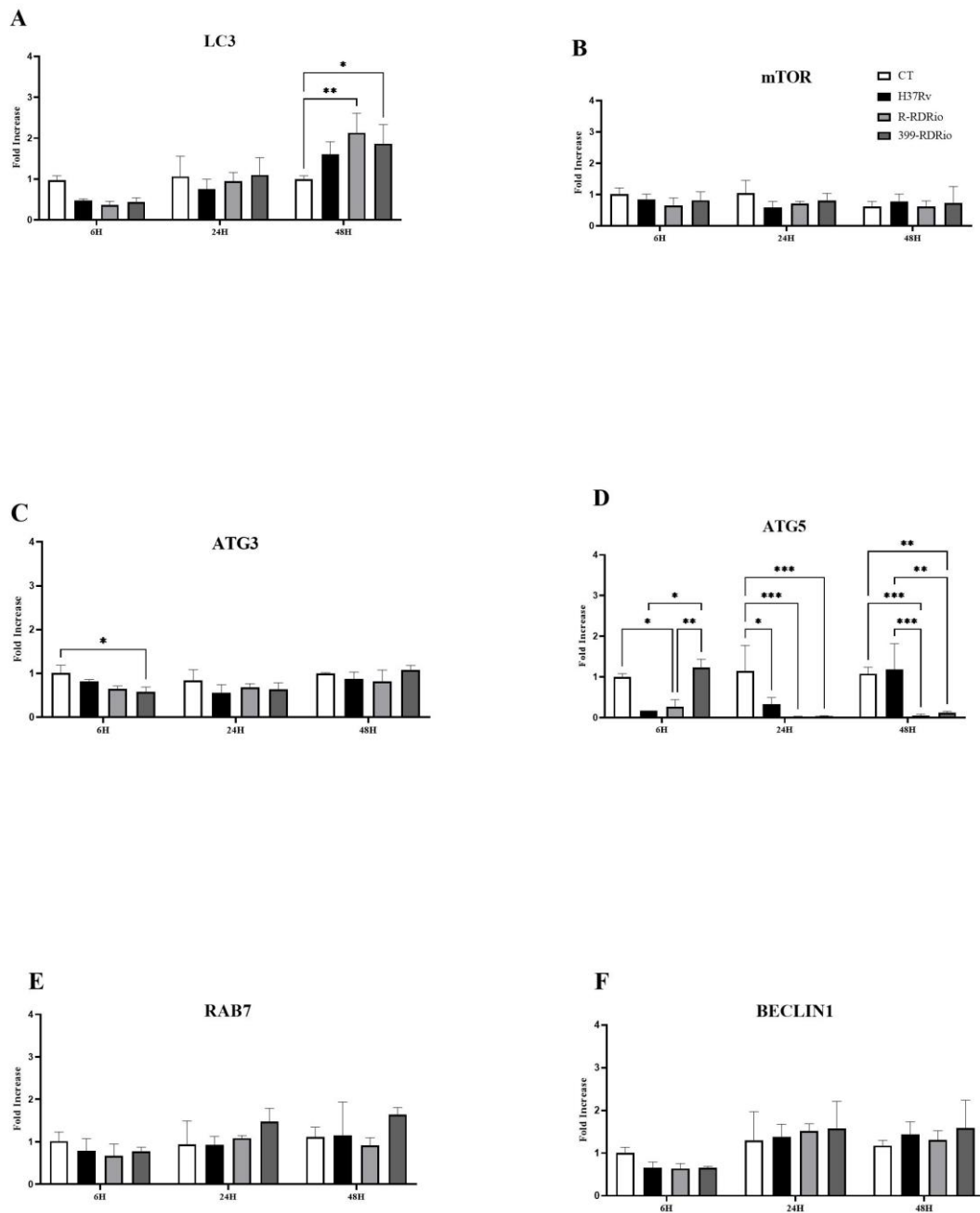


Figura 27- qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} e cepa H37Rv (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 com média e erro padrão. (*) representa a diferença estatística $p < 0.05$, (**) representa a diferença estatística $p < 0.01$ e (***) representa a diferença estatística $p < 0.001$. n=3.

6.1.2.5 Experimento de Infecção 5

Células THP-1 foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços para experimentos de qPCR. As células foram diferenciadas em macrófagos por PMA a 100nM durante 48h e, após o tempo de estímulo, as células foram deixadas em repouso por 48 horas em meio RPMI completo. Tal concentração de PMA foi mantida pois se mostrou ideal para manter as células aderidas às placas, evitando perdas. Ademais, foi comprovado que essa concentração, em conjunto a infecção MOI 10:1, aumenta a eficiência da infecção e consequente melhor análise dos dados. Após o descanso, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e a infecção com os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, além da cepa H37Rv como cepa padrão, na concentração MOI 10:1 durante 6, 24 e 48 horas. Apenas os isolados clínicos que divergem em tempo de circulação foram usados com o objetivo de comparar e diferenciar seu perfil de infecção em relação a essa diferença. Os isolados clínicos foram usados após serem cultivados em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,25% de tyloxapol e terem seu crescimento acompanhado através de comparação visual com escala McFarland. Tais bactérias foram usadas para o experimento de infecção ao atingirem a fase log de crescimento, em, geralmente, 15 dias de cultivo. Para calcular a quantidade de bactérias para realizar o experimento foi coletado 60ul da suspensão para leitura de densidade ótica (OD) por espectrofotometria e o resultado foi incluído na equação da curva da escala McFarland. Após cada tempo de infecção, foram feitos pools de cada triplicata representada por uma quadruplicata (totalizando 2×10^6 células) representando a carga bacilar do sobrenadante para experimento de CFU e, também, lise das células pelo kit de extração mirVana miRNA Isolation para posterior extração de RNA e para execução do experimento de CFU representando a carga bacilar do lisado celular. Ambas as condições para o experimento de CFU foram feitas em placas de 7H10. A partir dos resultados dos experimentos de CFU, concluiu-se que os dois experimentos apresentaram uma taxa de infecção semelhante, sendo este, um resultado representativo de dois experimentos independentes.

