DHÊMERTON SOUZA DE LIMA

Caracterização genética e funcional do inflamassoma na resposta à micobactéria e no desenvolvimento de diferentes formas clínicas de tuberculose pulmonar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências.

São Paulo

2019

DHÊMERTON SOUZA DE LIMA

Caracterização genética e funcional do inflamassoma na resposta à micobactéria e no desenvolvimento de diferentes formas clínicas de tuberculose pulmonar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Pontillo

Versão Original

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

SOUZA DE LIMA, DHEMERSON

Caracterização genética e funcional do
inflamassoma na resposta à micobactéria e no
desenvolvimento de diferentes formas clínicas de
tuberculose pulmonar / DHEMERSON SOUZA DE LIMA;
orientador Alessandra Pontillo. -- São Paulo, 2019.
120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Tuberculose. 2. Inflamassoma. 3. NLRP3. 4.
AIM2. 5. NLRC4. I. Pontillo, Alessandra,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Dhêmerson Souza de Lima

Título da Tese: Caracterização genética e funcional do inflamassoma na resposta à micobactéria e no desenvolvimento de diferentes formas clínicas de tuberculose pulmonar

Orientador (a): Alessandra Pontillo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa a Tese de Doutorado, sessão pública realiza em _____/_____/_____, considerou o (a) candidato (a):

() **Aprovado (a)**

() **Reprovado (a)**

Examinador (a):	Assinatura:.....
	Nome:.....
	Instituição:.....

Examinador (a):	Assinatura:.....
	Nome:.....
	Instituição:.....

Examinador (a):	Assinatura:.....
	Nome:.....
	Instituição:.....

Presidente:	Assinatura:.....
	Nome:.....
	Instituição:.....

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de dezembro de 2015.

PARECER 1266/CEPSH

CAAE: 51780715.8.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Caracterização genética e funcional do inflamassoma na resposta à micobactéria e no desenvolvimento de diferentes formas clínicas de tuberculose pulmonar*" da pesquisadora Profa. Dra. **Alessandra Pontillo**.

Cabe à pesquisadora elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br.

À pesquisadora cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria desta CEP em **14.12.2016**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAULO M. A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Esta tese é dedicada aos meus pais, meus
amigos e a todos os meus professores.

**“NINGUÉM É TÃO GRANDE QUE
NÃO POSSA APRENDER, NEM TÃO
PEQUENO QUE NÃO
POSSA ENSINAR”. ESOPHO**

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por sempre acalantar meu coração e dar força para continuar nos momentos de tribulação e luta.

Quero manifestar minha gratidão às pessoas muito queridas que colaboraram para a concretização desta tese, tornando-o agradável e possível e sempre dando forças para continuar a fazer ciência apesar de todas dificuldades encontrados durante essa jornada de 4 anos, foram dias felizes e também houve momentos triste, mas tudo que passei me tornou uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Arnaldo, e Ray; aos meus irmãos, Emerson, Maria e Maira; por todo o apoio, carinho e amor que me deram, estando sempre ao meu lado nos momentos felizes e tristes. Sou muito grato por te-los

À Professora Doutora Aya Sadahiro e ao Professor Doutor Mauricio Morishi Ogusku, vocês foram essenciais na minha formação.

À Professora Doutora Alessandra Pontillo, pela oportunidade e orientação dessa tese no Laboratório de Imunogenética da Universidade de São Paulo.

À grupo do professora Regina, por ter cedido as cepas, em especial ao Edu que me ajudou no início e ao Caio por ter me passado o treinamento no NB3

Ao professor Mario Hirata por ter permitido a utilização do NB3, possibilitando a execução dos experimentos com as cepas.

À Banca Examinadora do processo de Qualificação, composta pelos doutores: SONIA JANCAR NEGRO (Presidente); SABRINA EPIPHANIO e DENISE MORAIS DA FONSECA, pelas valiosas sugestões e correções.

À família de Imunogenética que durante esses anos tivemos momentos incríveis e inesquecíveis, pelas horas de discussão de resultados e discussão.

Em especial, à Vinicius, uma pessoa incrível que conheci nessa jornada foram 4 anos incríveis e história não falta, você se tornou amigo e irmão, sei que posso contar sempre; à Edi que foi a primeira pessoa que conheci quando mudei pra São Paulo e tem uma mania estranha mas engraçada de anotar minha possíveis “personalidades”, mas sua amizade me deixa feliz; à Jaine uma pessoa que irradia alegria e não há momentos tristes; à Fernanda entramos juntos no lab e se tornou uma grande amiga; à Mari sua passagem foi rápida mas marcante, assim como o Tércio fico feliz por ter conhecido um casal maravilhoso; à Elaine (Japa) com ela sempre terá uma história engraçada pra contar; à Ihonã, misericórdia, inicou cedo no laboratório mas é muito esforçada e dedicada. Todos são especiais realmente é uma família que não importa onde eu esteja, vocês sempre estiveram comigo dentro do meu coração, e claro aguardo vocês na França, vai teia, César.

À Débora (mozi) que nos últimos meses esteve ao meu lado e que diariamente mostra que é a melhor coisa que me aconteceu.

À equipe técnica do Policlínica Cardoso Fontes pelo auxílio e recrutamentos dos pacientes e contatos.

À Mari, pelo suporte na execução dos experimentos em Manaus.

À professora Adriana Malheiro por permitir a utilização do Laboratório em Manaus.

As agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESP e especialmente FAPEAM pelo suporte essencial, pois ciência precisa de investimento.

Tese desenvolvida no laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências Biomédicas, departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, Sob orientação da Profa. Dra. Alessandra Pontillo. Projeto Financiado pela FAPESP e bolsa de doutorado da FAPEAM.

Resumo

O estado de saúde do indivíduo, assim como fatores genéticos, tanto do hospedeiro que do patógeno, contribuem para a resistência a *M.tuberculosis* (Mtb), e também para o estabelecimento de tuberculose (TB) ativa (5-10%) ou latente (>95%). A resposta imune inata foi apontada como uma etapa essencial para determinar o resultado da infecção. As citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18 e o complexo inflamassoma, responsável pela produção delas, foram mostrados indispensáveis pela contenção da replicação bacteriana, pelo menos em modelos experimentais de TB. A hipótese desse trabalho é que a genética do inflamassoma possa afetar a resposta a Mtb, e desta forma explicar, pelo menos em parte, a variabilidade individual no desenvolvimento de TB em seres humanos. Portanto executamos um estudo de associação genética numa coorte caso/controle de TB, e em seguida, uma análise da ativação do inflamassoma em macrófagos humanos primários desafiados com cepas diferentes de Mtb (BCG, H37Rv, Beijing-1471, MP-287/03). Uma variante ganho-de-função no gene do receptor do inflamassoma *NLRP3* (rs10754558 C>G) resultou como fator de proteção contra o desenvolvimento de TB ativa. De acordo, macrófagos de indivíduos carregadores dessa variante controlam melhor a replicação do Mtb produzindo mais IL-1 β . Por outro lado, indivíduos com TB ativa apresentam defeito do *NLRP3* inflamassoma possivelmente relacionado com elevados níveis de IFN- α característicos desses pacientes. Em seguida demonstramos que 2 variantes (*NLRC4* rs473999 C>G, *IL18* rs1834481 A>G) estão associadas a diminuição da produção de IL-18 sendo fatores de risco para formas graves de TB. Por fim, grau de virulência e genética do Mtb afetam a entidade (nível) de ativação do inflamassoma e também o tipo de receptor e citocinas envolvidos na resposta. Em conclusão, o inflamassoma apresenta um papel fundamental no desenvolvimento da TB, e os eixos *NLRP3*/IL-1 β e *NLRC4*/IL-18 medeiam respostas distintas na interação Mtb/hospedeiro. Desta forma polimorfismos nesses genes contribuem pela heterogeneidade observada na resposta ao Mtb.

Palavras-chave: Tuberculose, inflamassoma, IL-1 β , IL-18, *NLRP3*, *NLRC4*

ABSTRACT

The health status of the individual, as well as genetic factors, both of the host and of the pathogen, contribute to resistance to *M. tuberculosis* (Mtb), and also to the establishment of active (5-10%) or latent TB (> 95%). The innate immune response was identified as an essential step in determining the outcome of the infection. The inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 and the inflammatory complex responsible for their production have been shown to be indispensable for the containment of bacterial replication, at least in experimental models of TB. The hypothesis of this work is that the genetics of the inflammasome can affect the response to Mtb, and thus to explain, at least in part, the individual variability in the development of TB in humans. Therefore we performed a genetic association study on a TB case/control cohort, and then an analysis of the activation of inflammasome in primary human macrophages challenged with different strains of Mtb (BCG, H37Rv, Beijing-1471, MP-287/03). A gain-of-function variant in the NLRP3 inflammatory receptor gene (rs10754558 C> G) resulted in a protective factor against the development of active TB. Accordingly, macrophages from carrying individuals of this variant better control the replication of Mtb producing more IL-1 β . On the other hand, individuals with active TB present defect of the inflammatory NRP3 possibly related to high levels of IFN- α characteristic of these patients. We then show that 2 variants (NLRC4 rs473999 C> G, IL18 rs1834481 A> G) are associated with decreased IL-18 production being risk factors for severe forms of TB. Finally, the degree of virulence and genetics of Mtb affect the entity (level) of inflammation activation and also the type of receptor and cytokines involved in the response. In conclusion, inflammasome plays a key role in the development of TB, and the NLRP3 / IL-1 β and NLRC4 / IL-18 axes mediate distinct responses in the Mtb / host interaction. Thus polymorphisms in these genes contribute to the heterogeneity observed in the response to Mtb.

Keywords: Tuberculosis, inflammasome, IL-1 β , IL-18, NLRP3, NLRC4

Sumário

1. HITRODUÇÃO	14
1.1. Tuberculose: um problema ainda atual de saúde pública mundial	15
1.2. <i>M. tuberculosis</i>	300
1.3 TB é uma doença multifatorial.....	301
1.4 Receptor de reconhecimento de padrões (PRRs) e inflamassoma.....	303
1.5 Tuberculose e inflamassoma.....	307
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	30
2.1. Hipótese de trabalho	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1. Aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.....	34
5.2. Casuística para estudo de genotipagem	34
5.3. Extração de DNA genômico e Genotipagem de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do inflamassoma	35
5.4. Casuística para ensaios com células	40
4.3.1 Grupo controle.....	40
4.3.2 Grupo de pacientes com TB pulmonar ativa	40
4.3.3 Grupo de “contatos”	41
5.5. Obtenção de macrófagos diferenciados de monócitos	42
5.6. Ensaio de ativação do inflamassoma	44
5.7. Análise da produção de citocinas, clivagem de caspase-1 e LDH ensaio	45
5.8. Análise da expressão gênica relativa dos componentes do inflamassoma.....	46
5.10. Cultivo e obtenção da micobactéria	48
5.12. Análise estatística dos dados	49
5.1 Contribuição da genética do inflamassoma na susceptibilidade a infecção pelo <i>M. tuberculosis</i>	52
5.2 A cepa virulenta comum de Mtb (H37Rv) ativa de modo significativo o inflamassoma em MDM.....	58
5.3 A ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 β são importantes para controle de crescimento de Mtb em MDM.....	60
5.4 O receptor NLRP3 contribui, pelo menos em parte, para ativação do inflamassoma em MDM desafiados com Mtb	62
5.5 Cepas de <i>M. tuberculosis</i> ativam o inflamassoma nos MDM de modo virulência-dependente.....	68
8. Referências	99
1. Apêndices Padronização do ensaio <i>in vitro</i> de estimulação de macrófagos com micobactéria	118

2.1. Tuberculose: um problema ainda atual de saúde pública mundial

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que afeta geralmente os pulmões. É transmitida pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), ou bacilo de Koch, e representa ainda hoje um grave problema de saúde pública, não obstante a existência de uma vacina profilática constituída por um bacilo atenuado, o bacilo de Calmette e Guérin (BCG) oriundo de *M.bovis* (CALMETTE, 1931).

Provavelmente é a doença infecciosa que mais mortes ocasiona no Brasil. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectado (WHO, 2012;2016(WHO, 2018)), embora nem todos venham a desenvolver a doença. Dos indivíduos infectados apenas 5-10% desenvolvem a TB, enquanto que a maioria dos infectados se comporta como reservatório do bacilo porque não consegue elimina-lo ou destruí-lo, permanecendo assintomáticos, quadro clínico definido como TB latente. Esses indivíduos podem ter uma reativação do foco de infecção e passarão a desenvolver a TB e a ser infectantes (BELLAMY, 1998; SELVARAJ et al., 2008). De acordo com o OMS, acerca de 2 bilhões de pessoas estão com infecção latente e com risco de desenvolvimento da doença (WHO, 2012;2016;2018).

No mundo durante o período de 2017, foram notificados 10,0 milhões de casos novos de TB, com 1,3 milhões de óbitos (WHO, 2018) . No Brasil em 2018, foram diagnosticados 72.788 casos novos de TB, com coeficiente de incidência de 34,8 casos de TB/100.000 habitantes, e 4.534 mil óbitos (BRASIL, 2019) . O Brasil infelizmente, está entre os 30 países priorizados pela OMS que concentram 80% da carga mundial de TB, o que representa 0,9% dos casos estimados no mundo e 33% dos estimados para América do sul, do norte e central (WHO, 2018) . Dentre os estados brasileiros, o Amazonas apresentou, o coeficiente de incidência de 72,9 casos de TB/100.000 habitantes, sendo quase o dobro da média nacional (34,8 casos de TB/100.000 habitantes) ocupando o 1º lugar, seguido pelo Rio de Janeiro e Pernambuco com 66,3 e 47,1 casos de TB/100.000 habitantes, respectivamente, enquanto que São Paulo apresentou 39,6 casos de TB/100.000 habitantes (BRASIL, 2019) . Esse elevado índice facilita a transmissão da doença.

A TB é transmitida principalmente por via aérea, a partir da inalação de gotículas contendo as micobactérias expelidas pela tosse, fala ou espirro de pacientes com a forma pulmonar da doença. A convivência em ambientes com aglomeração de pessoas ou com pacientes com TB ativa, os ambientes fechados e mal ventilados e as más condições sanitárias (i.e.: indivíduos imunodeprimidos, pacientes infectados pelo HIV-1) favorecem o contágio (LAWN; ZUMLA, 2011).

Na primoinfecção, quando *Mtb* é inalado chega aos pulmões onde é reconhecido e fagocitado pelos macrófagos alveolares. A doença evolui quando os macrófagos não conseguem bloquear a replicação da bactéria que rompe a célula em que está fagocitado e provoca uma reação inflamatória muito intensa em vários tecidos a sua volta. O pulmão reage a essa inflamação produzindo muco e surge tosse produtiva. Como o bacilo destrói a estrutura alveolar, formam-se cavernas no tecido pulmonar (cavitação pulmonar) e vasos sanguíneos podem romper-se. Por isso, na tuberculose pulmonar, é frequente a presença de tosse com eliminação de catarro, muco e em alguns casos sangue (hemoptise) (LAWN; ZUMLA, 2011; VARAINE; RICH; GROUZARD, 2014).

Na TB é evidenciado uma estrutura dinâmica e marcante formado de um agregado compacto de células imunes, constituído principalmente por macrófagos em resposta ao um estímulo que persiste sendo denominado de granuloma. O granuloma foi durante muito tempo considerado como uma estrutura protetora do hospedeiro que restringe *Mtb* (RAMAKRISHNAN, 2012).

M Em casos mais graves (e raros), o *Mtb* consegue escapar dos pulmões, invadir a circulação linfática e os linfonodos e se espalhar para outros tecidos/órgãos, acometendo órgãos como olhos e retina (perda parcial ou total da visão), ossos (susceptíveis a fraturas espontâneas), sistema nervoso central, afetando principalmente as meninges, causando fortes dores de cabeça, convulsão e até coma. Essa forma clínica é chamada de TB extra-pulmonar (FURIN; COX; PAI, 2019; ZUMLA et al., 2013).

Os sintomas clássicos da TB são a presença de tosse por mais de duas semanas, produção de catarro, febre (principalmente no período vespertino), sudorese noturna,

cansaço, dor no peito, falta de apetite e emagrecimento. A hemoptise é presente nos casos mais graves (LAWN; ZUMLA, 2011).

O diagnóstico de TB é efetuado a partir da avaliação clínica do paciente (sintomas) e é confirmado pela radiografia do pulmão e análise microbiológica do escarro para detectar o bacilo (baciloscopia) (BRASIL, 2008; WHO, 2018).

Os métodos microbiológicos convencionais compreendem a coleta do escarro, processamento e a coloração da amostra com a técnica de Ziehl-Neelsen que possibilita identificar Mtb, pois possui características tintoriais de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas, sendo então denominados de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), após a coloração é feita a observação de Mtb no microscópio óptico, e/ou a cultura das bactérias para posterior contagem das unidades formantes de colônias (CFU, do inglês “colony coming units”). Apesar de ser considerado o teste padrão ouro, o cultivo do bacilo leva de 6-8 semanas para estar pronto, pois o patógeno apresenta uma taxa de crescimento lento (BRASIL, 2008), portanto não é indicado para um diagnóstico rápido e precoce.

O diagnóstico precoce e rápido é essencial para o controle da TB, especialmente em regiões endêmicas onde a taxa de transmissão é extremamente elevada. Nessas regiões a baciloscopia é amplamente utilizadas, pois é um exame rápido e de baixo custo (ONYEBUJOH; ROOK, 2004). A baciloscopia é disponível no Brasil no sistema de saúde pública (sistema único de saúde, SUS).

Mais recentemente foi introduzido um teste molecular baseado na detecção do material genético (DNA, do inglês “deoxyribonucleic acid”) do Mtb em amostras de escarro através da técnica de PCR em tempo real, com o GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA). Este teste é de rápida execução e muito útil para o diagnóstico precoce (LAWN et al., 2013), no entanto, devido ao elevado custo e a disponibilidade de equipamento específico, a sua execução é limitada em laboratórios microbiológicos especializados. Além disso não é recomendado para os casos que o exame de baciloscopia é negativo, e não pode ser utilizado para os casos de TB extra-pulmonar (DENKINGER et al., 2014; ZEKA; TASBAKAN; CAVUSOGLU, 2011).

O teste intradérmico de Mantoux (teste cutâneo tuberculínico, TST) (NAYAK; ACHARJYA, 2012) é usado no Brasil, nos Estados Unidos e no Canadá, e prevê a injeção intradérmica de derivado protéico bacteriano (PPD, do inglês “Purified protein derivative”) obtido de culturas filtradas e esterilizadas do bacilo, e a observação do resultado na pele (enduração da pele na região do inóculo) após 48-72 horas (BRASIL, 2011). De forma semelhante o mais recente teste de liberação de interferon-gama (IGRA, do inglês “Interferon gamma realease assay”) (PAI et al., 2014), é executado a partir de amostras de sangue coletadas em 3 tubos separados (1mL em cada tubo): tubo Nil (controle negativo, sem estímulos), tubo com os antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 de *Mtb* (tubo teste) e tubo com mitógenos, que serviram para avaliar a capacidade funcional das células T (controle positivo). A concentração de IFN- γ é medida na amostra após 24 horas a 37°C. Ambos os testes baseiam-se na memória imunológica, ou seja a capacidade do sistema imune adaptativo de responder em um prazo menor a uma sucessiva exposição a um antígeno.

Estes testes são utilizados para fins de controle epidemiológico e profilaxia em contactantes (contatos) de pacientes com TB. Em situações específicas, como no contexto da doença em crianças, pode auxiliar no diagnóstico. No entanto, um resultado positivo detecta que houve contato com o bacilo, mas não indica necessariamente a doença ativa, nem se o indivíduo com infecção latente desenvolverá a TB (GETAHUN et al., 2015). Além disso, o TST reage com micobactérias ambientais (falso positivo) (LARSON et al., 2011), e também em indivíduos vacinados com BCG (RICHELDI, 2006). A OMS discorda do desempenho do IGRA em países endêmicos, porque a precisão é muito baixa (WHO, 2011).

Se não tratada adequadamente a TB pulmonar é fonte constante de novas contaminações e é responsável por manter e ou aumentar os números de casos novos da doença (WHO, 2018).

Nos países desenvolvidos onde o diagnóstico é efetuado rapidamente, o tratamento com antibióticos (i.e.: rifampicina, isoniazida, etambutol, piracinamida) por 6-12 meses resolve a infecção, diminuindo a taxa de letalidade e de novas infecções, enfatizando a importância de um diagnóstico precoce e da adesão a um tratamento eficaz para controlar a doença (FURIN et al., 2019; ZUMLA et al., 2013).