6.1.2.5.1 Quantificação de carga bacteriana por CFU

As células infectadas por R-RD^{Rio} apresentaram uma redução da carga bacilar intracelular em relação às células infectadas pela cepa H37Rv em 4 horas de infecção ($p < 0.01$) e, em 24h de infecção, ambos os isolados clínicos apresentaram carga bacilar intracelular similar. Entretanto, em 48 horas de infecção, R-RD^{Rio} promoveu aumento na carga bacilar intracelular em detrimento às células infectadas pela cepa H37Rv ($p < 0.05$) (Figura 28A).

Já a carga bacilar nos sobrenadantes, após 4h de infecção, mostra que R-RD^{Rio} apresentara maior carga bacilar em relação à 399-RD^{Rio} ($p < 0.05$). Já em 48 horas de infecção, os dois isolados clínicos e a cepa H37Rv apresentam carga bacilar semelhante, mas sem apresentar diferença estatística entre eles (Figura 28B).

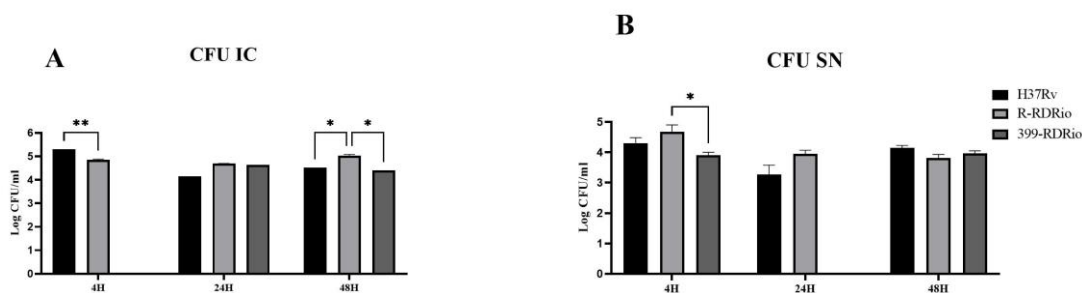


Figura 28- CFU extracelular e intracelular.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, além da cepa H37Rv (MOI 10:1). (A) Contagem de CFU intracelular (IC) em células THP-1 aderidas lisadas com água e SDS 0,1% após cada tempo de infecção. (B) Contagem de CFU dos sobrenadantes (SN) após cada tempo de infecção. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. (*) representam a diferença estatística $p < 0.05$, (**) representam a diferença estatística $p < 0.01$. $n=3$.

6.1.2.5.2 Expressão de genes de autofagia em células THP-1 infectadas com Mtb

Células infectadas por R-RD^{Rio}, após 24 horas de infecção, induziram um aumento na expressão do gene LC3 em relação às células não infectadas do controle ($p < 0.05$) (Figura 29A).

Apesar de não haver diferença significativa, ambos os isolados clínicos apresentaram comportamento similar para a expressão dos demais genes autofágicos.