Por outro lado, o surgimento de cepa de Mtb resistentes aos antibióticos (i.e.: rifampicina, isoniazida) e de cepas de Mtb associadas a forma grave de TB (assim chamadas, cepas hiper-virulentas) (i.e.: Beijing-1470 e MP-287/03) representam desafios importantes tanto em países desenvolvidos que em desenvolvimento (PARWATI et al., 2010). Além disso, estudos epidemiológicos e estatísticos evidenciaram que a vacina BCG leva a uma maior resistência a infecção por Mtb, mas com uma variabilidade entre as populações e com uma eficácia limitada ao longo do tempo (variável também em populações diferentes) (DYE; FINE, 2013).

Desta forma, está claro que TB representa ainda hoje um grande desafio a ser superado pelo sistema de saúde. E é urgente a necessidade de testes diagnósticos rápidos e de baixo custo assim como de biomarcadores de progressão da forma latente da infecção a doença ativa, preditores de risco de reativação da doença depois da cura .

1.2. *M. tuberculosis*

O agente etiológico mais frequente na TB humana é o *M. tuberculosis*, mas outras bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis-BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii* e *M. Pinnipedii*) podem também causar a infecção (BRASIL, 2008; FORRELLAD et al., 2013). *M. tuberculosis* tem uma membrana rica em lipídeos (principalmente ácido micólico), o que torna as bactérias impermeáveis à coloração de Gram. Por outro lado, conferem as características de resistências descoloração por soluções álcool-ácidas, possibilitando a detecção de BAAR (técnica de Ziehl-Neelsen) (BRASIL, 2008).

A fisiologia do *M. tuberculosis* é altamente aeróbica e exige elevados níveis de oxigênio. Principalmente um agente patogênico do sistema respiratório de mamíferos, Mtb infecta os pulmões. Mtb é um patógeno intracelular obrigatório, aeróbico, que não possui mobilidade e que tem como alvo de infecção os fagócitos (LAWN; ZUMLA, 2011).

Segue uma breve descrição das cepas de Mtb utilizadas nesse trabalho.

BCG é uma cepa oriunda de *M. bovis* que foi atenuada principalmente pelo processo de deleção da região RD1, sendo importante para produção da proteína ESAT-6. Essa cepa é usada para a produção da vacina profilática contra TB (LUCA; MIHAESCU, 2013).

H37Rv é uma cepa de virulência conhecida e desde o seu sequenciamento completo (COLE et al., 1998) foi possibilitado uma melhor compreensão sobre a patogenicidade e quais os fatores de virulência. A cepa H37Rv induz uma resposta próinflamatória e posteriormente produção de IFN- γ (SCHIERLOH et al., 2007).

Beijing é uma linhagem que surgiu de *M. tuberculosis* e foi descrita pela primeira vez em 1995 como cepa oriunda da província de Beijing (por isso o nome para essa bactéria) e atualmente é o genótipo prevalente no Leste e Sudoeste Asiático, África do Sul, e Leste Europeu (EUROPEAN CONCERTED ACTION ON NEW GENERATION GENETIC; TECHNIQUES FOR THE; CONTROL OF, 2006). A cepa está frequentemente associada à TB multidroga resistente (BIFANI et al., 1996; TRACEVSKA et al., 2003), tanto que a baixa taxa de cura da doença e casos de recidivas tem sido associados a essa bactéria (DROBNIEWSKI et al., 2005; LAN et al., 2003).

M. bovis também pode provocar TB no homem, mas essa cepa é o agente etiológico comum em bovinos, isso aumenta o risco de zoonose, principalmente por meio do contato com o gado infectado ou consumo de produtos derivados de animais contaminados, como o leite não pasteurizado (GARNIER et al., 2003). A cepa MP287/03 é um genótipo oriundo de *M. bovis* que induz uma fraca produção de citocinas pro-inflamatórias e tem capacidade de crescer dentro dos macrófagos (ANDRADE et al., 2012).

1.3. TB é uma doença multifatorial

Como já mencionado, apenas uma pequena porcentagem dos indivíduos expostos (5-10%) a bactéria desenvolve a doença ativa. Dentro dos fatores que podem influenciar o risco do indivíduo exposto a Mtb em desenvolver TB estão, o estado de nutricional, a idade, o gênero (homens são mais susceptíveis a TB do que mulheres) (LAWN; ZUMLA, 2011), e fatores genéticos, tanto do hospedeiro (i.e.: *HLA*, *IFNG*, *TNF*, *IL-1R1*) (BELLAMY, 1998;

GOLDFELD, 2004; SALLAKCI et al., 2007), quanto do patógeno (i.e.: ESAT-6,) (HILL, 2001), que afetam a resposta imune contra o Mtb.

Desta forma a TB é hoje considerada uma doença multifactorial, não apenas com relação a resistência ou suscetibilidade a infecção, mas também pela heterogeneidade da apresentação clínica, tendo, dentro das formas de TB ativa, de um lado a doença pulmonar, com maior ou menor contenção da replicação bacteriana (formas paucibacilar e multibacilar, respectivamente), ou com cavitação pulmonar; e do outro, os casos mais graves, onde o patógeno sai dos pulmões e se espalha em outros órgãos e tecidos (ie: ossos, olhos, testículos, pleura), chamados de doença extra-pulmonar (FURIN et al., 2019).

Há um crescente corpo de evidências de que os fatores genéticos contribuem para as diferenças na resposta do hospedeiro às micobactérias (como o *Mycobacterium tuberculosis*), afetando tanto a suscetibilidade à infecção quanto, mais claramente, o padrão da doença clínica. Ambos os estudos de associação de base familiar e estudos de caso-controle foram usados para pesquisar fatores genéticos na TB (BENNETT et al., 2002).

Nos últimos 20 anos, as investigações sobre a suscetibilidade à TB concentraram-se principalmente nos riscos associados a alelos de genes “candidatos” individuais, selecionados com base em sua função, principalmente a resposta imune. Variante genética no gene do receptor do IFN- γ foi identificada como a causa do aumento da suscetibilidade à TB (VALLINOTO et al., 2010). Mutações no gene do receptor de interleucina-12 foram associadas à defesa imune prejudicada contra micobactérias e *Salmonella* em humanos (RAMIREZ-ALEJO; SANTOS-ARGUMEDO, 2014). Esses resultados provaram claramente que algumas vias imunes são importantes e não redundantes na resposta do hospedeiro contra o Mtb.

Uma outra abordagem usada para verificar a susceptibilidade genética à TB, tem sido a de rastrear o genoma humano com marcadores genéticos altamente polimórficos regularmente espaçados para procurar regiões cromossômicas que demonstrem a ligação com a doença. Vários loci foram encontrados em associação com TB através desta abordagem, no entanto, o seu nível de ação e as vias fisiológicas continuam por ser totalmente compreendidas.

1.4. Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e inflamassoma

A resposta imune inata foi apontada como uma etapa essencial para determinar o resultado da infecção pelo Mtb (O'GARRA et al., 2013). Tanto a fagocitose que a destruição (“killing”) da bactéria, assim como a capacidade das células apresentadoras de antígenos de induzir uma resposta imune adaptativa eficaz para o controle e/ou eliminação da bactéria, especificamente guiada pela produção de IFN- γ (COOPER, 2009; FLYNN et al., 1993), dependem da capacidade do sistema imune inato de reconhecer o Mtb e de ativar mecanismos de defesa apropriados.

Estruturas microbianas únicas, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês “Pathogen-Associated Molecular Patterns”) tais como componentes da parede microbiana, toxinas, ácidos nucleicos, sistemas de produção bacterianos, ou moléculas derivadas de células do hospedeiro danificadas, os padrões moleculares associados a dano (DAMPs; do inglês “Damage-Associated Molecular Patterns”), tais como ATP, alarminas, cristais de ácido úrico, proteínas de choque térmico, são reconhecidas pelas células através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês “Pattern Recognizing Receptors”), que induzem a ativação da imunidade inata (inflamatória e/ou antiviral) em resposta ao estímulo.

Os PRRs pertencem a várias famílias proteicas caracterizadas por domínios e estruturas específicas, altamente conservadas filogeneticamente, e com diferente localização celular, podendo ser tanto de membrana, tais como os receptores semelhantes a Toll (TLRs; do inglês “Toll-like receptors”) e receptores lectínicos do tipo C (CLRs, do inglês “C-type lectin receptors”), citosólicos, tais como os receptores semelhantes a RIG-I (RLR; do inglês “*RIG-I*-like receptors”), os receptores PHYN (do inglês “Pyrin and HIN domain-containing protein”) e os receptores NLRs (do inglês “Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat-containing Receptors”) (KATO; TAKAHASHI; FUJITA, 2011; KAWAI; AKIRA, 2011; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs os PRRs ativam uma cascata de sinalização que promove a produção de citocinas, interferons, e outras proteínas pró-inflamatórias ou microbicidas, mediada pelos fatores de transcrição NK-kB e AP1, ou pelos fatores regulatórios de interferons (IRFs) (MARTINON et

al., 2009). Alguns receptores das famílias NLRs e PYHIN ativam um mecanismo de defesa diferente, que é baseado na montagem de um complexo citosólico, denominados de inflamassoma, que medeia a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e IL-18 através de ativação de caspases inflamatórias (LATZ, EICKE, 2010; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002).

O *Mtb* contem múltiplos PAMPs (i.e.: lipoproteínas, ácidos micólicos, Fosfatidilinositol *manosídeo*) e em caso de dano na célula “parasitada”, pode levar a produção de DAMPs (i.e.: ATP), sendo portanto reconhecível pelo sistema imune inato tanto quando o *Mtb* esta no espaço extracelular, como após a fagocitose da bactéria. Por outro lado o *Mtb* co-evoluiu com o hospedeiro e desenvolveu vários fatores de virulência capazes de inibir ou ultrapassar o reconhecimento pelos PRRs e/ou a ativação dos mecanismos de resposta induzidos por eles. O êxito da interação entre hospedeiro e *Mtb* se decide já nesses primeiros momentos.

Os NLRs são caracterizados por dois domínios: o domínio central NBD ou NACHT, que medeia a oligomerização (dependente da ligação com nucleotídeos ATP ou GTP) entre receptores durante a montagem do complexo citosólico, e o domínio C-terminal rico em repetições de leucina (LRR), que interage com o domínio central para estabilizar a forma inativa do receptor. Os NLRs descritos até hoje como capazes de ativar o inflamassoma apresentam na região N-terminal um domínio de recrutamento de caspase (CARD) (subfamília NLRC, do inglês “Receptor CARD domain containing”), tais como o NLRP1 e o NLRC4; um domínio pirínico (PYD) (subfamília NLRP, do inglês “NOD-like receptor Pyrin domain”), ou um domínio BIR (subfamília NLRB, do inglês...), tais como o NAIP. Esses domínios medeiam interações homotípicas com domínios homólogos presentes em outros receptores ou em proteínas da cascata de sinalização (ativação por proximidade). Enquanto os receptores que contem o domínio CARD podem interagir diretamente com a caspase inflamatória, os receptores com domínio PYD interagem com a proteína adaptadora ASC (proteína que contem um domínio PYD e um domínio CARD), que medeia o recrutamento da caspase inflamatória (JIN et al., 2012; LATZ, E.; XIAO; STUTZ, 2013). Por fim o receptor

NAIP, que é caracterizado por um domínio BIR, interage com o receptor NLRC4 para montar o complexo.

Um domínio PYD N-terminal está presente também nos receptores da família PYHIN, tais como AIM2 e IFI16, que desse modo podem recrutar ASC e a caspase inflamatória. Esses receptores apresentam um (no caso do AIM2) ou dois (no caso do IFI16) cópias do domínio que liga DNA (HIN-200) na porção C-terminal (JIN et al., 2012).

Os receptores promovem a montagem do inflamassoma após interação direta com o ligante, como no caso do NAIP com a flagelina bacteriana (DUNCAN; CANNA, 2018), e AIM2 ou IFI16 com o DNA (MONROE et al., 2014; SAIGA et al., 2012); ou indireta, após modificações citosólicas causadas pelo patógeno e/ou dano, como foi descrito pelo NLRP3 (LAMKANFI; DIXIT, 2014). Os principais mecanismos de ativação do NLRP3 compreendem: (1) o efluxo de K⁺ induzido por elevadas concentrações extracelulares de ATP (consequente a dano tecidual e morte celular) mediado pelo canal iônico purinérgico P2X7 (MUNOZ-PLANILLO et al., 2013); (2) a liberação no citosol de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outras moléculas de origem mitocondrial (cardiolipina, DNA mitocondrial oxidado) derivadas da dano as mitocôndrias (IYER et al., 2013; NAKAHIRA et al., 2011; SHIMADA et al., 2012); (3) a liberação no citosol de catepsinas e outro conteúdo lisossomal após ruptura dessas organelas (HORNUNG et al., 2008). Os patógenos podem ativar o NLRP3 através de uma ou mais dessas vias (MUNOZ-PLANILLO et al., 2013).

Uma vez que o(s) receptor(es) são ativados, eles oligomerizam e recrutam a caspase inflamatória e eventualmente a molécula adaptadora ASC levando a montagem do complexo inflamassoma e a ativação da caspase (ativação “canônica” do inflamassoma). Em geral a caspase ativada é a caspase-1, enquanto que as caspases-4 e -5 foram descritas em casos específicos como nos NLRP1 e NLRC4 inflamassomas. A diferença entre a ação das 3 caspases não está bem elucidada, porém acredita-se que possa ser a capacidade de clivar os diferentes substratos, as pro-formas das citocinas IL-1 β e IL-18, e a gasdermina-D (GSDMD), desta forma induzindo principalmente a liberação de citocinas ou a morte celular altamente inflamatória (piroptose) (BROZ, PETER; DIXIT, 2016).

A montagem do inflamassoma pode levar a formação de um agregado perinuclear chamado de “speck” ou “puncta” devido a tendência da proteína ASC de polimerizar em filamentos estrelados que servem como plataformas para o “clustering” da caspase-1. Esses agregados podem ser visualizados por imunofluorescência e microscopia (BROZ, P. et al., 2010; FRANKLIN et al., 2014).

A produção de IL-1 β e IL-18 leva a recrutamento e ativação de leucócitos no local da infecção/dano, e a IL-1 β medeia também os efeitos sistêmicos da inflamação. Ambas as citocinas contribuem para a polarização da resposta imune adaptativa de tipo Th17 e Th1 respectivamente.

Vale também lembrar que as caspases podem também ser ativadas independentemente dos receptores acima mencionados, pela assim chamadas vias “non canônicas”, onde componentes da parede bacteriana, tais como o lipopolisacarídeo (LPS) (HAGAR et al., 2013; KAYAGAKI et al., 2013), presentes no citosol são reconhecidos diretamente pelas enzimas. Ou ainda, receptores lectínicos de membrana, tais como a Dectin-1, através da sinalização mediada da kinase Syk ativaram as caspases sem a necessidade de uma ativação independente de outros receptores citosólicos (GRINGHUIS et al., 2012). A ativação não canônica medeia também a liberação das “alarminas” IL-1 α e HMGB1, levando a amplificação da resposta inflamatória local (BERTHELOOT; LATZ, 2017).

Devido ao potencial dano inflamatório, a ativação do inflamaassoma é estritamente regulada a vários níveis: transcricional (modulação da expressão gênica pelos fatores de transcrição NF- κ B ou IRFs), pós-transcricional (de-ubiquitinação de alguns componentes) e através da interação com moléculas inibitórias, tais como CARD8 que inibe a ativação de NLRP3 (BROZ, PETR; DIXIT, 2016). Foram também reportados mecanismos de “feed-back” negativo, tais como aqueles mediados pelos receptores de IFN ($-I$ e $-II$) (MANGAN et al., 2018).

1.5. Tuberculose e inflamassoma

O Mtb é um patógeno intracelular capaz de sobreviver e replicar no fagossomo graças a fatores de virulência (i.e. reprogramação transcricional, baixo metabolismo) e o recrutamento da proteína coronina-1 que inibem a fusão do fagossomo com os lisossomos e/ou os mecanismos bactericidas (ZHAI et al., 2019). Desta forma a bactéria não entraria em contato com os receptores citosólicos, porém foi demonstrado, pelo menos em modelo experimental de TB, que durante a infecção por Mtb que o inflamassoma é ativado (DORHOI et al., 2012).

Camundongos deficientes em IL-1 β , no receptor da IL-1 (IL-1R), ou IL-18 são mais suscetíveis a infecção por *M.tb* sugerindo um papel importante do inflamassoma na defesa do hospedeiro contra esse patógeno (FREMOND et al., 2007; MAYER-BARBER et al., 2010; SUGAWARA et al., 1999).

Essas evidências podem ser explicadas, considerando que a IL-1 β aumenta a fusão fagolisossômica, facilitando a ação dos mecanismos microbicidas sobre a bactéria fagocitada, e conseqüentemente controla a replicação do Mtb e a carga bacteriana (MASTER et al., 2008). MAYER-BARBER et al. (2014) demonstraram que a IL-1 β confere resistência ao hospedeiro contra o Mtb, sendo que o patógeno leva ao aumento de IL-1 β e essa citocina leva ao desencadeamento da PGE2, e PGE2 limita a produção do IFN do tipo I (MANGAN et al., 2018).

A função da IL-18 na infecção por Mtb ainda não está bem esclarecida. Porém, levando em conta que a IL-18 contribui para a polarização dos linfócitos T CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ , citocina importante pela resposta imune celular e eliminação de patógenos intracelulares (NAKANISHI; TSUTSUI; YOSHIMOTO, 2010) e especificamente de Mtb, estima-se que possa desenvolver um papel importante junto com a IL-12 na indução da resposta mediada por IFN- γ .

Quanto aos receptores e mecanismos envolvidos na ativação do inflamassoma por Mtb, foi demonstrado que o Mtb induz a produção de IL-1 β através do NLRP3 inflamassoma (ABDALLA et al., 2012), que seria ativado durante o escape da bactéria do fagolisossoma e a conseqüente liberação de catepsinas lisossomiais (AMARAL, E. P. et al., 2018), ou pela

liberação de ROS (ABAIS et al., 2015). Por outro lado, a participação do efluxo de K⁺ e do P2X7 na ativação do NLRP3 pelo Mtb é controversa, sendo que alguns autores demonstraram a independência da presença do P2X7 (ABDALLA et al., 2012; DORHOI, ANCA et al., 2012), enquanto que outros mostraram uma menor capacidade de responder a Mtb dos animais deficientes de P2X7 (AMARAL, EDUARDO P. et al., 2014). De acordo com variantes genéticas que levam a perda de função de P2X7 foram associadas a aumento do risco de desenvolver TB ativa (FERNANDO et al., 2005; SHEMON et al., 2006).

A suportes dos dados obtidos em modelos de TB experimental, EKLUND et al. (2014) demonstraram que macrófagos humanos de indivíduos carregadores de uma variante genética rara que leva a ganho-de-função do NLRP3 (p.Q705) e a uma consequente maior produção de IL-1 β quando comparado ao receptor selvagem, conseguem controlar melhor a replicação de Mtb em ensaios de cultivo do bacilo *in vitro*.

A contribuição de outros receptores do inflamassoma na resposta a Mtb é ainda pouco clara. O NLRC4 foi considerado dispensável pela ativação do inflamassoma em modelo experimental de TB (ABDALLA et al., 2012; DORHOI et al., 2012), com exceção do trabalho de MASTER et al. (2008) que mostrou que o NLRC4 contribui para a contenção de Mtb em macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDM). Mais recentemente o AIM2 foi também levado em consideração como possível receptor na resposta a Mtb, em modelo experimental de TB (SAIGA et al., 2012).

É interessante destacar que o inflamassoma e sobretudo a liberação massiva de IL-1 β podem também contribuir para o dano pulmonar associado a infecção pelo Mtb, como observado em modelo experimental de TB grave (MISHRA et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Considerando a participação do NLRP3 na infecção pelo Mtb, estão de acordo os dados de menor patologia pulmonar (carga bacteriana, necrose, infiltrado leucocitário) em camundongos deficientes de P2X7 e infectados por cepas hipervirulentas Beijing-1471 e MP-287/03 comparados com camundongos selvagens (AMARAL, EDUARDO P. et al., 2014).

Ao contrário em seres humanos, foi observado que pacientes com diabetes de tipo 2 e TB tem a produção de IL-1 β reduzida, e isso está associado com a gravidade da doença

(CHAO et al., 2015). Os principais mecanismos de ativação do inflamassoma conhecidos até hoje estão resumidos na **Figura 1**.

Figure 1 - Mecanismos de ativação inflamassoma por Mtb.

O Mtb e o LPS são reconhecidos pelo Receptor de Reconhecimento de Patógenos (PRR) e induzem a expressão dos componentes do inflamassoma através da via NF-κB e dos interferões tipo 1 (IFN-I) pela via das IRFs. O Mtb fagocitado pode escapar para o citosol danificando o fagolisossomo e levando à liberação da catepsina-B lisossômica (CTSB). O CTSB ativa o inflamassoma NLRP3 e a consequente produção de IL-1β e IL-18. Possivelmente outros mecanismos (??), independente de NLRP3, estão envolvidos na ativação do inflamassoma. O aumento do ATP extracelular ativa o receptor purinérgico P2X7, permitindo o efluxo de K⁺, que ativa o NLRP3 na MDM tratada com LPS, mas não na MDM tratada com Mtb.

Até o momento o conhecimento sobre o envolvimento do inflamassoma e de receptores específicos na resposta a Mtb em seres humanos é muito limitado (EKLUND et al., 2014; FERNANDO et al., 2005; MAYER-BARBER et al., 2014; SHEMON et al., 2006), e ao mesmo tempo, os dados procedentes de modelos experimentais de TB (camundongos, mas também cobaias, coelhos, macacos e peixes-zebra,) devem ser interpretados com cuidado pois não mimetizam completamente a TB humana (CASANOVA; ABEL, 2004; KRAMNIK;

BEAMER, 2016). Por exemplo, a cavitação pulmonar, uma característica importante para a transmissão da TB em humanos (VILAPLANA; CARDONA, 2014), não é observada em modelo experimental (FONSECA et al., 2017; ORME, 2003). Além disso, é possível observar resultados diferentes frente a infecção por Mtb dependendo das cepas de camundongos e da bactéria, dose e via de inóculo de Mtb, dificultando ainda mais a interpretação dos dados.

Isso nos impulsionou a investigar e aprofundar o papel do inflamassoma na infecção pelo Mtb na população humana.

2.HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1. Hipótese de trabalho

Considerando que a TB é uma doença multifatorial onde fatores genéticos do hospedeiro e do patógeno, assim como o ambiente, contribuem tanto para a susceptibilidade ou resistência ao bacilo, quanto a gravidade da apresentação clínica nos indivíduos infectados, e que sabe-se que a entidade da resposta imune inata no primeiro contato Mtb/hospedeiro é fundamental para eliminação/contenção da bactéria, levantamos a hipótese que variantes genéticas nos componentes do inflamassoma, afetando os níveis de produção das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18, sejam relevantes na resposta a Mtb e no desenvolvimento e/ou no prognóstico da TB.

Frente aos poucos dados disponíveis em seres humanos na literatura e a discrepância dos modelos *in vitro* utilizados com relação a cepa de Mtb, carga bacteriana, estado da TB, surgiu a ideia de combinar o estudo de associação genética com um ensaio genótipo-guiado com macrófagos-derivados de monócitos (MDM) levando em conta a variabilidade genética do hospedeiro mais também a do patógeno, utilizando cepas de Mtb de diferente virulência, e por fim a condição do doador de MDM, podendo ser doador saudável de área não endêmica, paciente com TB recém diagnosticado ou contato do paciente com TB ativa (doador saudável mas exposto a infecção).

De acordo com esta ideia, a nossa hipótese prevê uma diferente entidade de ativação do inflamassoma dependendo do background genético do hospedeiro, do tipo de patógeno e do estado de exposição ao Mtb do indivíduo, e que possa ser medida para distinguir os pacientes com TB ativa e os indivíduos expostos a Mtb mas sem doença (infecção latente ou resistência a infecção).

2.2. Objetivos

2.2.1. Geral

Avaliar a contribuição do inflamassoma na resposta a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, a fim de caracterizar os mecanismos inflamatórios que atuam no desenvolvimento da TB

2.2.2. Específicos

1. Determinar a contribuição da genética do inflamassoma na susceptibilidade a infecção pelo *M. tuberculosis* e na gravidade da TB pulmonar
2. Avaliar o efeito funcional dos polimorfismos eventualmente associados com a TB pulmonar em macrófagos humanos derivados de monócitos (MDM)
3. Caracterizar a entidade de ativação do inflamassoma nos MDM em resposta a cepas de micobactéria com diferente grau de virulência
4. Descrever o grau de ativação do inflamassoma em pacientes com TB e em indivíduo exposto a *M. tuberculosis* sem manifestações clínicas
5. Identificar biomarcadores relacionados com o inflamassoma para detecção de infecção latente de *M. tuberculosis*

3.MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) (número de referência CEPISH: 51780715.8.0000.5467) e pelo Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (número de referência CEPISH: 57978916.3.0000.5020).

Todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito e todas as investigações laboratoriais foram conduzidas de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinki.

5.2. Casuística para estudo de genotipagem

Para o estudo de associação da genética do inflamassoma, foram utilizados DNA genômico de 640 indivíduos, nascidos na Amazônia brasileira, não indígenas, cujos pais e avós nasceram e viveram na mesma região, sem consanguinidade, de ambos os gêneros, e com idade entre 18 e 60 anos.

Destes, 288 são indivíduos sem sinais clínicos de TB e com resultados negativos para os exames bacteriológicos de baciloscopia, cultura e/ou geneXpert, 288 são pacientes com TB pulmonar ativa primária, e 64 com TB extra-pulmonar. Os pacientes com TB são recém diagnosticados, com resultados positivos para os exames bacteriológicos de baciloscopia, cultura e/ou geneXpert. Todos os pacientes foram recrutados na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes (Manaus, AM).

Indivíduos com outras enfermidades além da TB pulmonar, tais como doenças autoimunes, neoplasias, diabetes, HIV positivos ou ainda indivíduos que estavam fazendo uso de algum imunorregulador e gestantes foram excluídos. Além disso, foram desconsiderados os pacientes de TB com recidivas, multidrogas resistentes.

As características gerais dos indivíduos utilizados no estudo de associação estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características gerais e demográficas da população estudada. Gênero em pacientes com TB pulmonar ativa (TB), extra pulmonar (ETB) e contatos (CNT), indivíduos vacinados com BCG e naturalidade estão representados por número amostral (n) e porcentagem (%). ^a Média; ^b Desvio padrão.

Características	TB n=288 (%)	ETB n=64	CNT n=288 (%)
Gênero			
Masculino, n (%)	193 (67,0%)	30 (47.0%)	155 (53,8%)
Feminino, n (%)	95 (33,0%)	34 (53.0%)	133 (46,2%)
Idade (anos), (Ma e SDb)	38±13,2	33.0±13.02	36±12,0
Vacina BCG			
Sim, n (%)	207 (71,9%)	55 (86.0%)	251 (87,2%)
Não, n (%)	20 (6,94%)	9 (14.0%)	22 (7,60%)
Não sabe, n (%)	61 (21,2%)		15 (5,20%)
Naturalidade			
Manaus, n (%)	122 (42,4%)	64 (100%)	131 (45,5%)
Outros municípios do Amazonas	53 (18,4%)		80 (27,8,%)
Outros estados da Amazônia brasileira	113 (39,2%)		77 (26,7%)

5.3. Extração de DNA genômico e Genotipagem de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do inflamassoma

O DNA genômico foi isolado de sangue periférico (leucócitos) dos indivíduos controle e com TB pulmonar ativa (seção 4.2) de acordo com a técnica rápida com sais de brometo de tetramilamônio (DTAB/CTAB) proposta por GUSTINCICH et al. (1991).

Os SNPs foram selecionados a partir dos dados previamente publicados (PONTILLO et al., 2013; PONTILLO et al., 2012; VERMA et al., 2012) e bancos de dados públicos

(HapMap e SNPbrowser) com MAF>0,05. Os efeitos funcionais dos SNPs utilizados no estudo estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Efeitos funcionais dos SNPs utilizados no estudo. Indentificação do SNPs (SNPs ID), posição, tipo de variação, efeito e referência

SNP ID	Posição	Variação	Efeito	Ref.
<i>NLRP1 (17p13.2), GRCh38.p12, NM_033004.3, NP_127497</i>				
rs2670660	5615686	g.5615686 A>G (promotor)	Aumenta a expressão de <i>NLRP1</i> .	GTEx
rs12150220	5582047	c.464 A>T (p.L155H)	Aumenta o processamento de IL-1 β ; Aumenta a expressão de <i>NLRP1</i> .	(LEVANDOWSKI et al., 2013); GTEx
<i>NLRP3 (1q44), GRCh38.p12, NM_004895.4, NP_004886.3</i>				
rs35829419	247425556	c.2113C>A (p.Q705K)	Aumenta a produção de IL-1 β e IL-18.	(VERMA et al., 2012)
rs10754558	247448734	c.*230G>T	Aumenta a estabilidade de mRNA NLRP3; diminui a ligação de miR223 e miR4273	(HITOMI et al., 2009) (SHEN et al., 2019)
<i>NLRP4 (2p22.3), GRCh38.p12, NM_021209.4 NP_067032.3</i>				
rs479333	32264089	c.-119+1498 G>C	Diminui a expressão de <i>NLRP4</i> Diminui o nível plasmático de IL-18.	(ZELLER et al., 2015) (MATTEINI et al., 2014)
<i>AIM2 (1q23.1), GRCh38.p12, NM_004833.2, NP_004824.1</i>				

SNP ID	Posição	Variação	Efeito	Ref.
rs35130877	159035958	c.-1310 T>C	Diminui a expressão de IFI16.	Ortiz-Fernández L, 2015
<i>CARD8 (19q13.33) GRCh38.p12, NM_001184900.3 NP_001171829.1</i>				
rs6509365	48240212	c.59+750 T>C	Aumenta a expressão de <i>CARD8</i> na tireóide	GTEX
rs2043211	48234449	c.304 T>A (p.C10X)	Aumenta a produção de IL-1 β ; Aumenta a expressão de <i>CARD8</i>	(VERMA et al., 2012) GTEX
<i>IL1B (11q22.3); GRCh38.p12; NM_033292.3; NP_150634.1</i>				
rs1143634	112832813	G>A	Perda de função da expressão de IL1 β ; Aumento na suscetibilidade individual contra M.tuberculosis	Oliveira A., 2014 (HALL et al., 2015)
<i>IL18 (11q22.3) GRCh38.p12, NM_004347.4 NP_004338.3</i>				
rs5744256	112152125	A>G	Diminuição no plasma de IL-18	(FRAYLING et al., 2007)
rs1834481	112153104	C>G	Diminuição na produção de IL-18	(MARTINEZ-HERVAS et al., 2015)
<i>IL1R (2q12.1) GRCh38.p12,</i>				
rs3917254	102160058	G>A	Risco de Doença Invasiva Pneumocócica (DPI)	(K LEMON; R MILLER; N WEISER, 2015)

SNP ID	Posição	Variação	Efeito	Ref.
<i>P2X7 (12q24.31) GRCh38.p12, NM_002562 , NP_002553.3</i>				
rs3751143	121184501	A>C p.(Glu496Ala)	Perda de função	(LEES et al., 2010)
rs2230911	121177328	C>G p.(Thr357Ser)	Perda de função (Thr357Ser)	(LEES et al., 2010)
<i>CSTB (21q22.3) GRCh38.p12,</i>				
rs12338	11853379	G>C	-	Chen et al, 2012
rs8898	11845033	T>C	Associado ao desenvolvimento clinico-patológico de câncer oral	Chen et al, 2012

A genotipagem foi efetuada com ensaios alelo-específicos de tipo TaqMan® na plataforma de PCR em tempo real QuantStudio 3 System (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific), e o software QuantStudio™ Design Analysis versão 1.4 foi utilizado para a discriminação alélica.

Na figura 2 reportamos um exemplo de resultado de genotipagem com a curva de amplificação e a discriminação dos alelos que foram marcados com o flurocromos VIC e FAM

Figura 2. Representação gráfica dos resultados do PRC em tempo real.

(A) Curva de amplificação fluorescência contra o número do ciclo, o PCR em tempo e gera um gráfico de amplificação que representa o acúmulo de produto ao longo da duração de toda reação. (B) Gráfico de discriminação dos alelos, vermelho representa homozigoto para o alelo 1, azul para o alelo 2 e verde heterozigoto.

5.4. Casuística para ensaios com células

Para os experimentos *in vitro* e *ex vivo* foram utilizadas três grupos de indivíduos: grupo controle, pacientes com TB pulmonar ativa e indivíduos expostos ao Mtb mas sem TB ativa, os assim chamados “indivíduos contatos”. As principais características demográficas e clínicas dos 3 grupos são reportada na **Tabela 3**.

4.3.1 Grupo controle

Cinquenta e quatro (n=54) adultos não aparentados doadores voluntários de sangue foram recrutados no Instituto de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz após o procedimento de plasmaférese para compor o grupo controle (26 homens/ 28 mulheres; idade média $\pm$ desvio padrão: 45 ± 13 anos). Os doares são procedentes da região metropolitana de São Paulo (SP, Brasil), nutridos, ausentes de doenças ou infecções (virais ou bacterianas) no momento da coleta, e preenchem todos os requisitos básicos para doação de sangue estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

4.3.2 Grupo de pacientes com TB pulmonar ativa

Vinte e sete (n=27) adultos não aparentados recém-diagnosticados com tuberculose pulmonar ativa, procedentes da Amazônia brasileira, foram recrutados no Centro de Referência de Atenção Sanitária Pneumológica “Clínica Cardoso Fontes” (Manaus, AM, Brasil) de janeiro de 2016 a maio de 2018 para compor o grupo de pacientes (homens/mulheres: 16/11; idade média: $51,85 \pm 11,73$ anos). Pacientes com doenças autoimunes, infecção por HIV, diabetes ou uso de drogas imunorreguladoras, anti-inflamatórias ou medicamentos anti-TB no momento da coleta de sangue foram excluídos do estudo.

O diagnóstico de TB foi realizado pelo os sintomas clínicos, juntamente com testes de detecção de Mtb: análise de escarro e/ou teste molecular pela plataforma GeneXpert MTB / RIF (Cepheid). A detecção de Mtb em amostras de expectoração (escarro) foi realizada por exame direto de baciloscopia e cultura de acordo com o método desenvolvido

por Petroff, Kudoh e Ogawa (PKO) (SALEM, J. I et al., 2007; SALEM, J. I et al., 1990) e análise da Sequência de Inserção (IS) 6110 no genoma bacteriano (VAN EMBDEN et al., 1993) no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA).

4.3.3 Grupo de “contatos”

Vinte e sete (n=27) adultos não aparentados, procedentes da Amazônia brasileira, foram recrutados entre pessoas que acompanhavam os pacientes com TB pulmonar ativa (com contato diário com pacientes com TB) no Centro de Referência de Atenção Sanitária Pneumológica “Clínica Cardoso Fontes” (Manaus, AM, Brasil) de janeiro de 2016 a maio de 2018. para compor o grupo de indivíduos negativos para TB ativa mais expostos ao Mtb, ou “contatos” (CNT) (homens/mulheres: 16/11; idade média: $51,85 \pm 11,73$ anos).

O diagnóstico de TB pulmonar ativa foi excluído pela ausência de sintomas clínicos e de acordo com o resultado negativo dos testes diagnósticos (baciloscopia, cultura Mtb e teste IS6110).

Tabela 3. Principais características dos indivíduos recrutados para o estudo Estado brasileiro, idade média, distribuição por sexo e vacinação com BCG são relatados para os três grupos de indivíduos estudados: doadores saudáveis (HD; n = 30), pacientes com TB (TB; n = 27) e contatos (CNT; n = 27). Resultados positivos para o teste de TST, IGRA, teste de detecção de Mtb e teste de detecção de Mtb no esfregaço de expectoração foram indicados para pacientes com TB e contatos.

SP: estado de São Paulo; AM: estado do Amazonas; n: número de indivíduos; SD: desvio padrão; %: porcentagem; BCG: bacilo calmette guerin; TST: teste cutâneo tuberculínico ou teste de Mantoux; IGRA: Teste de Liberação Gama Interferon; Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

Características	Controle (n=54)	TB (n=27)	CNT (n= 27)
Origem	SP	AM	AM
Idade, anos (Média $\pm$ SD)	45 ± 13	51 ± 11	52 ± 12
Masculino/Feminino, n (%)	14/16 (46.7/54.3)	16/11 (59/41)	11/16 (41/59)

BCG vacinados, n (%)	30 (100)	27 (100)	27 (100)
TST+, n (%)	0	5 (18.6)	3 (11.1)
IGRA+, n (%)	n.d.	12 (44.4)	13 (48.1)
Teste de detecção Mtb +, n (%)	n.d.	27 (100)	0
Teste de detecção Mtb em escarro +, n (%)	n.d.	13 (50)	0

5.5. Obtenção de macrófagos diferenciados de monócitos

As células mononucleadas de sangue periférico foram obtidas a partir do concentrado de leucócitos (câmara LRS) dos doadores voluntários de sangue (grupo controle), ou de 20 mL de sangue periférico dos pacientes com TB pulmonar ativa e dos contatos, através do gradiente de densidade com uso de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Biosciences AB Durhman, NC, USA). O rendimento medio das câmaras LRS é de 100×10^6 células, e do sangue periférico é de 10×10^6 células/mL de sangue.

Em seguida, os monócitos foram separados das demais células mononucleadas (linfócitos) por adesão em superfície plástica. Em breve: 4×10^6 células mononucleadas por poço foram distribuída em placas de cultura celular (Corning Costar) de 24 poços. Após 2 horas de adesão a 37°C e 5% CO₂, os poços foram lavados 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS; Sigma-Adrich, Merck) mantido a temperatura ambiente para remover as células não aderentes (principalmente linfócitos). As células aderidas (principalmente monócitos) representam acerca de 5-10% das células iniciais (acerca de $0.2-0.4 \times 10^6$ células/poço)

Os monócitos foram então cultivados em meio RPMI-1640 (Gibco/Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*; Gibco/Thermo Fisher Scientific) e 25 ng/μL de M-CSF (M-CSF, do inglês *macrophage colony-stimulating factor*) (PeproTech) por 5 dias para obtenção de macrófagos-derivados de monócitos (MDM), de acordo com protocolo estabelecido.

A qualidade dos MDM foi confirmada por análise morfológica da célula e da expressão das moléculas de superfície CD14 (PE) e CD68 (Pe-Cy), e da viabilidade celular por marcação com anticorpos anti-CD14 (BD) e anti-CD68 (Biolegend) e pelo Pacific Blue Live and Death Cells Assay (Thermo Fisher Scientific) respectivamente, e citometria de fluxo (FACSCanto II). Uma percentagem de 95-99% de células duplo positivas para CD14 e CD68, e uma viabilidade acima de 95-99% foram consideradas adequadas para prosseguir com os ensaios. Os resultados da análise de uma cultura de MDM são reportados na **Figura 3** como representativos dos demais experimentos.

Figura 3. Caracterização fenotípica da diferenciação de macrófagos de monócitos de sangue periférico de doadores saudáveis.

A diferenciação de monócitos-a-macrófagos de doadores saudáveis (MDM) foi confirmada por análise morfológica e de citometria de fluxo de marcadores de superfície de CD14 e CD68 e ensaio de viabilidade celular. **(A)** Monócitos isolado, **(B)** MDM diferenciado após 5 dias de cultivo. **(C)** As células singulares (Singlet cells) foram delimitadas ao longo da diagonal em gráficos de altura de dispersão para a frente (FSC-H) versus área de dispersão

para a frente (FSC-A). **(D)** MDM foram selecionados de acordo com o tamanho (FSC) e granularidade (SSC). **(E)** Na porta do MDM, apenas células vivas foram selecionadas (células negativas Pacífico-Azul). **(F)** Diferenciação monócito-macrófago foi confirmada pela dupla positividade dos marcadores de superfície CD14 (PE) e CD68 (PE-Cy).

5.6. Ensaio de ativação do inflamassoma

Os MDM foram estimulados com *M. tuberculosis* (Mtb) no MOI (do inglês multiplicity of infection) de 0.033 como estabelecido após padronização (Apêndice) por 24 horas, e também, evitamos o uso de maior MOI tentando mimetizar o ciclo de infecção natural que acontece em humanos (KAUFMANN, 2001). Em seguida o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de citocinas após passagem em tubo com filtro de 0,22 µm, Spin-X (Corning), as células foram lisadas para extração de RNA e análise de expressão gênica ou fixadas para análise da formação de agregados de ASC (specks de ASC).

1mM ATP (Sigma-Aldrich, Merck) foi adicionado por 15 minutos após a estimulação para avaliar a ativação específica do NLRP3 de acordo com (GATTORNO et al., 2007). A estimulação com 1µg/mL LPS (*E. coli* O111: B4; Sigma-Aldrich, Merck) por 24 horas e 1 mM de ATP por mais 15 minutos foi utilizada como controle positivo da ativação do NLRP3 inflamassoma (GATTORNO et al. (2007). Esse tempo de estímulo foi estabelecido após a cinética realizada (Apêndice).