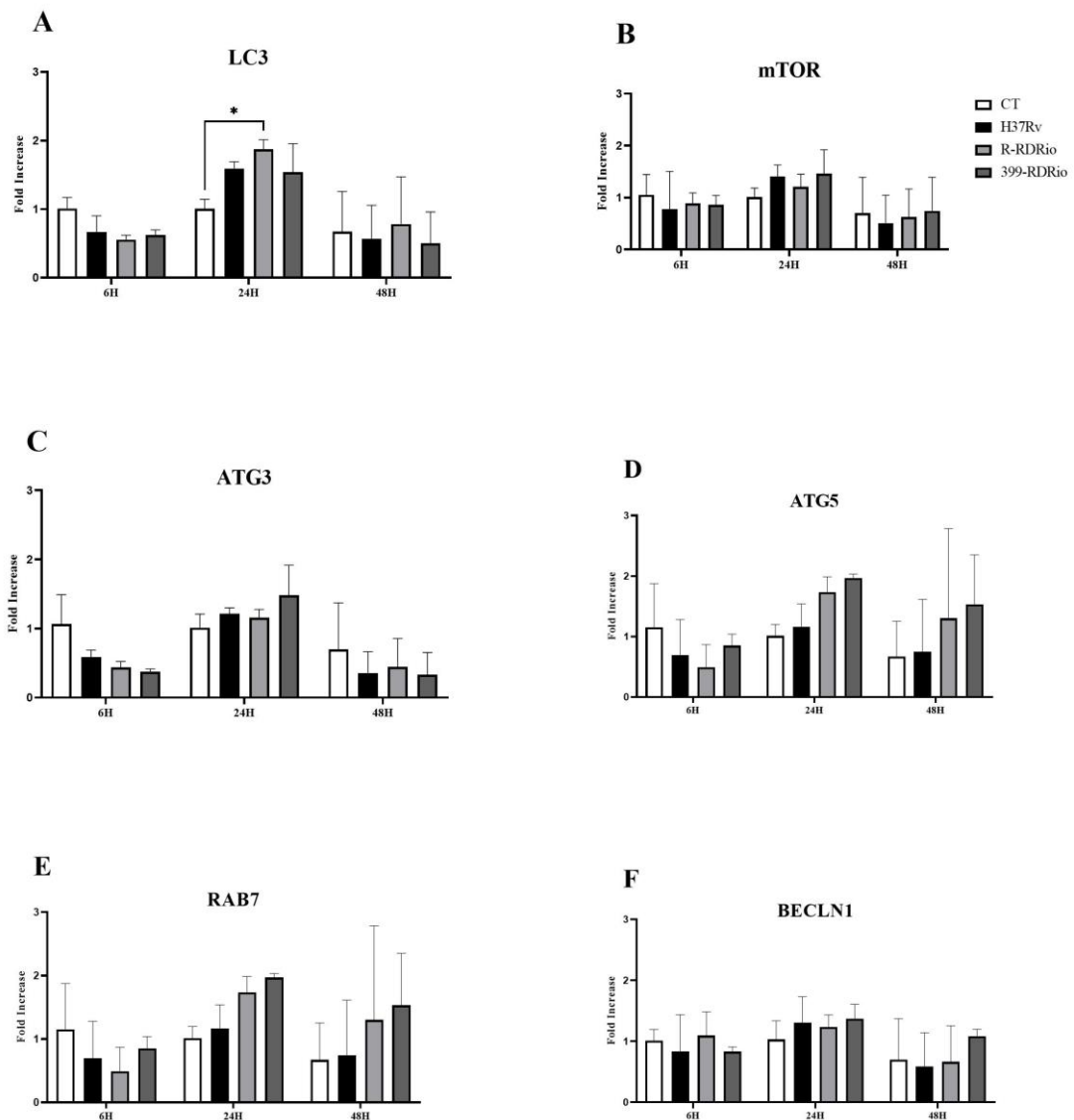


Figura 29- qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} e cepa H37Rv (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 com média e erro padrão. (*) representa a diferença estatística $p < 0.05$. $n = 3$.

6.2 Análise da carga bacilar e capacidade de indução de autofagia em macrófagos

THP-1

Após padronizadas as condições, células THP-1 foram plaqueadas a 5×10^5 células/poço em placas de 24 poços para experimentos de qPCR. As células foram diferenciadas em macrófagos por PMA a 100nM durante 48h e, após o tempo de estímulo, as células foram deixadas em repouso

por 48 horas em meio RPMI completo. Tal concentração de PMA foi mantida pois se mostrou ideal para manter as células aderidas às placas, evitando perdas. Ademais, foi comprovado que essa concentração, em conjunto a infecção MOI 10:1, aumenta a eficiência da infecção e conseqüente melhor análise dos dados. Após o descanso, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e a infecção com os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, além da cepa H37Rv como cepa padrão, na concentração MOI 10:1 durante 6, 24 e 48 horas. Apenas os isolados clínicos que divergem em tempo de circulação foram usados com o objetivo de comparar e diferenciar seu perfil de infecção em relação a essa diferença. Os isolados clínicos foram usados após serem cultivados em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC e 0,25% de tyloxapol e terem seu crescimento acompanhado através de comparação visual com escala McFarland. Tais bactérias foram usadas para o experimento de infecção ao atingirem a fase log de crescimento, em, geralmente, 15 dias de cultivo. Para calcular a quantidade de bactérias para realizar o experimento foi coletado 60ul da suspensão para leitura de densidade ótica (OD) por espectrofotometria e o resultado foi incluído na equação da curva da escala McFarland. Após cada tempo de infecção, foram feitos pools de cada triplicata representada por uma quadruplicata (totalizando 2×10^6 células) representando a carga bacilar do sobrenadante para experimento de CFU e, também, lise das células pelo kit de extração mirVana miRNA Isolation para posterior extração de RNA e para execução do experimento de CFU representando a carga bacilar do lisado celular. Ambas as condições para o experimento de CFU foram feitas em placas de 7H10. A partir dos resultados dos experimentos de CFU, concluiu-se que os dois experimentos apresentaram uma taxa de infecção semelhante, sendo este, um resultado representativo de dois experimentos independentes.

6.2.1 Quantificação da carga bacteriana por CFU

As células infectadas por 399-RD^{Rio} apresentaram um aumento da carga bacilar intracelular em relação às células infectadas pela cepa H37Rv em 24 horas de infecção ($p < 0.01$) e, em 4 e 48 horas de infecção, ambos os isolados clínicos apresentaram carga bacilar intracelular similar (Figura 30A).

Já a carga bacilar nos sobrenadantes, após 4 e 24 horas de infecção, mostra que 399-RD^{Rio} apresentara maior carga bacilar em relação à H37Rv ($p < 0.001$) (Figura 30B). Já em 48 horas de infecção, o isolado clínico R-RD^{Rio} e a cepa H37Rv apresentam carga bacilar semelhante, mas sem

apresentar diferença estatística entre eles e o isolado clínico 399-RD^{Rio} não promoveu crescimento de colônias (Figura 30B).

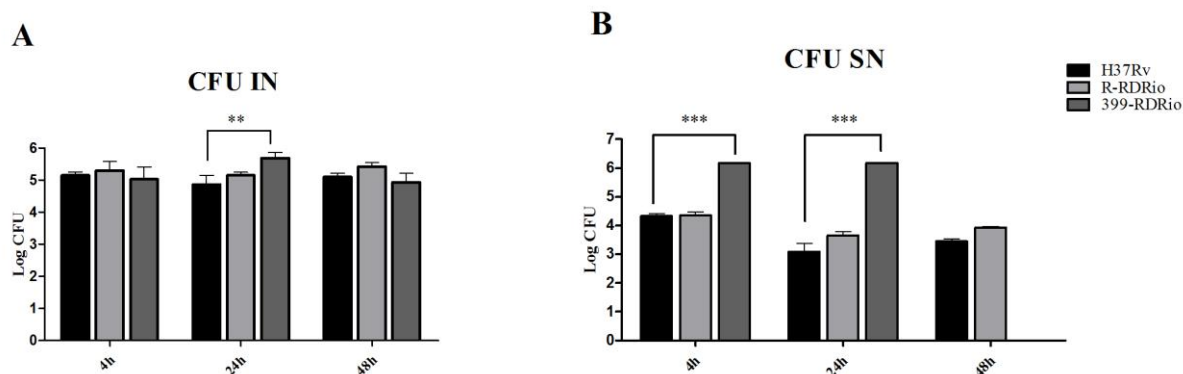


Figura 30: CFU extracelular e intracelular.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, além da cepa H37Rv (MOI 10:1). (A) Contagem de CFU intracelular (IC) em células THP-1 aderidas lisadas com água e SDS 0,1% após cada tempo de infecção. (B) Contagem de CFU dos sobrenadantes (SN) após cada tempo de infecção. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. (**) representam a diferença estatística $p < 0.01$ e (***) representam a diferença estatística $p < 0.001$. $n = 3$.