Em alguns experimentos foram utilizados o inibidor genérico do inflamassoma parthenolide (PTD; Invitrogen, Thermofisher scientific) na concentração de 10 µM de acordo com (JULIANA et al., 2010), o inibidor específico de NLRP3 MCC-950 (InvivoGen) na concentração de 10 µM de acordo com (COLL et al., 2015); o inibidor de catepsina B, CA-074Me (CA074; Merck KGaA) na concentração de 10 µM ou o inibidor de fagocitose citocalasina-D (cit-D; Sigma-Aldrich, Merck) na concentração de 10 µM. Para avaliar a eficácia da ativação do inflamassoma frente a Mtb, 10 ng/mL de IL-1β (Peprotech) foram adicionados em ensaios de crescimento bacteriano (descrito detalhadamente a seguir). A ação dos inibidores são mostrados na **Figura 4**.

Figura 4. Mecanismos de ação dos inibidores.

PAMPs são reconhecidos pelo Receptor de Reconhecimento de Patógenos (PRR) e induzem a expressão dos componentes do inflamassoma através da via NF-κB. CTSB ativa o NLRP3 inflamassoma e consequente produção de IL-1β e IL-18. Possivelmente outros mecanismos (??), independente de NLRP3, estão envolvidos na ativação do inflamassoma. O aumento do ATP extracelular ativa o receptor purinérgico P2X7, permitindo o efluxo de K⁺, que ativa o NLRP3. Os inibidores químicos do inflamassoma usados neste estudo são indicados: inflamassoma geral e inibidor de NF-κB, partenolideo (PTD); inibidor seletivo de NLRP3, MCC-950 (MCC) e inibidor seletivo de catepsina B (Ca074).

5.7. Análise da produção de citocinas, clivagem de caspase-1 e LDH ensaio

A análise da concentração de citocinas no sobrenadante de cultura e no plasma foi efetuada com ELISA comerciais e de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliação da ativação do inflamassoma foram dosadas a IL-1β e a IL-18 com os kits das empresas Biolegend e R&D Systems, respectivamente. IFN-α e TNF foram dosados com os kits das

empresas PBL Assay Science e R&D Systems, respectivamente. As concentrações das citocinas estão apresentadas em pg/mL.

A clivagem de caspase-1 foi realizado com o uso do kit comercial FAM-FLICA de acordo com as recomendações do fabricante (ImmunoChemistry).

A liberação de LDH foi utilizada para análise da viabilidade celular com o kit comercial ThermoFisher de acordo com as recomendações do fabricante

5.8. Análise da expressão gênica relativa dos componentes do inflamassoma

O RNA total foi isolado das células utilizando o RNAqueous® Micro kit (Ambion) ou TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as instruções dos fabricantes. A pureza e quantidade do RNA foram avaliadas por meio de leitura por espectrofotometria no Nanodrop (Thermo Scientific). 300 ng de RNA total para cada amostra foram retrotranscritos utilizando retrotranscritase (RT) Platinum™ Taq DNA Polymerase (One Step SuperScript® III RT-PCR system, Invitrogen) e random primers (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Os genes *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CASP1*, *CARD8*, *P2X7*, *IL1B* e *IL18* foram então amplificados a partir de 1 µL cDNA utilizando sondas fluorescentes gene-específicas de tipo Taqman (Applied Biosystems, ThermoFisher scientific) e PCR em tempo real (qPCR) na plataforma de PCR em tempo real QuantStudio R.3 (Applied Biosystems, ThermoFisher scientific). O gene endógeno *GAPDH* (do inglês, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), que tem expressão constitutiva que não é afetada pela ativação dos MDM após padronização, foi utilizada para normalização dos dados de expressão gênica em relação ao número de MDM/poço.

O software QuantStudio™ Design Analysis versão 1.4 foi utilizado para obter os dados de Cycle Threshold (Ct) para cada gene. Os dados de Ct >35 foram excluídos da análise. A expressão relativa dos genes alvo foi calculada usando o método comparativo de Ct, proposto por SCHMITTGEN; LIVAK (2008).

A normalização dos dados de Ct foi efetuada subtraindo o valor de Ct do gene endógeno GAPDH ao valor de Ct do gene alvo para cada condição (ΔCt).

A modulação gênica entre células de indivíduos de grupos diferentes foi calculada como ratio: $\Delta Ct / \Delta Ct$.

A modulação gênica das células após estimulação (Fold Change, FC) foi obtida comparando os valores de ΔCt das células estimuladas e não estimuladas (comparações pareadas, $\Delta \Delta Ct$) e utilizando o valor como expoente da fórmula $2^{-\Delta \Delta Ct}$.

5.9. Detecção de agregados (specks) de ASC contendo NLRP3 ou NLRC4

Foram cultivadas 0.1×10^6 MDM/poço e estimuladas em chamber slides de 16 poços (Thermo Fisher Scientific) para os ensaios de imunofluorescência.

Após os ensaios, as células foram fixadas e permeabilizadas com o reagente Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 1 hora a 37°C em 5% de CO₂.

Para detecção de speck contendo o receptor NLRP3, as amostras foram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C com anticorpo monoclonal de camundongo para NLRP3 humano (concentração de 1:100 com relação a solução original) (referência: ab17267; Abcam), e depois por 1 hora com um anticorpo de cabra para IgG1 de camundongo conjugado com o fluorocromo Alexa 488 (referência: ; Thermo Fisher Scientific).

Para detecção de speck contendo o receptor NLRC4, as amostras foram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C com anticorpo monoclonal de coelho para NLRC4 humano (concentração de 1:200 com relação a solução original) (referência: ab115537; Abcam) e depois por 1 hora com um anticorpo de cabra para IgG1 de coelho conjugado com o fluorocromo Alexa 647 (referência: ; Thermo Fisher Scientific).

Os fluorocromos Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647 emitem fluorescência verde e vermelha, quando excitados com laser a 488 nm e 594-633 nm, respectivamente.

O dicloridrato de 4'-diamidina-2'-fenilindole (DAPI; Sigma-Aldrich) foi usado para corar de azul os núcleos das células.

A detecção de specks contendo NLRP3 e/ou NLRC4 foi efetuada através do

microscópio de varredura a laser confocal DMI8 na unidade de microscopia do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil). Os agregados de inflamassoma (specks) tem tamanho em torno de 1 μm (FRANKLIN et al., 2014; STUTZ et al., 2013) e portanto podem ser observadas nas células a partir do aumento de 63x

A aquisição das imagens foi feita com a câmera digital DFC310 FX (Leica) acoplada ao microscópio. O software ImageJ e plugins relacionados (National Institutes of Health) foram utilizados para o processamento das imagens.

A comparação do número de specks entre diferentes condições foi efetuada com o software ImageJ (National Institutes of Health), os specks foram calculados em 10 campos da imagem (numero de specks/10 campos).

5.10. Cultivo e obtenção da micobactéria

As cepas de micobactéria BCG, H37Rv (*M.tuberculosis*), Beijing 1471 (*M.tuberculosis*) e MP287/03 (*M.bovis*) foram gentilmente cedidas pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Maria Regina D'Império-Lima do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB IV), Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo (USP).

As cepas virulentas (H37Rv) e hipervirulentas (Beijing 1471 e MP287/03) foram cultivadas no laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

As cepas foram cultivadas em meio de Middlebrook 7H9 (Difco, BD Biosciences, EUA), suplementado com a 10% de albumina, dextrose, catalase (ADC) (Difco) por três semanas a 37°C com agitação, depois a cepa foi reinoculada em meio fresco por 7 dias e o crescimento bacteriano foi determinado usando o comprimento de onda de 600nm por a densidade óptica de 0,100 (DO 600nm/0,100) versus as unidades formadoras de colônias (UFC). UFC foi realizada por diluição bacteriana seriada em meio Middlebrook 7H10 Agar (Difco) suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose, catalase (OADC) (Difco) por três semanas a 37 ° C em 5% de CO₂. A relação DO versus número de bacilos foram

equivalentes a 2×10^8 bacilos/mL (BCG), 10^7 bacilos /mL (H37Rv e Beijing 1471) e 2×10^7 (MP287/03).

5.11. Avaliação do Crescimento Bacteriano

1×10^6 MDM foram desafiados com Mtb H37Rv (MOI:0.033) por 24 horas na presença de meio de cultura celular (RPMI-1640 + 10% FBS), ou com meio + 10 ng/mL de IL-1 β (Peprotech), ou com meio + 10 μ M PTD. MDM foram então lisados em 200 μ l de água destilada fria e centrifugada 400 xg por 10 min a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de PBS e 50 μ L de lisado foram utilizados para preparação de diluições em série, em seguida cultivados em meio Middlebrook 7H10 Agar + OADC a 37 ° C durante 21 dias. O crescimento bacteriano no MDM foi avaliado pela contagem das unidades de formação de colônias (UFC).

5.12. Análise estatística dos dados

Os dados de distribuição de frequência dos SNPs selecionados entre os grupos de pacientes e controles foram analisados por meio de análise multivariada com modelo linear geral. Idade e sexo foram incluídas como variáveis de correção. O software R versão 3.2.2 (www.r-project.org) foi utilizado para a análise de associação (pacote "SNP assoc" versão 1.9-2). O software Haploview (BARRETT, 2009) foi utilizado para investigar desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs no mesmo gene e para derivar os haplótipos. A correção formal de Bonferroni para comparações múltiplas foi utilizada para gerar um limiar de significância mais stringente ($p \leq 0,004$) levando em consideração o número de SNPs analisados (p_0/n ; $p=0,05$; $n=14$ SNPs).

Para os demais dados (produção de citocinas, expressão gênica, dados de citometria de fluxo e de imunofluorescência, CFU) foi antes verificada a natureza dos dados (paramétricos ou não paramétricos) através da análise de distribuição normal com o teste de normalidade D'Agostino-Pearson (executado no programa GraphPad Prism, versão 7). Em seguida, de acordo com a natureza dos dados e com um número de grupos/condições comparados, foram aplicados testes paramétricos ou menos, teste t ou 1-way Anova,

seguido pelo pos-test de Holm-Sidak's (executados no programa GraphPad Prism, versão 7), como especificados para cada grafico. Uma análise do compenente principal (PCA) foi realizada entre as variáveis IL-1 β , positividade para Mtb no escarro (Mtb+) em pacientes com TB e ou contatos, com o auxilio do programa Minitab versão 17. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.1 Contribuição da genética do inflamassoma na susceptibilidade a infecção pelo *M. tuberculosis*

Com objetivo de demonstrar a contribuição da genética do inflamassoma na susceptibilidade ou resistência à TB, foram genotipados 14 polimorfismos genéticos, relacionados com a entidade da ativação do inflamassoma e/ou com o nível das suas citocinas, em uma corte caso/controle de TB procedente da Amazonas brasileira.

Os SNPs, selecionados com base no efeito funcional e/ou na literatura (como explicado em detalhe na secção 4.2) são localizados em 9 genes, sendo 3 genes codificadores dos principais receptores candidatos para detecção do Mtb (*NLRP3* e *AIM2*) e de um receptor possivelmente não envolvido na resposta contra Mtb (*NLRP1*), 3 genes de moléculas relacionadas com a ativação do NLRP3 inflamassoma (*CTSB*, *P2X7*, *CARD8*), os genes das citocinas ativadas pelo complexo (*IL1B* e *IL18*), e o gene codificado pelo antagonista no receptor da IL1 (*IL1R1*).

A frequência dos SNPs resultou em Equilíbrio Hardy-Weinberg (nenhuma diferença significativa entre a frequência dos genótipos observada e esperada) (em ambos os grupos, caso e controle (**tabela 4**), indicando que as análises de associação não sofrem nenhuma interferência de deriva gênica, tamanho populacional, subdivisão populacional, com isso reforça os resultados de associação.

A frequência do alelo menor (MAF) dos 14 SNPs do grupo controle não resultou significativamente diferente a frequência reportada para os SNPs no banco de dados públicos de sequenciamento genético 1000Genome (Na **tabela 4**) Na tabela foram reportados apenas os dados relativos a população europeia devido ser uma população mais homogênea

Tabela 4. Frequências alélicas dos SNPs estudados em genes que codificam inflamassoma na população estudada. Gene, número de identificação de polimorfismo (SNP ID), frequências alélicas para pacientes com TB pulmonar ativa (TB) e indivíduos saudáveis (IS) e p-valor de equilíbrio de Hardy Weinberg (H-W p). Frequência do menor alelo (MAF) para população caucasiana (Hapmap) e p-valor de comparação entre MAF de IS na coorte da Amazônia brasileira, MAF de Hapmap calculado pelo teste exato de Fisher.

Gene	SNP ID	Alelos	TB (n=288)	IS (n=288)	H-W p (TB/IS)	MAF	P
<i>NLRP1</i>	rs12150220	T	0,31	0,33	1,000/0,750	0,46	0,061
		A	0,69	0,67			
	rs2670660	G	0,41	0,43	0,320/0,33	0,46	0,776
		A	0,59	0,57			
<i>NLRP3</i>	rs10754558	G	0,22	0,29	0,062/0,184	0,36	0,365
		C	0,78	0,71			
	rs35829419	A	0,01	0,02	0,715/0,879	0,06	0,279
		C	0,98	0,99			
<i>AIM2</i>	rs35130877	T	1,00	1,00	NA	NA	NA
		A	0,00	0,00			
<i>CARD8</i>	rs6509365	G	0,34	0,35	0,312/0,298	0,28	0,361
		A	0,66	0,65			
	rs2043211	T	0,34	0,29	1,000/0,150	0,27	0,875
		A	0,66	0,71			
<i>IL1B</i>	rs1143634	A	0,11	0,15	0,140/0,100	0,21	0,358
		G	0,89	0,85			
<i>IL18</i>	rs5744256	G	0,09	0,12	0,150/0,410	0,22	0,089
		A	0,91	0,88			
<i>IL1R1</i>	rs3917254	A	0,23	0,19	1,000/0,379	0,09	0,065
		G	0,77	0,81			
<i>P2RX7</i>	rs3751143	C	0,24	0,20	0,692/0,129	0,18	0,857
		A	0,76	0,80			
	rs2230911	G	0,24	0,17	0,406/0,308	0,10	0,214
		C	0,76	0,83			

<i>CTSB</i>	rs12338	C	0,35	0,38	0,379/0,322	0,38	1,000
		G	0,65	0,62			
	rs8898	C	0,52	0,48	0,119/0,497	0,34	0,061
		T	0,48	0,52			

Levando em conta que entre os SNPs selecionados, alguns são localizados no mesmo gene, e que prévios estudos apontaram pela transmissão agrupada (os assim chamados haplótipos) dos SNPs rs12150220 e rs2670660, rs35829419 e rs10754558 , rs2043211 e rs6509365 de uma geração para outra (desequilíbrio de ligação, LD), e que alguns haplotipos demonstraram um efeito funcional maior respeito as variantes isoladas, realizamos a análise de desequilíbrio de ligação na corte caso/controle de TB.

Como representado graficamente na Figura 5, apenas os SNPs nos genes *NLRP1* (rs12150220, rs2670660) e *CARD8* (rs2403211, rs6509365) resultaram em moderado LD (D'/LOD =88 e 86, respectivamente).

Figura 5. Resultados da análise de LD na população estudada.

Os resultados da análise de LD pelos 14 SNPs são representados como gráfico e os valores D'/LOD são reportados de acordo com o software utilizado (Haploview).

De acordo com esses resultados, a análise de distribuição de frequência foi executada tanto considerando os SNPs separados que os haplótipos evidenciados para os genes *NLRP1* e *CARD8*.

A comparação da frequência dos SNPs entre casos e controles foi executada através de uma análise multivariada, incluindo como variáveis de correção gênero e idade. Na Tabela 5 são reportados os resultados da análise evidenciando os valores de p e odds ratio com e sem a correção (p_c e p , respectivamente). Foram consideradas diferenças significativas aquelas com ($p \leq 0,004$) de acordo com a correção por comparação múltiplas (correção de Bonferroni).

Tabela 5. Resultados da associação para SNPs em genes do inflamassoma em uma coorte caso/controle de tuberculose pulmonar da Amazônia brasileira. Símbolo de gene, número de identificação do polimorfismo (SNP ID), frequências de genótipos para pacientes com TB pulmonar ativa (TB) e indivíduos saudáveis (IS), valor p de GLM (p), odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) são reportados, bem como p e OR ajustados para sexo e idade (p_{adj} , OR_{adj}). Os resultados estatisticamente significativos após a correção de Bonferroni ($p \leq 0,004$) são indicados em negrito, aqueles com $p < 0,05$ estão em cinza r, c : modelos de herança recessivo e codominante respectivamente de acordo com os critérios de informação de Akaike (AIC).

Gene e SNP ID	Genótipos	TB (n=288)	IS (n=288)	p	OR (95%CI)	p _c	OR _c (95%CI)
NLRP1							
rs12150220	A/A	0,49	0,44	0,322	0,83 (0,58-1,20)	0,250	0,81 (0,56-1,16)
	A/T	0,41	0,45				
	T/T	0,10	0,11				
rs2670660	A/A	0,38	0,34	0,269	0,82 (0,58-1,17)	0,216	0,80 (0,56-1,14)
	A/G	0,42	0,46				
	G/G	0,20	0,20				
NLRP3							
rs1075458	C/C	0,61	0,53	0,002 (r)	0,37 (0,18-0,73)	0,004 (r)	0,38 (0,19-0,76)
	C/G	0,35	0,36				
	G/G	0,04	0,11				
rs35829419	C/C	0,96	0,98	0,091	2,39 (0,83-6,83)	0,098	2,36 (0,82-6,84)
	A/C	0,02	0,04				

A/A							
AIM2 rs35130877	T/T	1,00	1,00	NA	NA	NA	NA
CARD8							
rs6509365	A/A	0,46	0,44	0,567	0,90 (0,63-1,28)	0,499	0,88 (0,62-1,26)
	A/G	0,40	0,42				
	G/G	0,14	0,14				
rs2043211	A/A	0,46	0,50	<u>0,028</u> (r)	1,80 (1,0-3,06)	<u>0,022</u> (r)	1,85 (1,08-3,18)
	A/T	0,40	0,42				
	T/T	0,14	0,08				
IL1B rs1143634	G/G	0,80	0,74	0,133	0,69 (0,42-1,20)	0,169	0,71 (0,43-1,16)
	G/A	0,17	0,22				
	A/A	0,03	0,04				
IL18 rs5744256	A/A	0,81	0,77	<u>0,030</u> (c)	0,85 (0,56-1,29)	<u>0,022</u> (c)	0,86 (0,56-1,30)
	A/G	0,19	0,21				
	G/G	0,00	0,02				
IL1RN rs3917254	G/G	0,60	0,65	0,089	1,94 (0,89-4,26)	0,083	1,98 (0,90-4,37)
	A/G	0,33	0,31				
	A/A	0,07	0,04				
P2X7							
rs3751143	A/A	0,59	0,64	0,137	1,75 (0,82-3,70)	0,106	1,84 (0,86-3,92)
	A/C	0,33	0,31				
	C/C	0,08	0,05				
rs2230911	C/C	0,59	0,67	0,001 (r)	3,91 (1,57-9,74)	0,002 (r)	3,79 (1,51-9,50)
	C/G	0,33	0,31				
	G/G	0,08	0,02				
CTSB							
rs12338	G/G	0,42	0,36	0,202	0,80 (0,57-1,38)	0,181	0,79 (0,56-1,11)
	G/C	0,47	0,50				
	C/C	0,11	0,13				
rs8898	C/C	0,26	0,25	0,036 (r)	0,66 (0,45-0,97)	0,040 (r)	0,67 (0,45-0,98)
	C/T	0,52	0,45				
	T/T	0,22	0,30				

Dentro dos 14 SNPs analisados apenas os polimorfismos rs10754558 C>G no gene *NLRP3* e rs2230911 no gene *P2X7* resultaram significativamente associados à TB. (**Tabela 5**).

O genótipo homozigoto polimorfo rs10754558 G/G resultou significativamente menos frequente nos pacientes com TB (0,04) quando comparados com os indivíduos controles (0,11), sugerindo um efeito protetor do SNP contra o desenvolvimento da TB ($p<0,05$; OR=) de acordo com o modelo de herança recessivo pelo alelo menor G (G/G versus C/C+C/G).

A outra variante analisada no gene *NLRP3*, a rs35829419 C>A também apresentou uma frequência do genótipo A/C menor nos pacientes (0,02) que nos controles (0,04) porém essa diferença não atingiu um valor estatisticamente significativo ($p>0,05$), talvez pela baixa frequência do alelo A observada na corte estudada.