6.2.2 Expressão de genes de autofagia em células THP-1 infectadas com Mtb

R-RD^{Rio} aumentou o nível de expressão de LC3 em relação à H37Rv e ao controle não infectado ($p < 0.05$ e $p < 0.0001$, respectivamente) e 399-RD^{Rio} aumentou o nível de expressão de LC3 em relação ao controle não infectado ($p < 0.001$) após 48 horas de infecção (Figura 31A).

Em Figura 31C, após 48 horas, R-RD^{Rio} provoca aumento de ATG3 em relação ao controle não infectado ($p < 0.05$).

Em 6 horas de infecção, R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} promoveram queda na expressão de ATG5 em relação ao controle não infectado ($p < 0.05$). Já após 24 horas de infecção, R-RD^{Rio} aumenta ATG5 em relação ao controle não infectado ($p < 0.01$) (Figura 31D).

Apesar de não haver diferença significativa, ambos os isolados clínicos apresentaram comportamento similar para a expressão dos demais genes autofágicos.

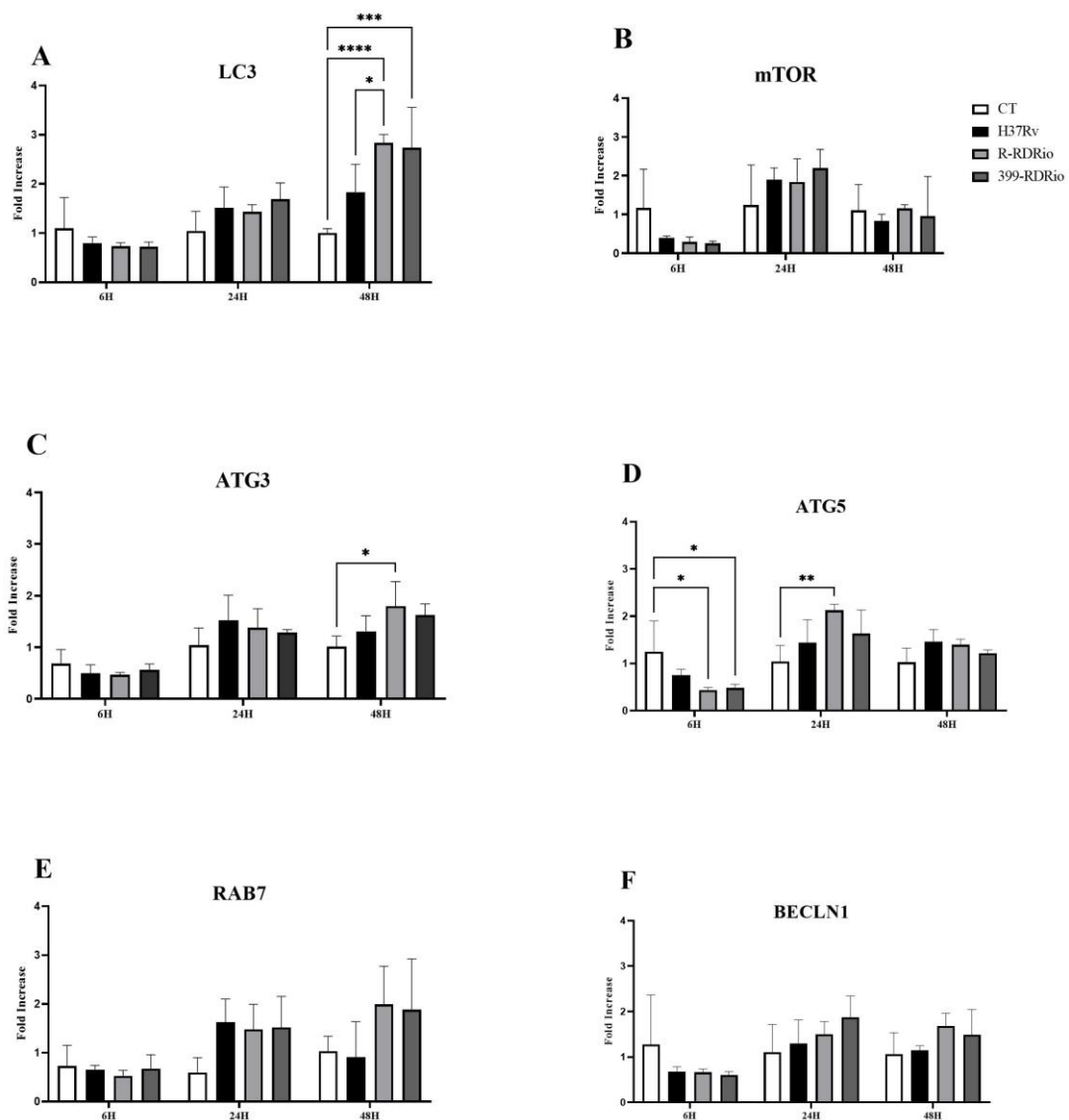


Figura 31: qPCR dos genes autofágicos LC3, mTOR, ATG3, ATG5, RAB7 e BECLIN1.

Macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram infectados pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} e cepa H37Rv (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 com média e erro padrão. (*) representa a diferença estatística $p < 0.05$, (**) representa a diferença estatística $p < 0.01$, (***) representa a diferença estatística $p < 0.001$ e (****) representa a diferença estatística $p < 0.0001$. $n = 3$.

7 DISCUSSÃO

A cepa RD^{Rio} é a cepa de prevalência no Brasil, sendo responsável por 50 a 60% dos casos de tuberculose pulmonar na maioria dos estados (GIBSON et al., 2008). Essa cepa promove uma forma grave da doença com a presença de cavitações pulmonares (GIBSON et al., 2008), responsável pela facilitação da disseminação do bacilo entre a população. Por conta dessa

especificidade da cepa RD^{Rio}, nossa hipótese é de que a indução e ativação de autofagia possa estar relacionada com o sucesso de disseminação desta cepa, uma vez que é sabido que o processo de autofagia é um dos principais modos de eliminação de Mtb do organismo (GUTIERREZ et al., 2004). O diferencial entre demais cepas e a cepa RD^{Rio} se dá em relação à alta carga bacilar da cepa RD^{Rio}, o que possibilita que a doença seja altamente disseminada, tanto a nível indivíduo (largos danos por cavitações), quanto a nível de comunidade (maior número de pessoas contaminadas). Contudo, nosso estudo demonstrou que ambos os isolados clínicos usados da cepa RD^{Rio} se comportam de maneira similar quanto à expressão –e aumento– dos genes autofágicos analisados em relação à cepa padrão de laboratório H37Rv. Além disso, não foi possível fazer a correlação entre autofagia e carga bacilar nos macrófagos infectados com esses isolados de RD^{Rio}. Tal objetivo não pode ser cumprido por conta do corte de ensaios em detrimento de problemas como a instalação de uma pandemia e fechamento do laboratório. A princípio, a infecção perduraria por 120 horas, o que não foi viável. Além disso, seria necessário fazer experimentos de indução de autofagia por deprivação de nutrientes associado à infecção por Mtb por 120 horas para análise quantitativa da morte de bacilos. Como tais ensaios não puderam ser executados, a avaliação da carga bacilar foi feita apenas em nível de observar se o padrão de infecção foi semelhante entre os isolados clínicos. Em contrapartida à importância clínica desta cepa, são existentes apenas estudos epidemiológicos na literatura sobre essa cepa, o que sublinha a necessidade e importância de nosso trabalho de viés imunológico para caracterização da interação macrófago/célula hospedeira-patógeno/ RD^{Rio}.

Macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 são majoritariamente utilizados em trabalhos *in vitro* para analisar as funções de macrófagos, mas ainda não há um protocolo padrão estabelecido. Em seu estudo, (BIRIKEN; YAZIHAN; YILMAZ, 2018b) mostraram que o uso do PMA em doses acima de 32,42nM causa citotoxicidade em células THP-1. Além disso, o uso de PMA para diferenciação de macrófagos pode promover um aumento da ativação dessas células (usadas como controle não infectado) com consequente aumento da resposta pró-inflamatória frente a condições não basais, como o desafio com algum patógeno, tornando a resposta de experimentos seguintes inconclusiva (BIRIKEN; YAZIHAN; YILMAZ, 2018a). Contudo, (PINTO et al., 2020), demonstrou em seu estudo 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. Portanto, inicialmente, nosso grupo testou a ativação desses macrófagos sob diferentes concentrações de PMA e vimos que, sob

uma baixa concentração de PMA (8,1 e 16,21nM), as bactérias possuem uma capacidade infectiva baixa. Porém, sob uma alta concentração de PMA (100ng/mL), as células responderam melhor ao estímulo e puderam ser infectadas em um nível mais elevado. Sendo assim, nossos experimentos seguiram protocolos usando 100ng/mL de PMA por 48 horas com posterior troca de meio e repouso dessas células por mais 48 horas.

Apesar de não observamos diferença na expressão gênica de mTOR, BECLIN-1 e RAB7 entre os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} dentro de cada tempo de infecção avaliado, existem diferenças dependentes do tempo de infecção pelo mesmo isolado clínico, ou seja, a partir da mudança de tempo determinada para cada ponto de análise, diferenças na expressão dos tais genes são observadas entre os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} (dados não mostrados).

A perda completa de BECLIN-1 tem pouco efeito sobre a lipidação de LC3, porém, pode promover uma interrupção do fluxo autofágico (HE et al., 2015). Apesar de R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, em nosso modelo, não modularem a expressão do gene BECLIN-1, há um visível comportamento semelhante de estabilidade no nível de expressão dos demais genes relacionados à autofagia analisados. Além disso, há aumento de BECLIN-1 em 24 horas de infecção para ambos os isolados em comparação ao tempo inicial de 6 horas e, sabendo que esse gene leva à síntese e maturação do autofagossomo, há promoção da cascata de sinalização para expressão dos demais genes da via autofágica, que também apresentaram aumento após 24 horas.

É visto um pico de expressão de mTOR em 24 horas de infecção por R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} e pela cepa H37Rv, em nosso trabalho, que pode ter sido causado por um sistema de controle do fluxo autofágico a partir da mudança de conformação de BECLIN-1, que passa a interagir com RUBICON, apresentado no trabalho de (HE; LEVINE, 2010), ou, por aporte de nutrientes via entrada de AKT e sua fosforilação, o que ativa mTOR, como em dados mostrados nos trabalhos (BACH et al., 2011; INOKI et al., 2002; WANG et al., 2012).

Em nosso estudo, mostramos que os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} modulam a expressão de genes autofágicos, de maneira similar, em comparação à cepa padrão H37Rv. Com isso, entendemos que a diferença de 20 anos em tempo de circulação, entre esses isolados clínicos, não foi suficiente para indicar uma virulência maior de um em detrimento de outro.

No trabalho de (WATSON; MANZANILLO; COX, 2012b) foi mostrado que macrófagos derivados de medula óssea e transgênicos para GFP-LC3 apresentaram, após 2 horas de infecção, uma taxa de 15% de colocalização de bacilos e LC3, seguido por um aumento crescente para 30% dessa taxa em 4 horas de infecção. Sendo assim, nossos resultados, em que

mostramos que os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} aumentam a expressão do gene LC3 em, aproximadamente o dobro com 48 horas de infecção, se mostram de acordo com estudos semelhantes que já foram publicados, porém, são necessários novos e similares ensaios para confirmação de resultado. Dada a importância de LC3 para o processo de autofagia e posterior controle da infecção e degradação de Mtb, supõem-se que LC3 esteja envolvido na resposta imune ao longo da infecção por RD^{Rio}.