O genótipo homozigoto pelo alelo menor G do SNP rs2230911 C>G no gene *P2X7* resultou significativamente mais frequente ($p<0,002$) nos pacientes com TB (0,08) quando comparados com os controles (0,02) sugerindo um efeito de risco do SNP para o desenvolvimento da TB (OR_c=3,79), de acordo com o modelo de herança recessivo pelo alelo menor G (G/G versus C/C+C/G).

O resultado obtido para o polimorfismo rs2230911 replica os dados publicados anteriormente em cortes caso/controle de TB de etnia caucasiana (FERNANDO et al., 2005; SHEMON et al., 2006).

Por fim queremos destacar que o genótipo homozigoto pelo alelo menor do SNP rs8898 C>T no gene *CTSB* resultou menos frequente nos pacientes (0,70) que nos controles (0,78) (OR_{Adj}=0,67), porém essa diferença não atingiu valor de p estatisticamente significativo após correção de Bonferroni ($p_{adj}=0,040$), talvez pela baixa frequência do alelo menor observada e pelo número amostral limitado da corte. De qualquer modo, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que sugere uma possível contribuição do gene *CTSB* no desenvolvimento da TB.

Em seguida, prosseguimos a análise avaliando a distribuição dos haplótipos NLRP1 rs12150220/rs2670660 e CARD8 rs2043211/rs65 na corte caso/controle de TB, porém sem observar algum resultados estatisticamente significativos (Dados não mostrados).

Levando em conta que o inflamassoma é um complexo e que os SNPs estudados podem afetar a sua entidade de ativação também em conjunto (efeito combinatório dos SNPs) efetuamos a análise multivariada de combinação dos SNPs na corte caso/controle de TB. Não foi observada nenhum efeito combinatório entre os SNPs estudados sobre o desenvolvimento de TB (Dados não mostrados).

Em conclusão o estudo de associação genética efetuado demonstrou pela primeira vez o efeito protetor do polimorfismo rs10754558 no desenvolvimento da TB. Como será discutido mais largamente em seguida, esse polimorfismo, localizado na região 3' do gene NLRP3 (Tabela descrição SNPs), leva a uma maior disponibilidade do NLRP3, desta forma indicando um papel importante deste receptor na detecção do Mtb e na consequente resposta ao bacilo. De acordo, polimorfismos em genes relacionados com a ativação do NLRP3, tais como *P2X7* e *CTSB*, também se mostraram mais frequentes na TB, enfatizando que uma adequada ativação do NLRP3 inflamassoma é necessária para a resposta do indivíduo contra o Mtb.

5.2 A cepa virulenta comum de Mtb (H37Rv) ativa de modo significativo o inflamassoma em MDM

A partir da análise genética, onde detectamos o papel protetor da variante ganho-de-função de NLRP3 rs10754558 contra o desenvolvimento da TB pulmonar, levantamos a hipótese que a genética do inflamassoma tenha uma papel direto na produção de IL-1 β e/ou IL-18, e consequentemente possa afetar o resultado da infecção por Mtb, determinando desta forma a suscetibilidade e/ou o prognóstico da TB. Portanto inicialmente nos perguntamos se o Mtb ativasse a produção de IL-1 β e IL-18 em macrófagos humanos derivados de monócitos (MDM).

Os MDM de 54 indivíduos do grupo controle foram desafiados com Mtb cepa virulenta comum H37Rv (MOI: 0,033) por 24 horas na presença ou ausência de 1 mM de ATP por 15 minutos, e a ativação do inflamassoma foi avaliada através da análise da produção de IL-1 β , IL-18 no sobrenadante, ativação da caspase-1, expressão gênica dos componentes principais do complexo e dos precursores das citocinas, e formação de agregados de ASC (specks). A produção de TNF foi avaliada como medida de mediador inflamatório independente do inflamassoma.

Nos ensaios utilizamos as condições LPS e LPS + ATP como controles da ativação do inflamassoma e do NLRP3 inflamassoma, respectivamente (GATTORNO et al., 2007).

Mtb H37Rv induziu produção significativa de IL-1 β e IL-18 em MDM ($115,8 \pm 11,7$ e $295,5 \pm 2,6$ pg/mL, respectivamente) (Fig. 6 A-B). Quando comparamos a produção de citocinas em MDM tratados com H37Rv e tratados com LPS, observamos uma liberação comparável de IL-1 β , mas níveis mais altos de IL-18 em células tratadas com H37Rv ($295,5 \pm 2,6$ pg/mL versus $198,1 \pm 5,1$ pg/mL) (Fig. 6 A-B). A adição de ATP não aumentou significativamente a produção de IL-1 β e IL-18 no MDM desafiado com H37Rv ($p > 0,05$), como no MDM desafiado com LPS ($p < 0,0001$), sugerindo que o H37Rv ativa o inflamassoma em uma via ATP (P2X7) independente. H37Rv também induziu TNF de forma significativa ($653,8 \pm 5,427$ pg/mL), mesmo que em quantidade limitada em comparação com o LPS (até 2000 pg/mL). Como esperado, o ATP não afetou a liberação de TNF (Fig.6C). A produção de citocinas foi acompanhada pelo aumento significativo da atividade da caspase-1, como mostrado na Fig.6D, corroborando a ativação da via canônica do inflamassoma.

Figura 6. Mtb H37Rv induz a ativação do NLRP3 inflamassoma em macrófagos derivados de monócitos humanos (MDM).

(A) IL-1 β , **(B)** IL-18 e **(C)** TNF (pg / mL) foram medidos em macrófagos de doadores saudáveis derivados de monócitos (HD-MDM; n = 54) estimulados com Mtb H37Rv (MOI: 0,033) (H37Rv-MDM) com ou sem ATP (1 mM) (+ ATP ou w/o ATP, respectivamente). Como controle do inflamassoma ou ativação do NLRP3 inflamassoma, MDM foram tratados com LPS (1 μ g/mL) com ou sem ATP. **(D)** Porcentagem de células CD14+ CD68+ FLICA+ foram relatadas para células estimuladas e não estimuladas. Os dados são apresentados como média $\pm$ SE, o teste t múltiplo com pós-teste de Holm-Sidak foi aplicado para comparar células tratadas versus não tratadas (*: p < 0,05) e + ATP versus sem ATP (§: p < 0,05).

5.3 A ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 β são importantes para controle de crescimento de Mtb em MDM

Para provar que a liberação de IL-1 β induzida por Mtb é importante para o controle do crescimento bacteriano, foi adicionada IL-1 β recombinante a MDM desafiado com H37Rv e foi realizado o cultivo do bacilo.

Como medida do crescimento bacteriano, as CFU foram contadas e comparadas nas condições de cultivo de Mtb H37Rv sem MDM, MDM com H37Rv (H37Rv), MDM tratados com IL-1 β e com H37Rv (IL-1 β) e MDM pre-tratados com partenolide e com H37Rv (PTD). Os resultados são resumidos na **Figura 7A**.

O crescimento de H37Rv foi significativamente inibido na presença de IL-1 β exógena (70,2 % de inibição do crescimento bacteriano comparado com a condição non tratada; $p < 0,00001$). Por outro lado, um aumento significativo no crescimento de H37Rv foi observado quando a ativação do inflamassoma foi inibida pela adição de pathernolide, um inibidor geral da ativação do inflamassoma (160 % de crescimento bacteriano comparado com a condição non tratada; $p < 0,05$). Esses dados enfatizam que a ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 β são importantes para a restrição de Mtb.

Para confirmar se a ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 β são mediadas diretamente pelo bacilo, efetuamos um ensaio de inibição de fagocitose in vitro, adicionando o inibidor de citoesqueleto citocalasina D (Cyt-D) ao cultivo de MDM e H37Rv. Utilizamos a condição LPS+ATP como controle de ativação do NLRP3 inflamassoma, como explicado antes.

A ativação do inflamassoma por Mtb parece ser direta, pois a adição de Cyt-D as culturas aboliu completamente a produção de IL-1 β (Fig.7B). A Cyt-D não afetou a produção de citocina nos MDM tratados com LPS + ATP (Fig.7B).

Figura 7. A ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 β são importantes para controle de crescimento de Mtb em MDM.

(A) Inibição de unidade formadora de colônias (CFU) em H37Rv-MDM (n = 3) pré-tratado com IL-1 β (10 ng/mL) ou partenólídeo (PTD; 10 μ M) versus H37Rv, em seguida, cultivados em meio Middlebrook 7H10 Agar + OADC a 37°C por 21 dias. O crescimento bacteriano no MDM foi avaliado pela contagem das unidades de formação de colônias (CFU/mL).

5.4 O receptor NLRP3 contribui, pelo menos em parte, para ativação do inflamassoma em MDM desafiados com Mtb

Suportados pelos dados genéticos, e com o objetivo de investigar a contribuição específica do receptor NLRP3 na ativação do inflamassoma por Mtb H37Rv, decidimos utilizar duas abordagens: o uso de inibidores químicos para vias específicas de ativação do NLRP3 inflamassoma, e a visualização, em microscopia de fluorescência, do NLRP3 nos agregados (specks) que se formam após a montagem do complexo.

Portanto, como primeiro passo, os MDM foram pré-tratados com um inibidor específico de NLRP3, o MCC-950 (10 μ M), antes do desafio com Mtb H37Rv. O partenólídeo (10 μ M) foi também utilizado como inibidor genérico do inflamassoma. Nos ensaios utilizamos a condição LPS + ATP como controle da ativação do NLRP3 inflamassoma (GATTORNO et al., 2007).

Os níveis de produção de IL-1 β e IL-18 foram comparados nas condições sem e com inibidor (Figura 8).

Figura 8. Inibição do NLRP3 inflamassoma em resposta à micobactéria no MDM humano em resposta a Mtb, e LPS + ATP.

Produção de IL-1 β (A) e IL-18 (B) em MDM (n = 5) pré-tratada com PTD (10 μ M) ou MCC-950 (10 μ M) e depois desafiado com diferente cepa de Mtb. One-way ANOVA foi aplicado para comparar todas as condições dentro de cada grupo (*: p < 0,05).

Enquanto o PTD inibiu quase totalmente a produção de IL-1 β (Fig 8A) e IL-18 (Fig. 8B) tanto nos MDM incubados com Mtb que com LPS+ATP, o MCC-950 inibiu apenas parcialmente a produção das citocinas (p < 0,05). Vale destacar que a inibição específica do NLRP3 afetou mais a produção de IL-18 (71,7 % de inibição comparado com a condição sem inibidor) que de IL-1 β (48,7 %) nos MDM+Mtb, talvez pelo maior nível de produção de IL-18 nesse modelo. De fato, os resultados obtidos na condição LPS+ATP indicam um semelhante nível de inibição do MCC-950 para as duas citocinas (acerca de 50%). Esses dados demonstram a participação do NLRP3 na resposta dos MDM a Mtb H37Rv, embora sugerem que essa via de ativação do inflamassoma não seja única, e que talvez a contribuição do NLRP3 na produção de IL-1 β e IL-18 possa ser eixo específico e não igual para as duas citocinas.

Para tentar caracterizar melhor a ativação do NLRP3 pelo Mtb H37Rv, consideramos, entre os três principais mecanismos (efluxo de K⁺, produção de ROS e liberação de catepsinas lisossomiais), o dano lisossomal e a consequente liberação de catepsinas como possível mecanismo induzido pelo Mtb nos fagócitos, como previamente proposto no

modelo murino de TB (AMARAL, E. P. et al., 2018), e também levando em conta o dado de distribuição de frequência do SNP rs8988 no gene CTSB observado no estudo caso/controle (Tabela 5).

Portanto, os MDM foram pré-tratados com 10 μ M do inibidor da catepsina B CA074 antes do desafio com Mtb H37Rv e a concentração das citocinas foi medida no sobrenadante de cultura. 1 μ g/mL LPS e 1mM ATP foram utilizados como controle positivos de ativação de NLRP3. A comparação da produção de IL-1 β e IL-18 nas condições com e sem inibidor esta reportada na Figura 9.

Figura 9. Efeito da inibição da Catepsina B na ativação do NLRP3 inflamassoma em resposta à micobactéria no MDM humano em resposta a Mtb, e LPS + ATP.

Produção de IL-1 β (A) e IL-18 (B) em MDM (n = 5) pré-tratada com Ca074 (10 μ M) e depois desafiado com diferente cepa de Mtb. Múltiplo teste t foi aplicado para comparar todas as condições dentro de cada grupo (*: p < 0,05).

O CA074 aboliu quase completamente a produção de IL-1 β (Figura 9A) e IL-18 (Fig.9B) em MDM desafiados com H37Rv (acerca de 97% de inibição comparado com a condição sem inibidor), reforçando que o Mtb é capaz de ativar o inflamassoma através da liberação da catepsina B como previamente demonstrado em camundongo (AMARAL, E. P. et al., 2018).

Como esperado, o CA074 reduziu apenas parcialmente a liberação das citocinas na condição LPS + ATP (acerca de 50% de inibição comparado com a condição sem inibidor)

ênfatizando que nessa condiço a ativao do NLRP3 inflamassoma apenas parcialmente dependente da catepsina B; sendo por outro lado, mais importante o fluxo de K⁺ ATP-dependente.

Em conjunto, atravs do utilizo de inibidores qumicos do inflamassoma, demonstramos que o Mtb H37Rv ativa o inflamassoma atravs da liberao de catepsina B e que essa pode ser responsvel pela ativao do NLRP3. O NLRP3 contribui mas no de forma nica para a ativao do inflamassoma pelo Mtb H37RV.

Por fim, a participao do NLRP3 na montagem do inflamassoma em resposta a Mtb H37Rv foi visualizada atravs da marcao dos MDM desafiados com Mtb com anticorpo fluorescente anti-NLRP3 e microscopia de fluorescncia. Tambm nesses ensaios, as condies LPS e LPS+ATP foram utilizadas como controles de ativao do inflamassoma.

A formao de agregados contendo NLRP3 (NLRP3+ “specks”) foi detectada nas imagens adquiridas no microscpio (Figura 10 A) e tambm contabilizada com o programa ImageJ (Figura 10 B).

Um maior nmero de NLRP3+ specks pode ser apreciado nas condies MDM+H37Rv, H37Rv+ATP, LPS e LPS+ATP em comparao com as clulas no tratadas (UN) (Fig.10 A). Essas diferenas resultaram estatisticamente significativa quando o nmero de NLRP3+ foram contados (Fig.10B). O ATP no afetou a formao de NLRP3+ specks nos MDM desafiados com H37Rv, como nas clulas tratadas com LPS (Fig.10 B), mais uma vez nfatizando que o efluxo de K⁺ ATP-dependente no parece ser um mecanismo importante na ativao do NLRP3 pelo Mtb H37Rv.

Figura 10. Mtb H37Rv induz a formação de specks de NLRP3+ em MDM humano

B

(A) MDM de dadores saudáveis (HD-MDM; n=3) foram estimulados com Mtb H37Rv (MOI: 0,033) com ou sem ATP (1 mM) (+ ATP ou sem ATP, respectivamente). Como controle da ativação do NLRP3 inflamassoma, HD-MDM foram tratados com LPS (1 µg/mL) com (LPS+ATP) ou sem ATP (LPS), respectivamente. As células foram fixadas e marcadas com IgG camundongo de NLRP3 anti-humano e IgG conjugada com Alexa 488 anti-camundongo para detectar "specks" (NLRP3+) (verde) contendo NLRP3. Os núcleos foram corados com DAPI (fluorescência azul). A aquisição das imagens foi realizada pelo uso de um microscópio de varredura a laser confocal DMI8. Um experimento representativo foi relatado. Setas brancas indicam specks de NLRP3+. As células podem ser observadas em imagens de luz de transmissão (células). **B** Os specks de NLRP3 foram quantificados com o ImageJ levando em consideração 10 campos. Os dados são apresentados como média ± SE, o teste t múltiplo com pós-teste de Holm-Sidak foi aplicado para comparar células tratadas versus não tratadas (*: p <0,05) e + ATP versus sem ATP (§: p <0,05)

5.5 Cepas de *M.tuberculosis* ativam o inflamassoma nos MDM de modo virulência-dependente

Como o desenvolvimento da TB ativa é o resultado complexo de vários fatores, incluindo a genética do hospedeiro, o ambiente e a biologia do bacilo (O'GARRA et al., 2013), o passo seguinte dessa tese foi avaliar o impacto do fenótipo de Mtb na ativação do inflamassoma.

Para esse propósito os MDM foram desafiado com diferentes cepas de Mtb: BCG (cepa não virulenta), Beijing 1471 (Bj) e MP287/03 (MP) (cepas hipervirulentas). A produção das citocinas IL-1 β (Fig. 11 A), IL-18 (Fig. 11B), TNF (Fig. 11C) LDH (Fig. 11D) foi medida no sobrenadante de cultura e comparadas com os dados obtidos anteriormente com a cepa virulenta comum H37Rv.

Figura 11. Diferentes cepas de Mtb induzem taxa distinta de ativação do inflamassoma no MDM humano

(A) IL-1 β (pg mL), **(B)** IL-18 (pg/mL) e **(C)** TNF (pg/mL) **(D)** LDH (% de citotoxicidade) foram medidas em macrófagos de doadores saudáveis derivados de monócitos (MDM; n = 15) estimulado com Mtb H37Rv, Beijing 1471 (Bj), MP287 / 03 (MP) ou BCG (todos em MOI: 0,033). Como controle de ativação do NLRP3 inflamassoma, HD-MDM foram tratados com LPS (1 μ g/mL) com (LPS+ATP) ou sem ATP (LPS), respectivamente. Dados representam médias $\pm$ SE. One-way ANOVA foi aplicado para comparar todas as condições dentro de cada grupo (*: p < 0,05). O pós-teste de Holm-Sidak foi aplicado para comparar as condições selecionadas dentro de cada grupo (§: p < 0,05).

As cepas H37Rv e Bj induziram a produção de níveis semelhantes de IL-1 β (cerca de 100 pg/mL) pelos MDM, mas superiores aos induzidos por MP (cerca de 2 pg/mL), que resultou um fraco indutor de IL-1 β . A cepa não virulenta BCG foi a que mais induziu IL-1 β , levando a uma produção de citocina de aproximadamente 3 vezes quando comparada com H37Rv ou Bj (p < 0,0001). (Fig. 11A).

Essa diferença entre BCG, H37Rv e Bj não resultou tão evidente, nem significativa (p > 0,05), no caso da produção de IL-18, mesmo que a cepa BCG tenda a induzir maior quantidade de citocina (cerca de 500 pg/mL), especialmente quando comparado ao H37Rv (cerca de 330 pg/mL).

É interessante destacar que a cepa MP, que se demonstrou um fraco indutor de IL-1 β , ativou uma modesta, mas significativa (p < 0,05), produção de IL-18 (cerca de 80 pg/mL), mesmo que essa produção ainda resulte baixa em comparação com as outras cepas (p < 0,001) (Fig. 11B).

A produção de TNF resultou semelhante em todas as condições (> 600 pg/mL) (Fig. 11C).

Não foram observadas morte celular nos MDM desafiados com diferentes cepas de Mtb (p > 0,05) Fig. 11D).

Estes resultados mostraram claramente que todas as cepas de Mtb são capazes de induzir a ativação do inflamassoma. Todas as cepas, com exceção de MP, induzem significativamente a produção de IL-1 β , no entanto, o nível de citocina parece ser dependente da virulência, sendo mais elevada para a BCG em relação a H37Rv ou Bj. O nível de IL-18 parece ser semelhante entre essas três cepas. A cepa MP é a mais diferente em

termos de padrão de ativação do inflamassoma, como previamente evidenciado também por (MASTER et al., 2008).

Em seguida, para avaliar a contribuição do NLRP3 na resposta as diferentes cepas de Mtb, os MDM foram pre-tratados com 10 μ M MCC-950 e a produção das citocinas foi avaliada no sobrenadante de cultura. 10 μ M PTD foi utilizado como inibidor de amplo espectro do complexo.

O MCC-950 inibiu cerca de metade a produção de IL-1 β nos MDM desafiados com H37Rv, Bj e BCG (48,7 %, 52,9 % e 50,3 % de inibição comparado a condição não tratada, respectivamente).

No caso do MP, o MCC-950 reduziu a produção de IL-18, porém não de forma estatisticamente significativa ($p = 0,08$). (Fig.12A-B).

Como esperado, o PTD aboliu completamente a produção de IL-1 β (Fig.12A) e IL-18 (Fig.12B) em todas as condições.

Figura 12. NLRP3 contribue de modo distinto na resposta a diferentes cepas de Mtb.