Em nosso estudo, mostramos que, no tempo inicial de infecção de 6 horas, R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} diminuíram a expressão de ATG5 em relação ao controle não infectado, o que foi revertido a partir de 24 horas de infecção. Essa baixa expressão de ATG5 também foi vista por (SETO et al., 2013). Neste citado estudo, células dendríticas infectadas por H37Rv ATG5^{-/-} recrutam p62 e ubiquitina para formação do autofagossomo e ativação de células TCD4⁺. Tal recurso pode ser dado por um possível escape de Mtb do fagossomo para o citosol via ESX-1. Além disso, (WATSON; MANZANILLO; COX, 2012a) mostrou que macrófagos derivados de medula óssea deficientes em ATG5 promovem uma sobrevida bacteriana maior em até três vezes por até 24h. Porém, Mtb promove estratégias de escape deste mecanismo e influenciam na modulação do processo de autofagia, aumentando a produção de IL-6 de forma dependente do tempo, impedindo a contenção de bactérias intracelulares já que a produção de IL-6 pelos macrófagos infectados inibe seletivamente a biogênese do autofagossomo, atenuando o complexo ATG12-ATG5 (NAGABHUSHANAM et al., 2003).

Nossos dados mostram um aumento da expressão do gene ATG3 pelo isolado clínico R-RD^{Rio} em 48 horas de infecção, podendo ser associado e ratificado pelos dados mostrados por (CHEN et al., 2021), em que células cerebrais de camundongo deficientes em ATG3 e infectadas por H37Ra de Mtb obtiveram uma maior sobrevida intracelular em relação ao controle, além de uma maior colocalização com RAB7 após 3 dias de infecção.

Nosso trabalho demonstrou, através de contagem de unidades formadoras de colônias, que a carga bacilar, alta no tempo inicial de infecção de 4 horas, promovida pelo isolado clínico R-RD^{Rio}, não se altera significativamente ao longo do tempo de infecção, tanto na forma intracelular quanto no sobrenadante dos macrófagos infectados. Isto pode estar relacionado a resultados obtidos por (STENGER et al., 1997), em que pacientes com baixa capacidade de indução de autofagia, infectados por Mtb, tinham doença mais grave. A partir deste quadro, podemos sugerir que autofagia promove um controle importante do bacilo visto que a sua baixa promove multiplicação dos bacilos, representada pela alta carga bacilar, levando ao aparecimento de

cavitações pulmonares neste tipo de paciente. Também sugere que Mtb desenvolveu contra-estratégias para anular os efeitos antibacterianos da autofagia no hospedeiro. Portanto, é evidente que a autofagia se mostra um importante mecanismo regulado durante a infecção por Mtb e uma melhor compreensão do processo terá maiores implicações no manejo da infecção por TB (LI et al., 2016).

Resultados como o aumento da taxa de expressão de genes autofágicos e a alta taxa de infectividade, que pode levar a morte autofágica pelos isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, hipotetizam não haver diferenças imunogênicas entre elas já que nossos ensaios foram apenas a nível de RNA, o que não revela se há alguma regulação na tradução, nas vias de regulação e nas interações entre proteínas. Portanto, mesmo tendo o controle de partida de taxa de infecção, a expressão gênica não poder ser associada à carga bacilar intracelular, com o agravante de ambos os isolados se mostrarem similares ao longo da infecção.

A cepa RD^{Rio} pode promover o escape para o citosol via ESX-1, permeabilizando a membrana do fagossomo e ativando autofagia pela ubiquitinação de DNA citosólico de Mtb reconhecido por STING do hospedeiro (JUÁREZ et al., 2012). Após essa marcação, receptores p62 encaminham as moléculas para degradação em autofagossomos que irão se fundir a lisossomos (ADIKESAVALU et al., 2021; BENTO; EMPADINHAS; MENDES, 2015; WATSON et al., 2015). Tal processo explicaria a relação entre expressão de genes autofágicos e alta carga bacilar intracelular e posteriormente, no sobrenadante, promovido por RD^{Rio} em nosso trabalho. Entretanto, seriam necessários experimentos para análise de regulação das proteínas LC3 e ESAT-6, além da análise de expressão do gene STING. Também seria importante avaliar o fluxo autofágico por completo para se monitorar e mensurar a atividade autofágica com precisão (GOMES; DIKIC, 2014).

Nosso trabalho, pioneiro na avaliação da interação entre a cepa virulenta RD^{Rio} e a modulação de autofagia, é de extrema importância para completar as lacunas de conhecimento sobre essa cepa e abre portas para o desenvolvimento de novas abordagens para tratamento específico visto que diferentes cepas respondem de diferentes maneiras à diferentes estímulos. Além disso, ilumina a questão de se promover estudos com as cepas circulantes do país, que inclui a cepa RD^{Rio}, de maior circulação no Brasil, mas que também é encontrada em outros continentes.

8 CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho sobre a interação da sub-linhagem RD^{Rio}, especificamente de seus isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio}, com macrófagos de origem humana.

Não existiram diferenças entre os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} que indicasse um favoritismo em relação a virulência, mesmo 399-RD^{Rio} tendo apresentado uma maior carga bacilar nos macrófagos.

Os isolados clínicos R-RD^{Rio} e 399-RD^{Rio} modulam semelhantemente os genes autofágicos em células THP-1 infectadas em relação a cepa padrão de laboratório H37Rv. Ocorre a não modulação na expressão de mTOR, BECLIN-1 e RAB7 e o aumento na expressão de LC3, ATG3 e ATG5.

Portanto, é possível que ambos os isolados clínicos de RD^{Rio} de Mtb, na tentativa de escape do sistema imune do hospedeiro, ajam sobre ATG5 na tentativa de bloquear a via neste ponto, não sendo capazes de modular este sistema a seu favor para permanecer em circulação. Porém, são necessários novos experimentos além da expressão gênica para concluir tais hipóteses.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIKESAVALU, H. et al. Autophagy Induction as a Host-Directed Therapeutic Strategy against Mycobacterium tuberculosis Infection. **Medicina**, v. 57, n. 6, p. 522, 23 maio 2021.

ALMEIDA DA SILVA, P. E.; PALOMINO, J. C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1417–1430, 1 jul. 2011.

BACH, M. et al. The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. **The Biochemical Journal**, v. 440, n. 2, p. 283–291, 1 dez. 2011.

BAH, A. et al. The Lipid Virulence Factors of Mycobacterium tuberculosis Exert Multilayered Control over Autophagy-Related Pathways in Infected Human Macrophages. **Cells**, v. 9, n. 3, p. E666, 9 mar. 2020.

BARBERIS, I. et al. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. E9–E12, mar. 2017.

BENTO, C. F.; EMPADINHAS, N.; MENDES, V. Autophagy in the Fight Against Tuberculosis. **DNA and Cell Biology**, v. 34, n. 4, p. 228–242, 1 abr. 2015.

BIRIKEN, D.; YAZIHAN, N.; YILMAZ, Ş. [Investigation of cytokine and midkine responses of human THP-1 leukemia cells induced by phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) at different concentrations and times]. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 52, n. 2, p. 147–155, abr. 2018.

BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 257, n. 5073, p. 1055–1064, 21 ago. 1992.

BRAY, K. et al. Autophagy Suppresses RIP Kinase-Dependent Necrosis Enabling Survival to mTOR Inhibition. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41831, 26 jul. 2012.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 29–63, 1995.

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, n. 1, p. 23, 6 mar. 2006.

BURGERING, B. M.; COFFER, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. **Nature**, v. 376, n. 6541, p. 599–602, 17 ago. 1995.

CAMBIER, C. J.; FALKOW, S.; RAMAKRISHNAN, L. Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1497–1509, 18 dez. 2014.

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.

CEMMA, M.; BRUMELL, J. H. Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. **Current biology: CB**, v. 22, n. 13, p. R540-545, 10 jul. 2012.

CHEN, X. et al. Distinct Persistence Fate of Mycobacterium tuberculosis in Various Types of Cells. **mSystems**, v. 6, n. 4, p. e00783-21, 17 ago. 2021.

CHEW, L. H.; YIP, C. K. Structural biology of the macroautophagy machinery. **Frontiers in Biology**, v. 9, n. 1, p. 18–34, 1 fev. 2014.

COLLINS, C. A. et al. Atg5-independent sequestration of ubiquitinated mycobacteria. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 5, p. e1000430, maio 2009.

CONSTANT, P. et al. Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the Mycobacterium tuberculosis complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38148–38158, 11 out. 2002.

CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 21, n. 3, p. 142–150, mar. 2010.

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, p. 556, 25 jun. 2019.

DE MARTINO, M. et al. Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, p. 350, 2019.

DERETIC, V. Autophagy in Tuberculosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 11, p. a018481, nov. 2014.

DERETIC, V.; SAITOH, T.; AKIRA, S. Autophagy in infection, inflammation, and immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 10, p. 722–737, out. 2013.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697–714, nov. 2006.

DUTTA, R. K. et al. IL-6 inhibits IFN- γ induced autophagy in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 6, p. 942–954, jun. 2012.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 8, p. 581–591, 13 jul. 2012.

FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-Genome Comparison of Mycobacterium tuberculosis Clinical and Laboratory Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 19, p. 5479–5490, out. 2002.

FLOREZ-MCCLURE, M. L. et al. The p75 Neurotrophin Receptor Can Induce Autophagy and Death of Cerebellar Purkinje Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 19, p. 4498–4509, 12 maio 2004.

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. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240013131>>. Acesso em: 8 out. 2021.

GOMES, L. C.; DIKIC, I. Autophagy in antimicrobial immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 224–233, 24 abr. 2014.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 753–766, 17 dez. 2004.

HALE, A. N. et al. Autophagy: regulation and role in development. **Autophagy**, v. 9, n. 7, p. 951–972, jul. 2013.

HARSTON, R. K. et al. Rapamycin treatment augments both protein ubiquitination and Akt activation in pressure-overloaded rat myocardium. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 5, p. H1696–H1706, maio 2011.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 67–93, 2009.

HE, C.; LEVINE, B. The Beclin 1 interactome. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 140–149, abr. 2010.

- HE, R. et al. Divergent roles of BECN1 in LC3 lipidation and autophagosomal function. **Autophagy**, v. 11, n. 5, p. 740–747, 8 maio 2015.
- HERZMANN, C. et al. Pulmonary immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* in exposed individuals. **PloS One**, v. 12, n. 11, p. e0187882, 2017.
- HILL, S. M.; WROBEL, L.; RUBINSZTEIN, D. C. Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 4, p. 617–629, abr. 2019.
- INOKI, K. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 9, p. 648–657, set. 2002.
- JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS microbiology letters**, v. 123, n. 1–2, p. 11–18, 15 out. 1994.
- JO, E.-K. Autophagy as an innate defense against mycobacteria. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 2, p. 108–118, mar. 2013.
- JUÁREZ, E. et al. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 4, p. 880–889, abr. 2012.
- KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 21, p. 5720–5728, 1 nov. 2000.
- KAPUR, V.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 5, p. 1348–1349, nov. 1994.
- KLIONSKY, D. J. et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Developmental Cell**, v. 5, n. 4, p. 539–545, out. 2003.
- KLIONSKY, D. J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. **Autophagy**, v. 4, n. 6, p. 740–743, ago. 2008.
- KUMAR, A. et al. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, p. e39, 16 dez. 2011.
- 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, 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, jul. 2008.
- LERENA, C.; CALLIGARIS, S. D.; COLOMBO, M. I. Autophagy: for better or for worse, in good times or in bad times. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 92–101, mar. 2008.
- LERNER, T. R.; BOREL, S.; GUTIERREZ, M. G. The innate immune response in human tuberculosis. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1277–1285, set. 2015.

LEVINE, B.; MIZUSHIMA, N.; VIRGIN, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 323–335, 20 jan. 2011.

LI, F. et al. The Defect in Autophagy Induction by Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis Is Correlated with Poor Tuberculosis Outcomes. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0147810, 2016.

MAPHASA, R. E.; MEYER, M.; DUBE, A. The Macrophage Response to Mycobacterium tuberculosis and Opportunities for Autophagy Inducing Nanomedicines for Tuberculosis Therapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 915, 2021.

MARTINEZ, J. et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 7, p. 893–906, jul. 2015.