É reportada a concentração de IL-1 β (A) e IL-18 (B) no sobrenadante de cultura de MDM (n = 5) desafiados com cepas de Mtb de diferente virulência, na presença ou não de inibidor específico de NLRP3, MCC-950 (10 μ M), ou geral do inflamassoma (partenolide, PTD, 10 μ M), H37Rv (cepa virulenta padrão), Bj (Beijing 1471 hipervirulenta), MP (MP287/03 hipervirulenta) e BCG (cepa não virulenta). O teste paramétrico one-way ANOVA foi aplicado para comparar as condições não tratada (meio), MCC-950 e PTD, dentro de cada grupo (*: p <0,05). O pós-teste de Holm-Sidak foi aplicado para comparar as condições selecionadas dentro de cada grupo (§: p <0,05).

Esses dados sugerem que a contribuição do NLRP3 seja parecida entre a cepa de Mtb padrão H37Rv e a cepa hipervirulenta Beijin 1470, enquanto que a se existe uma dependência do NLRP3 para resposta a MP, essa se revelaria apenas para a produção de IL-18, enquanto que essa cepa é uma fraca indutora de IL-1 β . No caso da BCG, a participação de NLRP3 parece ser maior pela produção de IL-18 que de IL-1 β .

5.6 O polimorfismo ganho-de-função rs10754558 C>G no gene *NLRP3* afeta a produção de IL-1 β em MDM estimulados com *M.tuberculosis*

Uma vez demonstrado que o Mtb ativa o inflamassoma através do receptor NLRP3, e levando em consideração os resultados obtido pelo estudo de associação genética que apontam para um papel de proteção do SNP rs107545508 contra o desenvolvimento de TB pulmonar ativa (seção 5.1), foi executada uma análise genótipo-guiada. Portanto, os dados de produção de citocinas por MDM desafiados com as diferentes cepas de Mtb foram agrupados em base ao genótipo de rs10754558 dos indivíduos doadores de MDM, e os grupos comparados dentro de cada condição de desafio.

Os MDM dos indivíduos carreadores do genótipo G/G produziram mais IL-1 β que os demais grupos em resposta a estimulação com Mtb H37Rv (p<0,0001), Figura 13 A). A produção de IL-18 e TNF não parece ser afetada pelo SNP (p>0,05) (Figura 13 B-C). O efeito também é observado para o desafio com BCG (Figura 13 D) e Beijing 1471 (Figura 13 E).). É importante destacar que é possível observar o efeito na produção de IL-1 β a nível plasmático (p=0,02, Figura 13 F). Nesse caso apenas a produção de IL-1 β foi analisada.

Esses dados são os primeiros a demonstrar um efeito direto do polimorfismo rs10754558 C>G na produção de IL-1 β por macrófagos humanos desafiados pelo Mtb, e suportam os resultados do estudo de associação genética onde esta variante foi relacionada com um efeito protetor contra o desenvolvimento da TB, indicando que o *background* genético do hospedeiro afeta a entidade de ativação do inflamassoma e desta forma pode influenciar a resposta individual (resistencia/susceptibilidade) a Mtb.

Figura 13. Efeito funcional do SNPs rs10754558 sobre a produção de IL-1 β nos MMD

(A) IL-1 β (B) IL-18, (C) TNF dos MMD de 12 indivíduos saudáveis estimulados com H37Rv com o modelo genético recessivo de herança do rs10754558 (C/C-C/G: n=8; G/G: n=4). (D) M ϕ desafiados com BCG (n=12), e (E) Beijing 1471 (n=6) (F) nível plasmático com modelo genético recessivo de herança (BCG: C/C-C/G: n=10; G/G: n=2, H37Rv e Beijing 1471: C/C-C/G, n=4; G/G, n=2). Múltiplo teste T com comparação múltipla de Holm-Sidak's. O nível de significância foi p<0,05.

5.7 Níveis plasmáticos de citocinas identificam diferentes graus de ativação do inflamassoma em pacientes com TB pulmonar e seus contatos e correlacionam com o desenvolvimento da doença ativa

MAYER-BARBER et al. (2014), recentemente relataram o desequilíbrio dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IFN- γ em pacientes com TB grave, sugerindo que um aumento de IFN- γ e a contemporânea diminuição de IL-1 β resultariam em um defeito de controle da replicação por Mtb levando a um pior prognóstico da infecção (MAYER-BARBER et al., 2014). Os mesmos autores também sugerem a utilização desse e de outros mediadores inflamatórios plasmáticos para acompanhamento clínico do desfecho da infecção.

No entanto, até agora, ainda não está claro se essa interação complexa entre a IL-1 β e outros mediadores inflamatórios poderia desempenhar um papel no primeiro passo da infecção pelo Mtb, e não apenas na infecção já estabelecida.

Para tentar esclarecer melhor esse ponto, e averiguar a possibilidade de utilizar esses mediadores para distinguir pacientes e indivíduos expostos mas sem TB (infecção latente ou resistência a infecção), procuramos um grupo de pacientes com TB recém diagnosticada (TB) e seus contatos (CNT) provenientes de área endêmica de TB (Amazônia brasileira) para comparar com doadores saudáveis (HD) de área não endêmica (São Paulo, SP, Brasil) tanto os níveis plasmáticos de citocinas selecionadas (IL-1 β , IL-18, IFN- α , TNF), quanto a responsividade dos seus MDM a desafio com LPS+ATP (medida de ativação específica do NLRP3 inflamassoma), que será descrita na próxima seção.

Por questões logísticas e para evitar o congelamento e envio do sangue ou das células isoladas, as coletas dos indivíduos da Amazônia brasileira e os relativos ensaios foram efetuados em Manaus, respectivamente na Clínica Cardoso Fontes e no Laboratório de Cultura Celular do ICB da UFAM. Apenas a dosagem da citocinas foi efetuada no ICB/USP para todas as amostras tanto de pacientes, contatos e de controles.

Todas as citocinas, com exceção da IL-18, pareciam ser reguladas positivamente na TB e na CNT em relação à HD (Figura 14). Digno de nota foi observada diferença significativa no nível plasmático de IL-1 β e IFN- α entre TB e CNT. A concentração de IL-1 β é

significativamente menor na TB (20 pg/mL) do que na CNT (30 pg/mL; $p = 0,002$), enquanto a concentração de IFN- α está aumentada na TB (76,5 pg / mL) comparada à CNT (43,6 pg / mL, $p = 0,018$). Nenhuma diferença significativa foi observada para o TNF quando comparamos os grupos TB e CNT ($p > 0,05$).

Figura 14. Nível plasmática de citocinas em pacientes com TB pulmonar ativa e seus contatos, e no grupo controle de área não endêmica

Níveis (pg/mL) de IL-1 β , IL-18, TNF e IFN- α foram comparados no plasma de doadores saudáveis (HD; $n = 30$), pacientes com TB (TB; $n = 27$) e contatos (CNT; $n = 27$). Os dados representam média $\pm$ SE. One-way ANOVA foi aplicado para comparar todas as condições dentro de cada grupo (*: $p < 0,05$). O pós-teste de Holm-Sidak foi aplicado para comparar as condições selecionadas dentro de cada grupo (&: $p < 0,05$).

Esses resultados confirmaram resultados anteriores (MAYER-BARBER et al., 2014), reforçando que os pacientes com TB apresentaram um desequilíbrio entre IL-1 β e IFN- α , mas também mostraram pela primeira vez que os “contatos domiciliares” de área endêmica são caracterizados por diferentes níveis plasmáticos das citocinas analisadas comparado aos pacientes com TB ou a população geral da área não endêmica da TB, em particular não apresentando aumento de IFN- α mas apenas de IL-1 β .

Em seguida, realizamos uma análise de correlação canônica entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e os dados de baciloscopia disponíveis para os indivíduos com TB e seus contatos. Os resultados são apresentados graficamente na Figura 15.

Figura 15. O nível plasmático da IL-1 β /IFN-I correlaciona com a doença ativa.

Análise de correlação canônica entre níveis plasmáticos de IL-1 β e baciloscopia em pacientes com TB ($n = 15$) e seus contatos ($n = 12$). Vectors vermelhos indicam regiões de indivíduos agrupados de acordo com os níveis plasmáticos de IL-1 β (IL-1 β) ou resultados de baciloscopia de expectoração (Mtb+ ou Mtb-).

Como esperado, os níveis plasmáticos de IL-1 β resultaram inversamente correlacionados com os dados de baciloscopia, e a análise separou claramente os indivíduos com TB (IL-1 β menor) dos contatos (baciloscopia negativa e IL-1 β elevada). Foi possível agrupar os pacientes mais graves (baciloscopia elevada, menor IL-1 β), pacientes menos graves (baciloscopia baixa, maior IL-1 β).

A correlação não acontece quando incluímos na análise os níveis plasmáticos de IL-18.

Esses dados confirmam mais uma vez que a produção de IL-1 β é um importante fator contribuinte para o controle de Mtb e que essa resposta poderia ser medida sistemicamente.

Levando em conta a importância do nível de IL-1 β para uma adequada resposta a Mtb, e considerando que o demonstramos que polimorfismo rs10754558 afeta a produção de IL-1 β pelo menos em ensaios in vitro, analisamos o efeito do polimorfismo sobre os níveis plasmáticos da citocina em pacientes com TB recém diagnosticada (indivíduos saudáveis não apresentam níveis detectáveis de IL-1 β).

Como mostrado pacientes carregadores do genótipo homozigote pelo alelo polimorfo (G/G) apresentam maiores níveis plasmáticos de IL-1 β comparados com os demais grupos ($p=0,02$), sugerindo que, de acordo com quanto demonstrado anteriormente, esses pacientes poderão responder melhor ao bacilo e ter um melhor prognóstico da infecção.

5.8 Perfil de ativação do NLRP3 inflamassoma em pacientes com TB pulmonar ativa e seus contatos

Tentando entender melhor a diferença entre os grupos de indivíduos com TB ativa e seus CNT em termos de ativação do NLRP3 inflamassoma, e levando em conta que indivíduos com ativação crônica do NLRP3 inflamassoma apresentam uma taxa de ativação limitada em resposta a PAMPs comuns, tais como LPS e especialmente LPS+ATP, desafiamos os MDM isolados de indivíduos TB e seus CNT com LPS ou LPS+ATP, e comparamos a produção de IL-1 β entre esses grupos e também com MDM de indivíduos controles procedentes de área não endêmica.

Como pôde ser observado na Figura 16, enquanto a produção de IL-1 β induzida por LPS não variou significativamente entre os grupos, os MDM de pacientes produziram menor quantidade de IL-1 β em resposta a LPS+ATP, comparada aos MDM de CNT e HD ($p<0,0001$). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre as células de CNT e HD ($p>0,05$).

Figura 16. Diferente resposta ao LPS+ATP de MDM de pacientes com TB, contatos e controles.

MDM de doadores sadios (HD; $n = 6$), pacientes com TB (TB; $n = 6$) e seus contatos (CNT; $n=6$), foram estimulados com $1 \mu\text{g/mL}$ LPS por 24 horas com ou sem adição de 1mM ATP por 15 minutos no final da incubação, e a liberação de IL-1 β no sobrenadante de cultura foi medida por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ erro standard. O teste one-way ANOVA foi aplicado para comparar todas as condições dentro de cada grupo (*: $p < 0,05$). O pós-teste de Holm-Sidak foi aplicado para comparar as condições selecionadas dentro de cada grupo (§: $p < 0,05$) ou entre os grupos (#: $p < 0,05$). UN: MDM não tratados; ATP: MDM + 1mM ATP.

Os dados apontam para uma menor capacidade dos MDM de pacientes com TB de responder a ativadores “clássicos” de NLRP3.

Para melhor investigar esse defeito, analisamos a expressão gênica dos componentes do NLRP3 inflamassoma nos MDM (Figura 17).

Figura 17. Expressão relativa dos MDM dos grupos controle, TB, CNT e HD.

A expressão relativa dos genes *NLRP3*, *IL1B* e *IL18* foi calculada como FC (Fold-Change) para MDM tratado com LPS (1 μ g / mL) isolado de doadores saudáveis (HD; n = 6), pacientes com TB (TB; n = 6) e contatos (CNT) versus células não tratadas, e representadas (log FC). Dados representam média $\pm$ SE. One-way ANOVA foi aplicado para comparar todas as condições dentro de cada grupo (*: p < 0,05).

O LPS não induz a expressão dos genes *NLRP3*, *IL1B* e *IL18* nos MDM dos pacientes com TB, como faz nos MDM dos outros grupos, indicando uma possível deficiência de transcritos e/ou proteínas desses componentes nos pacientes, possivelmente relacionados com a falta de resposta dos MDM *in vitro*.

Outra possível explicação para essa condição pode ser a alta produção de IFN- α observada apenas nos pacientes com TB recém diagnosticada (Fig 14). Sabe-se que IFN-I é um regulador negativo da ativação de NLRP3 (MANGAN et al., 2018).

Em conjunto, esses resultados apontaram para uma condição crônica de pacientes com TB caracterizada por níveis plasmáticos aumentados de IL-1 β e IFN- α que resultaram em uma desregulação do NLRP3 inflamassoma. Além disso, os indivíduos expostos ao Mtb, mas não infectados (CNT) também apresentam uma resposta inflamatória sistêmica aumentada (alto nível de IL-1 β e TNF), porém um menor nível plasmático de IFN- α , resultando em uma melhor capacidade de ativar NLRP3 inflamassoma em resposta à PAMPs comuns em comparação com pacientes com TB, mas semelhantes aos doadores saudáveis

5.9 O eixo NLRC4/IL-18 esta associado a forma extra-pulmonar de TB

Indivíduos carreadores do polimorfismo rs10754558 no gene NLRP3 aparecem estar mais protegidos quando expostos ao Mtb e tem menor risco de desenvolver à TB pulmonar ativa, e isso se deve ao fato deste polimorfismo estar associado a uma maior ativação do inflamassoma e a uma maior produção de IL-1 β que contribui para contenção da replicação bacteriana. Por outro lado, uma vez que o indivíduo é infectado pelo Mtb e desenvolve a doença ativa, o próprio NLRP3 inflamassoma resulta defeituoso. Considerando o possível desfecho da infecção, na última parte deste trabalho, nós investigamos o papel da genética do inflamassoma no prognóstico dos pacientes com TB. Não tendo informações clínicas suficientes para uma análise de associação com variáveis clínicas e/ou de sobrevida dos pacientes, decidimos apenas comparar a apresentação clínica pulmonar e extra-pulmonar, considerando essa última uma forma muito mais grave da forma pulmonar.

Portanto analisamos a distribuição de 4 SNPs selecionados entre os 14 estudados na corte caso/controle nos 288 pacientes com TB pulmonar e nos 64 pacientes com TB extra-pulmonar. Escolhemos estudar a via do NLRP3 (*NLRP3* rs10754558, *IL1B* rs1143634, *IL18* rs1834481) por ter sido demonstrado importante pela resistência a infecção. Além disso, levando em conta os dados obtidos nos ensaios de inibição com MCC-950 e CaO74 que sugeriam a contribuição de um outro receptor do inflamassoma na resposta a Mtb, selecionamos um SNP no gene *NLRC4* (rs479333), lembrando que este receptor também pode ser ativado pela liberação de cathepsin B (LAGE et al., 2013) e poderia então explicar a redução da ativação do inflamassoma na presença de CaO74.

NLRP3 rs10754558 e IL1B rs1143634 não foram associados à forma clínica extra-pulmonar da tuberculose, enquanto variantes de perda de função em NLRC4 e IL18, que não afetou a suscetibilidade à tuberculose, resultaram fatores de risco para o desenvolvimento da forma severa da doença (tuberculose extra pulmonar).

O genótipo homozigote pelo alelo polimórfico do *NLRC4* rs479333 (G/G) resultou significativamente ($p < 0.001$) mais frequente nos indivíduos com TB extra pulmonar (0.60) do que na forma pulmonar da doença (0.39) de acordo com um modelo recessivo de

herança pelo alelo menor (G/G versus C/G+C/C) (Tabela 6) sugerindo que esta variante perda-de-função atue como fator de risco para uma forma mais grave da doença.

De modo semelhante, o genótipo homozigoto pelo alelo polimórfico do *IL18* rs1834481 (G/G) resultou significativamente ($p < 0.001$) mais frequente nos indivíduos com TB extra pulmonar (0.60) do que na forma pulmonar da doença (0.39) de acordo com um modelo recessivo de herança pelo alelo menor (G/G versus C/G+C/C) (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da associação de SNPs em genes codificadores de inflamação em uma coorte brasileira de TB da Amazônia. Símbolo gênico, número de identificação de polimorfismo (SNP ID), frequências de genótipos para pacientes com TB pulmonar extrapulmonar (ETB) e controles saudáveis (HC), valor de p GLM (p), odds ratio (OR) e confiança de 95% intervalo (IC) são relatados, bem como p e OR ajustados para sexo e idade (p_{adj}, OR_{adj}). Modelos de herança de melhor ajuste (codominante: c; dominante: d; recessivo: r; overdominant: o) são relatados. Os resultados estatisticamente significantes após correção de Bonferroni são indicados em negrito. * PTB vs ETB, & ET vs HC.

Gene SNP ID	Genótipos	PTB (n=288)	ETB (n=64)	HC n=288)	p (model)	OR (95%CI)	p _{adj}	OR _{adj} (95%CI)
<i>NLRP3</i> rs1075455 8	C/C	0.68	0.62	0.52	0.671 (r)* 0.049 (r)&	0.66* (0.64 - 2.56) 0.26 (0.06 - 1.28)	0.475* 0,033&	0.96* (0.64 - 3.56) 0.16 (0.02 - 1.29)
	C/G	0.27	0.34	0.35				
	G/G	0.05	0.04	0.13				
<i>NLR4</i> rs49333	C/C	0.23	0.17	0.14	1.376e-07 (d)* 0.947(d)	6.39* (3.10 - 13.19)	0.0006 * 0.658&	5.11* (1.92 - 13.16) 0.78& (0.25 - 2.43)
	C/G	0.39	0.23	0.20				
	G/G	0.39	0.60	0.66				
<i>IL18</i> rs1834481	C/C	0.86	0.75	0.81	0.024(r)* 0.007 (r)&	2.46* (1.07 - 5.65)	0.161* 0.048&	0.37* (0.9 - 1.48)

	C/G	0.14	0.14	0.16		6.48 [§] (1.34 – 31.27)		6.87 ^{&} (0.75 – 63.01)
	G/G	0.00	0.12	0.03				
<i>IL1B</i> rs1143634	G/G	0.80	0.77	0.73	0.133 (d)* 0.399 (d) ^{&}	0.69* (0.42 – 1.02)	0.225*	0.89* (0.62 – 1.42)
	G/A	0.17	0.21	0.22		0.70 ^{&} (0.42 – 1.17)	0.689	0.89 ^{&} (0.32 – 1.07)
	A/A	0.03	0.05	0.04				

Apesar que o grupo de indivíduos com TB extrapulmonar tem um número amostral limitado, gostaríamos de enfatizar que a TB extrapulmonar ainda é uma complicação rara da infecção por *Mtb* também em áreas endêmicas, além de ser o primeiro relato sobre a genética do inflamassoma e o desenvolvimento da TB extrapulmonar.

5.10 Os polimorfismos rs479333 C>G no gene *NLR4* e rs1834481 no gene *IL18* afetam a produção de IL-18 em MDM estimulados com *M.tuberculosis*

Levando em consideração os resultados obtido pelo estudo de associação genética que apontam para um papel de risco dos SNPs rs479333 e rs1834481 para o desenvolvimento da forma mais grave de TB, TB extrapulmonar (seção 5.9), foi executada uma análise genótipo-guiada dos dados de produção de citocinas por MDM desafiados com as diferentes cepas de *Mtb*. (Fig.18D-F). É possível observar que os SNPs rs479333 e rs1834481 afetam especificamente a produção de IL-18 em MDM desafiado por H37Rv, mas não IL-1 β (Fig.18 A-D). Como relatado anteriormente (29, 30), ambos os SNPs afetam o nível plasmático de IL-18 também em nossa coorte (Fig. 18F).

Figura 18. SNPs de NLRC4 e IL18 contribuem para a produção de IL-18 em resposta ao Mtb.