MCNEIL, M. R.; BRENNAN, P. J. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. **Research in Microbiology**, v. 142, n. 4, p. 451–463, maio 1991.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P. Diagnosis of Tuberculosis in HIV Co-infected Individuals: Current Status, Challenges and Opportunities for the Future. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 2, p. 76–82, ago. 2017.

MIZUSHIMA, N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. **Cell Death and Differentiation**, v. 12 Suppl 2, p. 1535–1541, nov. 2005.

MIZUSHIMA, N.; OHSUMI, Y.; YOSHIMORI, T. Autophagosome formation in mammalian cells. **Cell Structure and Function**, v. 27, n. 6, p. 421–429, dez. 2002.

MORAES, E. B. et al. Tuberculosis associated factors caused by Mycobacterium tuberculosis of the RDRio genotype. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 182–187, mar. 2017.

MURRAY, P. J. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 366–372, set. 1999.

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. **Annual Review of Pathology**, v. 8, p. 105–137, 24 jan. 2013.

NAGABHUSHANAM, V. et al. Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 171, n. 9, p. 4750–4757, 1 nov. 2003.

OHSUMI, Y.; OHSUMI, M.; BABA, M. [Autophagy in yeast]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme**, v. 38, n. 1, p. 46–52, jan. 1993.

PARK, S. H.; BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 788–792, 17 ago. 2000.

- PELLISSARI, D. M. et al. Identifying socioeconomic, epidemiological and operational scenarios for tuberculosis control in Brazil: an ecological study. **BMJ Open**, v. 8, n. 6, p. e018545, 6 jun. 2018.
- PEREIRA, A. G. L. et al. Spatial distribution and socioeconomic context of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista De Saude Publica**, v. 49, p. 48, 2015.
- PILLI, M. et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. **Immunity**, v. 37, n. 2, p. 223–234, 24 ago. 2012.
- 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.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.27.968016v1>>. Acesso em: 8 nov. 2021.
- REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in the eukaryotic cell. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 1, p. 11–21, fev. 2002.
- ROMAGNOLI, A. et al. Clinical isolates of the modern Mycobacterium tuberculosis lineage 4 evade host defense in human macrophages through eluding IL-1 β -induced autophagy. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 624, 24 maio 2018a.
- ROMAGNOLI, A. et al. Clinical isolates of the modern Mycobacterium tuberculosis lineage 4 evade host defense in human macrophages through eluding IL-1 β -induced autophagy. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 24 maio 2018b.
- ROMAO, S.; MÜNZ, C. LC3-associated phagocytosis. **Autophagy**, v. 10, n. 3, p. 526–528, mar. 2014.
- ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 1, jun. 2001.
- RYTER, S. W.; CLOONAN, S. M.; CHOI, A. M. K. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. **Molecules and Cells**, v. 36, n. 1, p. 7–16, jul. 2013.
- SANJURJO, L. et al. The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses. **Autophagy**, v. 11, n. 3, p. 487–502, 2015.
- SCHILLE, S. et al. LC3-associated phagocytosis in microbial pathogenesis. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 308, n. 1, p. 228–236, jan. 2018.
- SCHLUGER, N. W.; ROM, W. N. The host immune response to tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 3 Pt 1, p. 679–691, mar. 1998.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - RJ. **Epidemiological Report - Tuberculosis 2021.** Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021_24.03>. Acesso em: 8 out. 2021.

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, 7 dez. 2004.

SES-RJ. **CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO: TUBERCULOSE NO ESTADO RJ**. Disponível em:

<<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=j%2FgTIADlpqE%3D>>.

Acesso em: 8 out. 2021.

SETO, S. et al. Autophagy adaptor protein p62/SQSTM1 and autophagy-related gene Atg5 mediate autophagosome formation in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in dendritic cells. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e86017, 2013.

SHIN, C. et al. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. **Molecular Cell**, v. 38, n. 6, p. 789–802, 25 jun. 2010.

SINGH, K. K. et al. Immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE55 (Rv3347c) Protein during Incipient and Clinical Tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 5004–5014, ago. 2005.

SINGH, V. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 5, p. 669–681, 15 nov. 2012.

SOARES, R. O. et al. *Mycobacterium tuberculosis* belonging to family LAM and sublineage RD(Rio): common strains in Southern Brazil for over 10 years. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 4, p. 1251–1255, dez. 2013.

STENGER, S. et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5319, p. 1684–1687, 13 jun. 1997a.

STENGER, S. et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5319, p. 1684–1687, 13 jun. 1997b.

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.

TUDDENHAM, W. Glossary of terms for thoracic radiology: recommendations of the Nomenclature Committee of the Fleischner Society. **American Journal of Roentgenology**, v. 143, n. 3, p. 509–517, 1 set. 1984.

URBANOWSKI, M. E. et al. Cavitory tuberculosis: the gateway of disease transmission. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. e117–e128, jun. 2020.

VAN LIMBERGEN, J. et al. Autophagy: from basic science to clinical application. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 4, p. 315–330, jul. 2009.

- WANG, R. C. et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6109, p. 956–959, 16 nov. 2012.
- WATSON, R. O. et al. The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 6, p. 811–819, 10 jun. 2015.
- WATSON, R. O.; MANZANILLO, P. S.; COX, J. S. Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. **Cell**, v. 150, n. 4, p. 803–815, 17 ago. 2012a.
- WATSON, R. O.; MANZANILLO, P. S.; COX, J. S. Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. **Cell**, v. 150, n. 4, p. 803–815, 17 ago. 2012b.
- WEI, M. et al. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 8, p. 605–611, 18 abr. 2000.
- WEI, Y. et al. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. **Molecular Cell**, v. 30, n. 6, p. 678–688, 20 jun. 2008.
- WHITE, E.; MEHNERT, J. M.; CHAN, C. S. Autophagy, Metabolism, and Cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 22, p. 5037–5046, 15 nov. 2015.
- WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–484, 10 fev. 2006.
- XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 1102–1109, out. 2007.
- YOSHII, S. R.; MIZUSHIMA, N. Monitoring and Measuring Autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. E1865, 28 ago. 2017.
- ZHAI, W. et al. The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 340, 15 jan. 2019.