(A) produção de IL-1 β , (B) IL-18 em doadores sadios MDM estimulados com Mtb H37Rv (MOI: 0,033) foi comparada de acordo com o genótipo doador do polimorfismo rs479333 do NLRC4 (polimórfico G/G, n = 5 versus C / C + C / G de tipo selvagem, n = 10). (C) IL-1 β , (D) Concentração de IL-18 (pg / mL) em doadores sadios MDM estimulada com Mtb H37Rv (MOI: 0,033) foi comparada de acordo com o genótipo doador do polimorfismo IL18 rs1834481 (polimórfico G / G, n = 5 versus C de tipo selvagem C / C + C / G, n = 10). (E) TNF de ambos e o nível plasmático de pacientes com TB-18 (n = 10) foi comparado de acordo com o genótipo do polimorfismo IL18 rs1834481 (polimórfico G / G, n = 4 versus tipo selvagem C / C + C / G, n = 6). Dados representam média $\pm$ SE. O teste t múltiplo e o pós-teste de Holm-Sidak foram aplicados para comparar os genótipos C / C-C / G versus G / G (*: p < 0,05). (D) IL-1 β (pg / mL), (E) IL-18 (pg / mL) em doadores sadios MDM estimulados com concentração de Mtb H37Rv (MOI: 0,033) e (F) de IL-18 plasmática (pg / mL) a liberação foi comparada de acordo com o genótipo doador do polimorfismo NLRC4 rs479333 (polimórfico G / G, n = 3 versus C / C + C / G do tipo selvagem, n = 12).

Esses resultados são os primeiros a demonstrar um efeito direto da variante rs479333 e rs1834481 na produção de IL-18 por macrófagos humanos desafiados. Considerando a importância da IL-18 na resposta imune adaptativa e polarização Th1, e na formação do granuloma, importante para contenção dos bacilos.

5.10. O receptor NLRC4 está presente nos agregados de ASC induzidos por Mtb

Como vários dos nossos achados sugeriram a eventual contribuição de outros receptores na ativação do inflamassoma pelo Mtb, e considerando também os últimos resultados da associação genética com a gravidade da TB, hipotetizamos que o Mtb poderia ativar o inflamassoma não apenas através do receptor NLRP3, mas também com a contribuição do receptor NLRC4.

Não tendo, nessa parte final do trabalho, ferramentas disponíveis para melhor definir essa contribuição, realizamos apenas uma marcação fluorescente para o receptor NLRC4 em MDM desafiados com Mtb H37Rv e analisamos a formação de specks contendo NLRC4.

Como é possível observar nas imagens da Figura 19 A, o Mtb induz um aumento de specks NLRC4 positivos (NLRC4+).

Figura 19. Mtb H37Rv induz a formação de specks de NLRC4+ em MDM humano.

(A) MDM de dadores saudáveis (HD-MDM; n=3) foram estimulados com Mtb H37Rv (MOI: 0,033) As células foram fixadas e marcadas com IgG de coelho anti-NLRC4 humano e IgG anti-coelho conjugada s com Alexa 467 (fluorescência vermelha) para detectar "specks" NLRC4+. Os núcleos foram corados com DAPI (fluorescência azul). A aquisição das imagens foi realizada pelo uso de um microscópio de varredura a laser confocal DMI8. Um experimento representativo foi relatado. Setas brancas indicam specks NLRC4+. As células podem ser observadas em imagens de luz de transmissão (células).(B) Os specks de NLRC4 foram quantificados com o ImageJ levando em consideração 10 campos. Os dados são apresentados como média $\pm$ SE, o teste t foi aplicado para comparar células tratadas versus não tratadas (*: $p < 0,05$).

Pela primeira vez, demonstramos a associação genética dos SNPs funcionais NLRC4 e IL18 na TB, e a significativa indução da montagem do inflamassoma NLRC4 pela MDM primária humana em resposta ao Mtb, sugerindo que não apenas o NLRP3 / IL-1 β estão envolvidos na interação hospedeiro / patógeno, mas também na via NLRC4 / IL-18.

6. DISCUSSÃO

A tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública, representando uma das primeiras causas de morte por doenças infecciosas no mundo. De acordo com o OMS, os maiores desafios para alcançar o controle global da TB são um diagnóstico acurado e precoce, e a detecção de TB susceptível ou resistente a fármacos. É urgente a necessidade de biomarcadores de progressão da forma latente da infecção a doença ativa, preditores de risco de reativação da doença depois da cura, e que possam ser utilizados como “endpoints” de trials de fármacos e vacinas.

Nesse contexto, a análise da resposta imune do hospedeiro representa uma estratégia complementar para identificação da infecção em amostras biológicas acessíveis, tais como sangue periférico, saliva, urina, até nos casos de latência, doença paucibalar ou extrapulmonar, e nos casos onde análise do escarro pode ser complicada, como em pacientes pediátricos.

Recentes estudos mostraram com diferentes abordagens (variantes genéticas, perfil de expressão gênica ou de concentração plasmática de proteínas) a relevância da resposta imune inata do hospedeiro no controle da infecção por *Mtb*, na suscetibilidade versus resistência a infecção e na discriminação entre doença latente e ativa. Vale lembrar os trabalhos de análise de perfil de expressão gênica que resultou diferente entre latência e doença ativa que inclui genes relacionados com a imunidade inata tais como *GBP5*, *FCGR1B* (LAUX DA COSTA *et al.*, 2015; SCRIBA *et al.*, 2017) ou marcadores proteicos tais como a CRP, SAA (CHEGOU *et al.*, 2014; YOON *et al.*, 2017).

Nesse contexto global e levando em conta a expertise desenvolvida durante o mestrado sobre variantes genéticas (no locus MHC) e suscetibilidade à TB, e as dificuldades de diagnóstico e cura observadas numa região endêmica para TB que é o Amazonas, surgiu a ideia desse projeto, que se propôs de avaliar marcadores genéticos e protéicos do inflamassoma na suscetibilidade a infecção por *Mtb* e no desenvolvimento da TB.

A principio demonstramos que o polimorfismo de base única rs10754558 C>G no gene *NLRP3* resultou associado a proteção contra o desenvolvimento da TB pulmonar ativa numa corte caso/controle procedente da região amazônica brasileira.

Este polimorfismo, localizado na região 3'UTR do gene *NLRP3*, é considerado uma variante de ganho-de-função, enquanto foi reportado que essa variante leva a um aumento da estabilidade do mRNA de *NLRP3* (HITOMI et al., 2009), e possivelmente afetando o local de ligação do micro-RNA (miR-223), que é conhecido por inibir a tradução do transcrito de *NLRP3* (YANG et al., 2015). Portanto, indivíduos portadores do alelo menor G do rs10754558 apresentariam uma maior disponibilidade do *NLRP3* nas células, que resultaria numa aumentada capacidade de detectar o *Mtb* e elimina-lo ou controla-lo, e por fim limitando o desenvolvimento da TB.

A combinação do polimorfismo Q705K (rs35829419) com a variante non-senso C10X (rs2043211) no inibidor de *NLRP3*, *CARD8*, que resulta em um aumento de ativação do *NLRP3* inflamassoma, e que foi anteriormente associada a um aumento no controle do crescimento de *Mtb* em macrófagos humanos (EKLUND et al., 2014), não resultou significativamente associada ao desenvolvimento de TB pulmonar ativa na coorte brasileira estudada.

Vale destacar que a frequência do rs10754558 na população geral é de cerca de 30% (de 1000Genome), indicando que cerca de 1/3 da população mundial pode ser portadora de um polimorfismo que limita o desenvolvimento da TB. Curiosamente a OMS estima que 1/3 da população mundial é infectada, mas não desenvolvem a TB ativa, ressaltando que este polimorfismo poderia estar contribuindo com essa taxa de resistência.

Além desse resultado original, foi observada também a associação significativa entre polimorfismos perda-de-função no gene do receptor purinérgico *P2X7* com uma aumentada suscetibilidade a desenvolver TB, como previamente descrito em outras populações (FERNANDO et al., 2005; SHEMON et al., 2006). Esses dados aparentemente estão de acordo com a hipótese que uma mais eficiente função do *NLRP3* seja importante na resposta contra *Mtb*, sendo que o *P2X7* medeia a ativação do *NLRP3* através do efluxo de K^+ - ATP-dependente (BROZ, PETR; DIXIT, 2016).

De acordo, camundongos deficientes em componentes do *NLRP3* inflamassoma resultam mais susceptíveis a *Mtb* em modelos experimentais de TB (DORHOI et al., 2012).

Esses primeiros achados apontaram para um papel do inflamassoma na resposta a *Mtb*, e especificamente para o sensor *NLRP3*, portanto desenvolvemos um modelo *in vitro*

para o estudo da interação do Mtb com macrófagos derivados de monócitos humanos, especificamente votado para esse receptor.

Vale ressaltar que existe uma escassez de dados de literatura sobre o estudo do inflamassoma em células primárias humanas na infecção pelo Mtb. Apesar dos avanços com a utilização de modelo experimental de TB, nosso conhecimento sobre os mecanismos subjacentes à progressão da infecção pelo Mtb e o desenvolvimento da doença ativa em humanos ainda não é totalmente compreendido, em parte devido à falta de modelos apropriados para o estudo, e também devido à dificuldade de interpretar a complexa interação que acontece entre genética, o sistema imunológico e microbiológico.

O nosso objetivo foi de poder avaliar no mesmo modelo a contribuição do NLRP3 inflamassoma em MDM desafiados com diferentes cepas de Mtb e ao mesmo tempo confirmar se a variante genética rs10754558 exercesse um papel nessa resposta.

Nossos resultados mostraram que Mtb induz a ativação do NLRP3 inflamassoma nos MDM e uma produção significativa de IL-1 β e IL-18. Diferentes cepas de Mtb induzem a ativação do inflamassoma de um modo “dependente de virulência”. A cepa virulenta padrão H37Rv induz uma produção significativa de IL-1 β e sobretudo de IL-18, com perfil semelhante a cepa hipervirulenta Beijing 1471. A cepa não virulenta BCG promove uma drástica liberação das duas citocinas quando comparado com H37Rv e Beijing 1471. Por fim, a outra cepa hipervirulenta utilizada, a MP287/03, apresentou um comportamento diferente das outras, não sendo capaz de induzir liberação de IL-1 β e promovendo apenas a produção de IL-18 de modo significativo mas em níveis muito inferiores as outras cepas.

Esses achados sugerem três considerações interessantes. A primeira é que diferentemente do reportado por alguns trabalhos, o Mtb ativa e não inibe o inflamassoma (MASTER et al., 2008). Essa diferente interpretação dos resultados é originada, pelos menos nos estudos que podemos ler, da evidencia que qualquer cepa virulenta induz uma menor liberação de IL-1 β comparado com a cepa não virulenta BCG. Esses achados que estão de acordo com os nossos mostram que a virulência do Mtb evoluiu junto com algum mecanismo de escape do inflamassoma (JAMWAL et al., 2016), como mostrado pelo maior grau de produção das citocinas pelo BCG comparado com as demais cepas, corroborando

que a ativação do inflamassoma tem um papel importante na resposta imune contra o Mtb. Um diferente nível de ativação do inflamassoma em resposta as cepas distintas de Mtb foi observada também em modelo murino de infecção, que mostrou que MP287/03 é um fraco indutor de IL-1 β tanto *in vivo* quanto *in vitro* em comparação com H37Rv ou Beijing-1471 (AMARAL, EDUARDO P. et al., 2014). IL-18 não foi avaliada nesse modelo para ter confirmação dos nossos dados.

Não está elucidado qual seria o fator de virulência e/ou o mecanismo de escape na base dessa diferente capacidade de ativar o complexo. Em camundongo foi mostrado que o fator ESAT-6 (MISHRA et al., 2010), o que explicaria a diferença entre BCG e H37Rv, porém não a baixa resposta ao MP287/03. Por outro lado, (MASTER et al., 2008) propuseram que a diferença no nível de ativação do inflamassoma por distintas cepas de Mtb, deve-se a uma metaloprotease, Zmp1, que é expressa por H37Rv mas não por cepas oriundas de *M. bovis*, que portanto seriam as maiores indutoras de IL-1 β . Tanto a cepa BCG que a cepa MP287/03 são oriundas de *M. bovis* porém no nosso modelo elas apresentam comportamento oposto quanto ao grau de ativação do inflamassoma.

Como terceiro ponto a ser ressaltado, observamos um distinto padrão de liberação para IL-1 β e IL-18 frente ao Mtb, sendo os níveis de IL-18 superiores a IL-1 β para todas as cepas testadas. Além disso, a produção de IL-1 β parece ser mais dependente da virulência enquanto que não é observado com a IL-18. Esse resultado seria inesperado se levar em consideração que um PAMP ative o NLRP3 inflamassoma e o complexo tenha a mesma taxa de processamento para as duas citocinas, como por exemplo acontece quando os MDM são desafiados com LPS (Apendice). Porém o Mtb, utilizado como patógeno vivo, apresenta inúmeros padrões moleculares que podem estar contemporaneamente ativando diferentes receptores e vias intracelulares, que podem afetar diferentemente o nível de transcrição das citocinas, ou ativar preferencialmente um ou outro receptor do inflamassoma.

Quando conferimos o nível dos transcritos para *IL1B* e *IL18*, não observamos diferenças significativas, desta forma deixando aberta a questão sobre a contribuição de diferentes receptores do inflamassoma na resposta dos MDM a Mtb, e que esses podem processar de forma preferencial uma ou outra citocina, como foi previamente proposto em

outros modelos de doença. Por exemplo, foi proposto que os receptores NLRP1, NLRP6 e NLRC4 preferencialmente clivariam a IL-18, enquanto que NLRP3 e AIM2 a IL-1 β (CANNA et al., 2014). Em modelo experimental de TB, dois trabalhos mostraram a participação de outros receptores além do NLRP3. No trabalho de (SAIGA et al., 2012) foi demonstrada a contribuição do AIM2 em resposta a Mtb, enquanto que (MASTER et al., 2008) reportaram um papel do NLRC4 nessa resposta. Esse segundo relato corroboraria a hipótese da ativação de um eixo preferencial NLRC4/IL-18 junto com o NLRP3/IL-1 β frente ao Mtb, e de modo virulência e cepa dependente.

De acordo com os resultados do experimento de crescimento bacteriano em MDM tratados com IL-1 β exógena, essa citocina resultou ser fundamental para o controle de Mtb. Esse dado demonstra claramente que a ativação do NLRP3 inflamassoma e a consequente produção de IL-1 β desempenham um papel importante na resposta a Mtb.

Nos perguntamos se o dado de associação da variante ganho-de-função rs10754558 no gene *NLRP3* com a proteção contra o desenvolvimento da TB poderia ser explicado assumindo que esse polimorfismo afetasse a produção de IL-1 β e não apenas o nível citosólico do sensor. Através de ensaios genótipo-guiados, demonstramos que a variante rs10754558 afeta significativamente os níveis de produção de IL-1 β (mas não de IL-18 ou TNF) em MDM desafiados com Mtb, de acordo com o modelo genético recessivo de herança para o alelo menor G. Essa variante também aumenta o nível de IL-1 β no plasma. Esses resultados são os primeiros a demonstrar um efeito direto da variante rs10754558 na produção de IL-1 β por macrófagos humanos desafiados. Previamente (EKLUND et al., 2014) mostraram que a combinação de dois polimorfismos (*NLRP3* p.Q705K e *CARD8* p.C10X) que resultam num aumento de ativação do inflamassoma estão associados a um menor crescimento de Mtb H37Rv em MDM. Vale enfatizar que diferentemente do rs10754558 (frequência: cerca de 30%), a frequência da variante rs35829419 é rara na população geral (<5%; de ensemble.org), sugerindo que acerca de 1/3 da população geral poderia desenvolver uma eficaz resposta a Mtb uma vez exposta ao bacilo.

Os nossos dados comprovam que variantes genéticas que levam a um aumento de ativação do NLRP3 inflamassoma com consequente indução de IL-1 β podem contribuir para o desenvolvimento de uma resposta efetora dos macrófagos contra as micobactérias.

MAYER-BARBER et al. (2014) reportaram um resultado interessante quanto a possibilidade de utilizar citocinas plasmáticas, tais como IL-1 β e IFN- α , como biomarcadores para distinguir pacientes de TB com apresentação clínica grave ou mais branda. Levando em conta os resultados do nosso modelo onde mostramos que Mtb induz produção de IL-1 β e que indivíduos com variante rs10754558 resultam mais protegidos contra TB ativa, efetuamos uma dosagem de citocinas plasmáticas (IL-1 β , IL-18, TNF e IFN- α) num grupo de pacientes com TB e respectivos “contatos” (pessoas que convivem com os pacientes, mas sem vínculo de sangue) procedentes da área endêmica de TB (Amazônia brasileira) e comparamos com um grupo de doadores de sangue de área não endêmica (região metropolitana de São Paulo, SP). Enquanto a IL-1 β plasmática resultou aumentada tanto nos pacientes com TB como nos seus contatos domiciliares em comparação com um grupo controle, o nível de IL-18 não diferiu significativamente entre os três grupos. Entretanto, os níveis de IL-1 β resultaram maiores nos contatos comparados com os pacientes, que por outro lado são caracterizados por níveis plasmáticos elevados de IFN- α .

Esses dados confirmam a possibilidade de utilizar IL-1 β e IFN- α como biomarcadores de doença ativa, como anteriormente proposto (MAYER-BARBER et al., 2014), mas também enfatizam que a exposição a Mtb esta relacionada com uma indução de IL-1 β (como demonstrado no modelo *in vitro*) e que o nível dessa produção pode estar relacionada com a resistência ou suscetibilidade a desenvolver a TB. Conceito que esta perfeitamente de acordo com o dado de associação genética observado com a variante rs10754558.

É de notar que os testes disponíveis para detecção de latência (como TST, IGRA) são conhecidos por serem limitados especialmente em área endêmica (GAJUREL; SUBRAMANIAN, 2015; LARSON et al., 2011), sendo necessário o desenvolvimento de novos testes com esse objetivo. A medição de citocinas plasmáticas tais como IL-1 β e IFN- α poderia abrir novas perspectivas nesse sentido.

O aumento plasmático de IFN- α apenas nos pacientes com TB ativa chamou a nossa atenção por dois motivos: IFN- α foi descrito em modelo experimental como um inibidor da via do NLRP3 (GUARDA et al., 2011), pacientes no estado de infecção crônica como HIV-1 apresentam uma importante desregulação na ativação do NLRP3 inflamassoma (REIS et al., 2019).

Como tivemos acesso aos pacientes com TB e seus contatos no centro de referência Policlínica Cardoso Fontes de Manaus (AM), decidimos testar a responsividade dos MDM de pacientes e contatos no modelo de ativação clássico do NLRP3 inflamassoma, com LPS e ATP (GATTORNO et al., 2007). Como esperado de acordo com o elevado nível de IFN- α plasmático, os MDM de pacientes com doença ativa resultaram menos responsivos ao desafio comparados com os contatos e também com os MDM do grupo controle utilizados para os demais experimentos. Esses achados sugerem que a ativação do NLRP3 inflamassoma e a consequente produção de IL-1 β são importantes para determinar a resistência ao Mtb, porém uma vez que o indivíduo está infectado e com doença ativa, outros fatores da resposta imune determinarão o prognóstico da doença. De acordo, quando fomos analisar a distribuição de frequência da variante rs10754558 em pacientes com TB pulmonar e TB extra-pulmonar (considerada uma forma grave da doença) não conseguimos detectar uma diferença estatisticamente significativa, enfatizando mais uma vez que uma maior disponibilidade do NLRP3 e uma mais eficiente ativação do NLRP3 inflamassoma não afetam o desfecho da doença ativa.

Por fim, e além dos objetivos que nos propusemos na redação do projeto de doutorado, encontramos dados interessantes quanto a via de ativação do inflamassoma pelo Mtb. Evidenciamos que, de acordo com quanto observado em modelo murino (MASTER et al., 2008; SAIGA et al., 2012), possivelmente NLRP3 não é o único receptor envolvido na ativação do inflamassoma por Mtb.

Inesperadamente observamos que a via ATP/P2X7 não aparenta estar envolvida na ativação do NLRP3 dos MDM por Mtb, como sugerido pelo modelo murino de TB (AMARAL, EDUARDO P. et al., 2014) e por estudos populacionais (SHEMON et al., 2006; SOUZA DE LIMA et al., 2016), porém temos que levar em conta que esse receptor purinérgico também

está envolvido nos processos de regulação biológica, além da ativação do NLRP3 inflamassoma (PICCINI et al., 2008).

Levando em conta que (AMARAL, E. P. et al., 2018) demonstraram, em modelo murino de TB que a liberação de catepsinas lisossomais é um evento chave na ativação de NLRP3 por Mtb, testamos essa via no nosso modelo de MDM humanos e confirmamos que a liberação de catepsina B é um evento chave na ativação do inflamassoma frente a Mtb, e que esse mecanismo possivelmente não afeta apenas a ativação do NLRP3 mas também de outros receptores, sendo que o efeito inibitório é maior quando comparado a inibição específica do NLRP3. É interessante destacar que foi reportado recentemente que a liberação de catepsinas ativa o NLRC4 em um modelo murino de infecção por *Salmonella* (LAGE et al., 2013), sugerindo que, como já observado por (MASTER et al., 2008), que o Mtb possa ativar o inflamassoma através desse receptor. Ainda não está claro como NLRC4 poderia reconhecer a micobactéria, pois, até agora, pelo menos em humanos, foi relatado que ela é apenas capaz de reconhecer o complexo NAIP: flagelina (DUNCAN; CANNA, 2018).

Essa hipótese da possível contribuição do NLRC4 na resposta ao Mtb, também poderia explicar a diferente produção de IL-1 β e IL-18 observada nos ensaios de estimulação dos MDM com as diferentes cepas de Mtb, lembrando que foi já proposto um eixo preferencial NLRC4/IL-18 (CANNA et al., 2014). Os dados de associação genética na casuística caso/controle de TB não auxiliaram no aprofundamento dessa hipótese, sendo que não houve diferenças significativas na distribuição das variantes selecionadas nos genes *NLRC4* e *IL18* entre pacientes com TB e controles. Porém quando comparamos as formas clínicas da doença (TB pulmonar e TB extra pulmonar) observamos uma contribuição significativa dessas variantes com a forma mais grave da doença, sugerindo então que o eixo NLRC4/IL-18 está envolvido na interação entre patógeno e hospedeiro, mas de forma mais importante contribuindo no resultado da infecção. Como sabemos, as citocinas IL-1 β e IL-18 exercem um papel distinto na resposta imune. Enquanto a IL-1 β está envolvida principalmente na ativação do endotélio e fagócitos, a IL-18 está envolvida na homeostase do epitélio e na polarização dos linfócitos T CD4⁺ em células efectoras Th1 produtoras de IFN- γ . Considerando a importância das células produtoras de IFN- γ na formação típica de

granuloma de TB, supomos, portanto, que indivíduos com defeito no eixo NLRC4/IL18 não consigam conter micobactérias nos granulomas, levando a uma eventual disseminação extra-pulmonar.

Esses achados originais e a nossa hipótese são em parte suportados pelos dados de (GEBREMICHAEL et al., 2018) que mostraram um aumento significativo da expressão gênica de NLRC4 em pacientes infectados pelo HIV e com uma forma grave de TB. E interessante destacar que SNPs com perda-de-função em *NLRC4* foram encontrados em pacientes com fibrose cística mais susceptíveis a infecções pulmonares graves, reforçando um papel importante e pouco investigado do NLRC4 na imunidade pulmonar (PAUDEL et al., 2018).

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos achados mostraram pela primeira vez a complexa interação entre a genética do inflamassoma, a virulência do Mtb e o perfil de ativação do inflamassoma no local (modelo in vitro) e no nível sistêmico (plasma).

De acordo com nossa hipótese, no primeiro contato hospedeiro/patógeno, o Mtb ativa uma forte resposta inflamatória tanto em termo de produção de IL-1 β quanto de IL-18, especialmente para a cepa não virulenta (BCG) e a cepa virulenta padrão (H37Rv). Esta resposta é mediada pelo receptor NLRP3 de maneira independente de P2X7, mas dependente de cathepsina B, e a variante de ganho de função no NLRP3 contribui para uma produção elevada de IL-1 β , que por sua vez é especificamente responsável no processo de contenção de Mtb.

Ensaio in vitro e dados de associação genética apoiam o envolvimento da via NLRC4/IL-18 na resposta individual a micobactérias e na determinação do resultado da infecção por Mtb e da gravidade da TB.

Esses achados originais apontaram que o mesmo patógeno poderia ativar a clivagem dependente de inflamassoma de pro-formas de citocinas de acordo com eventos não completamente elucidados, tais como o tipo de cepa bacteriana ou etapas distintas da doença (ie: primeiro contato patógeno/hospedeiro, ou resposta em um indivíduo com infecção estabelecida), ou fatores genéticos.

8. Referências

ABAIS, J. M. et al. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 13, p. 1111-1129, 2015. ISSN 1557-7716

ABDALLA, H. et al. Mycobacterium tuberculosis infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1beta and IL-18 secretion but not to pyroptosis. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40722, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

AMARAL, E. P. et al. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. **PLoS Pathogens**, San Francisco, USA, v. 10, n. 7, p. e1004188, 07/03

AMARAL, E. P. et al. Lysosomal Cathepsin Release Is Required for NLRP3-Inflammasome Activation by Mycobacterium tuberculosis in Infected Macrophages. **Front Immunol**, v. 9, p. 1427, 2018. ISSN 1664-3224 (Print)

ANDRADE, M. R. M. et al. Pathogenic Mycobacterium bovis strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 166-166, 08/03

BARRETT, J. C. Haploview: Visualization and analysis of SNP genotype data. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2009, n. 10, p. pdb ip71, Oct 2009. ISSN 1559-6095 (Electronic)

BELLAMY, R. Genetics and pulmonary medicine bullet 3: Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax**, v. 53, n. 7, p. 588-593, 1998. ISSN 0040-6376.

BENNETT, S. et al. Investigation of environmental and host-related risk factors for tuberculosis in Africa. II. Investigation of host genetic factors. **Am J Epidemiol**, v. 155, n. 11, p. 1074-9, Jun 1 2002. ISSN 0002-9262 (Print)

BERTHELOOT, D.; LATZ, E. HMGB1, IL-1alpha, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. **Cell Mol Immunol**, v. 14, n. 1, p. 43-64, Jan 2017. ISSN 2042-0226 (Electronic)

BIFANI, P. J. et al. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clone family. **JAMA**, v. 275, n. 6, p. 452-7, Feb 14 1996. ISSN 0098-7484 (Print)

BRASIL. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. **Brasília: Ministério da Saúde**, v. 1, p. 434, 2008.

BRASIL. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2011.

BRASIL. Brasil Livre da tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença **Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde** v. 50, 2019.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 407, 06/13/online 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58> >.

BROZ, P. et al. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. **J Exp Med**, v. 207, n. 8, p. 1745-55, Aug 2 2010. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking).

CANNA, S. W. et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. **Nat Genet**, v. 46, n. 10, p. 1140-6, Oct 2014. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking).

CASANOVA, J.-L.; ABEL, L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 55, 01/01/online 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nri1264> >.

CHAO, W. C. et al. Increased resistin may suppress reactive oxygen species production and inflammasome activation in type 2 diabetic patients with pulmonary tuberculosis infection. **Microbes Infect**, v. 17, n. 3, p. 195-204, Mar 2015. ISSN 1769-714X (Electronic)

CHEGOU, N. N. et al. Beyond the IFN-gamma horizon: biomarkers for immunodiagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 43, n. 5, p. 1472-86, May 2014. ISSN 1399-3003 (Electronic)

COLL, R. C. et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nat Med**, v. 21, n. 3, p. 248-55, Mar 2015. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking).

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 393-422, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302046> >.

DENKINGER, C. M. et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, v. 44, n. 2, p. 435-46, Aug 2014. ISSN 1399-3003 (Electronic)

0903-1936 (Linking).

DORHOI, A. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by Mycobacterium tuberculosis is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 374-384, 2012. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141548> >.

DROBNIIEWSKI, F. et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. **JAMA**, v. 293, n. 22, p. 2726-31, Jun 08 2005. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking).

DUNCAN, J. A.; CANNA, S. W. The NLRC4 Inflammasome. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 115-123, Jan 2018. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking).

DYE, C.; FINE, P. E. M. A major event for new tuberculosis vaccines. **The Lancet**, v. 381, n. 9871, p. 972-974, 2013. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60137-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60137-3) >. Acesso em: 2019/06/26.

EKLUND, D. et al. Human gene variants linked to enhanced NLRP3 activity limit intramacrophage growth of Mycobacterium tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 209, n. 5, p. 749-53, Mar 1 2014. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24158955> >.

EUROPEAN CONCERTED ACTION ON NEW GENERATION GENETIC, M.; TECHNIQUES FOR THE, E.; CONTROL OF, T. Beijing/W Genotype Mycobacterium tuberculosis and Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 736-743, 2006. ISSN 1080-6040

1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374453/> >.

FERNANDO, S. L. et al. Gene dosage determines the negative effects of polymorphic alleles of the P2X7 receptor on adenosine triphosphate-mediated killing of mycobacteria by human macrophages. **J Infect Dis**, v. 192, n. 1, p. 149-55, Jul 1 2005. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking).

FLYNN, J. L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2249-2254, 1993. ISSN 0022-1007 1540-9538.

FONSECA, K. L. et al. Experimental study of tuberculosis: From animal models to complex cell systems and organoids. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 8, p. e1006421, Aug 2017. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28817682> >.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, Jan 01 2013. ISSN 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking).

FRANKLIN, B. S. et al. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. **Nat Immunol**, v. 15, n. 8, p. 727-37, Aug 2014. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking).

FRAYLING, T. M. et al. An interleukin-18 polymorphism is associated with reduced serum concentrations and better physical functioning in older people. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 62, n. 1, p. 73-8, Jan 2007. ISSN 1079-5006 (Print)

FREMOND, C. M. et al. IL-1 Receptor-Mediated Signal Is an Essential Component of MyD88-Dependent Innate Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1178-1189, July 15, 2007 2007. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/179/2/1178.abstract> >.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10181, p. 1642-1656, 2019. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3) >. Acesso em: 2019/06/26.

GAJUREL, K.; SUBRAMANIAN, A. K. False-positive QuantiFERON TB-Gold test due to *Mycobacterium gordonae*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, Oct 28 2015. ISSN 1879-0070 (Electronic)
0732-8893 (Linking).

GATTORNO, M. et al. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 9, p. 3138-48, Sep 2007. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking).

GEBREMICAEL, G. et al. Host Gene Expression Kinetics During Treatment of Tuberculosis in HIV-Coinfected Individuals Is Independent of Highly Active Antiretroviral Therapy. **J Infect Dis**, v. 218, n. 11, p. 1833-1846, Oct 20 2018. ISSN 1537-6613 (Electronic)
0022-1899 (Linking).

GETAHUN, H. et al. Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 22, p. 2127-2135, 2015. Disponível em: < <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1405427> >.

GOLDFELD, A. E. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 76-81, 2004. ISSN 14729792.

GRINGHUIS, S. I. et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nat Immunol**, v. 13, n. 3, p. 246-54, Jan 22 2012. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking).

GUARDA, G. et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 213-23, Feb 25 2011. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking).

GUSTINCICH, S. et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 302, Sep 1991. ISSN 0736-6205 (Print)

0736-6205 (Linking).

HAGAR, J. A. et al. Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1250-1253, September 13, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/341/6151/1250.abstract> >.

HALL, N. B. et al. Polymorphisms in TICAM2 and IL1B are associated with TB. **Genes Immun**, v. 16, n. 2, p. 127-133, Mar 2015. ISSN 1476-5470 (Electronic)

1466-4879 (Linking).

HILL, A. V. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 2, p. 373-400, 2001. ISSN 1527-8204 (Print)

1527-8204 (Linking).

HITOMI, Y. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 124, n. 4, p. 779-85 e6, Oct 2009. ISSN 1097-6825 (Electronic)

0091-6749 (Linking).

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 847-56, Aug 2008. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking).

IYER, S. S. et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 311-23, Aug 22 2013. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking).

JAMWAL, S. V. et al. Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. **Scientific reports**, v. 6, p. 23089-23089, 2016. ISSN 2045-2322.

JIN, T. et al. Structures of The HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of The AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor. **Immunity**, v. 36, n. 4, p. 561-571, 04/05 2012. ISSN 1074-7613

JULIANA, C. et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. **J Biol Chem**, v. 285, n. 13, p. 9792-802, Mar 26 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)

K LEMON, J.; R MILLER, M.; N WEISER, J. **Sensing of Interleukin-1 Cytokines during Streptococcus pneumoniae Colonization Contributes to Macrophage Recruitment and Bacterial Clearance.** 2015.

KATO, H.; TAKAHASI, K.; FUJITA, T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. **Immunol Rev**, v. 243, n. 1, p. 91-8, Sep 2011. ISSN 1600-065X (Electronic)

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, Oct 2001. ISSN 1474-1733 (Print)

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-50, May 27 2011. ISSN 1097-4180 (Electronic)

KAYAGAKI, N. et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1246-9, Sep 13 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic)

KRAMNIK, I.; BEAMER, G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. **Seminars in immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 221-237, 2016. ISSN 1863-2300

LAGE, S. L. et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 35, p. E3321-30, Aug 27 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 22 2014. ISSN 1097-4172 (Electronic)

LAN, N. T. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 12, p. 1633-5, Dec 2003. ISSN 1080-6040 (Print)

LARSON, E. M. et al. Dual skin tests with Mycobacterium avium sensitin and PPD to detect misdiagnosis of latent tuberculosis infection. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 15, n. 11, p. 1504-9, i, Nov 2011. ISSN 1815-7920 (Electronic)

LATZ, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 1, p. 28-33, 01/08 2010. ISSN 0952-7915

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)

LAUX DA COSTA, L. et al. A real-time PCR signature to discriminate between tuberculosis and other pulmonary diseases. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 95, n. 4, p. 421-5, Jul 2015. ISSN 1873-281X (Electronic)

LAWN, S. D. et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 349-361, 2013. ISSN 14733099.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57-72, // 2011. ISSN 0140-6736.

LEES, M. P. et al. P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, Toxoplasma gondii, by human and murine macrophages. **J Immunol**, v. 184, n. 12, p. 7040-6, Jun 15 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)

LEVANDOWSKI, C. B. et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 8, p. 2952-2956, 2013. ISSN 1091-6490

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG Vaccine. **Maedica**, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2013. ISSN 1841-9038

2069-6116.

MANGAN, M. S. J. et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 17, n. 8, p. 588-606, Aug 2018. ISSN 1474-1784 (Electronic)

MARTINEZ-HERVAS, S. et al. [Plasma IL-18 levels are related to insulin and are modulated by IL-18 gene polymorphisms]. **Clin Investig Arterioscler**, v. 27, n. 6, p. 265-71, Nov-Dec 2015. ISSN 1578-1879 (Electronic)

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002. ISSN 1097-2765 (Print)

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-65, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

MASTER, S. S. et al. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 4, p. 224-32, Apr 17 2008. ISSN 1934-6069 (Electronic)

MATTEINI, A. M. et al. Novel gene variants predict serum levels of the cytokines IL-18 and IL-1ra in older adults. **Cytokine**, v. 65, n. 1, p. 10-6, Jan 2014. ISSN 1096-0023 (Electronic)

MAYER-BARBER, K. D. et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. **Nature**, v. 511, n. 7507, p. 99-103, Jul 3 2014. ISSN 1476-4687 (Electronic)

MAYER-BARBER, K. D. et al. Caspase-1 independent IL-1beta production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. **J Immunol**, v. 184, n. 7, p. 3326-30, Apr 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)

MISHRA, B. B. et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 1046-63, Aug 2010. ISSN 1462-5822 (Electronic)

MISHRA, B. B. et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. **Nat Immunol**, v. 14, n. 1, p. 52-60, Jan 2013. ISSN 1529-2916 (Electronic)

MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 428-32, Jan 24 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic)

MUNOZ-PLANILLO, R. et al. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142-53, Jun 27 2013. ISSN 1097-4180 (Electronic)

NAKAHIRA, K. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 222-30, Mar 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic)

NAKANISHI, K.; TSUTSUI, H.; YOSHIMOTO, T. Importance of IL-18-induced super Th1 cells for the development of allergic inflammation. **Allergol Int**, v. 59, n. 2, p. 137-41, Jun 2010. ISSN 1440-1592 (Electronic)

NAYAK, S.; ACHARJYA, B. Mantoux test and its interpretation. **Indian dermatology online journal**, v. 3, n. 1, p. 2-6, Jan-Apr 2012. ISSN 2249-5673

O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 475-527, 2013. ISSN 1545-3278 (Electronic)

ONYEBUJOH, P.; ROOK, G. A. W. Focus: Tuberculosis. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 12, p. 930-932, 12//print 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1050> >.

ORME, I. M. The mouse as a useful model of tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 1-3, p. 112-5, 2003. ISSN 1472-9792 (Print)

PAI, M. et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 1, p. 3-20, 2014. ISSN 1098-6618

PARWATI, I. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype is an independent risk factor for tuberculosis treatment failure in Indonesia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 4, p. 553-557, February 15, 2010 2010. Disponível em: < <http://jid.oxfordjournals.org/content/201/4/553.abstract> >.

PAUDEL, S. et al. NLR4 suppresses IL-17A-mediated neutrophil-dependent host defense through upregulation of IL-18 and induction of necroptosis during Gram-positive pneumonia. **Mucosal Immunol**, Oct 2 2018. ISSN 1935-3456 (Electronic)

PICCINI, A. et al. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 23, p. 8067-8072, 2008. ISSN 1091-6490

PONTILLO, A. et al. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 63, n. 2, p. 147-51, Jun 1 2013. ISSN 1944-7884 (Electronic)

1525-4135 (Linking).

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 59, n. 2, p. 121-5, Feb 1 2012. ISSN 1944-7884 (Electronic)

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 352, 04/20/online 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nri3211> >.

RAMIREZ-ALEJO, N.; SANTOS-ARGUMEDO, L. Innate defects of the IL-12/IFN- γ axis in susceptibility to infections by mycobacteria and salmonella. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 34, n. 5, p. 307-317, 2014. ISSN 1557-7465

REIS, E. C. D. et al. Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1291, 2019-June-11 2019. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01291> >.

RICHELDI, L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 174, n. 7, p. 736-42, Oct 1 2006. ISSN 1073-449X (Print)

SAIGA, H. et al. Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. **Int Immunol**, v. 24, n. 10, p. 637-44, Oct 2012. ISSN 1460-2377 (Electronic)

SALEM, J. I. et al. PKO - Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica** v. 37 p. 419 - 424, 2007.

SALEM, J. I. et al. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar no Amazonas. **J. Pneumol**, v. 16, p. 133-136, 1990.

SALLAKCI, N. et al. Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 87, n. 3, p. 225-30, May 2007. ISSN 1472-9792 (Print)

SCHIERLOH, P. et al. Mycobacterium tuberculosis Induced Gamma Interferon Production by Natural Killer Cells Requires Cross Talk with Antigen-Presenting Cells Involving Toll-Like Receptors 2 and 4 and the Mannose Receptor in Tuberculous Pleurisy. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 11, p. 5325-5337, 2007. Disponível em: < <https://iai.asm.org/content/iai/75/11/5325.full.pdf> >.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nat. Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 06//print 2008. ISSN 1754-2189.

SCRIBA, T. J. et al. Sequential inflammatory processes define human progression from M. tuberculosis infection to tuberculosis disease. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006687-e1006687, 2017. ISSN 1553-7374

SHEMON, A. N. et al. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. **J Biol Chem**, v. 281, n. 4, p. 2079-86, Jan 27 2006. ISSN 0021-9258 (Print)

SHEN, C. et al. Genetic association between the NLRP3 gene and acne vulgaris in a Chinese population. **Clin Exp Dermatol**, v. 44, n. 2, p. 184-189, Mar 2019. ISSN 1365-2230 (Electronic)

SHIMADA, K. et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 401-14, Mar 23 2012. ISSN 1097-4180 (Electronic)

SOUZA DE LIMA, D. et al. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. **Infect Genet Evol**, v. 41, p. 240-4, Jul 2016. ISSN 1567-7257 (Electronic)

STUTZ, A. et al. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. **Methods Mol Biol**, v. 1040, p. 91-101, 2013. ISSN 1940-6029 (Electronic)

SUGAWARA, I. et al. Role of Interleukin-18 (IL-18) in Mycobacterial Infection in IL-18-Gene-Disrupted Mice. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2585-2589, 12/23/received

TRACEVSKA, T. et al. Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 7, n. 11, p. 1097-103, Nov 2003. ISSN 1027-3719 (Print)

VALLINOTO, A. C. et al. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Hum Immunol**, v. 71, n. 7, p. 692-6, Jul 2010. ISSN 1879-1166 (Electronic)

VAN EMBDEN, J. D. et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993. ISSN 0095-1137

VARAINE, F.; RICH, M. L.; GROUZARD, V. Tuberculosis: Pratical guide for clinicans, nurses, laboratory technicians and medical auxiliares. **Médecins Sans Frontieres and Partners in Health**, 2014.

VERMA, D. et al. Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 25, n. 4, p. 506-13, Jul 2012. ISSN 1755-148X (Electronic)

VILAPLANA, C.; CARDONA, P.-J. The lack of a big picture in tuberculosis: the clinical point of view, the problems of experimental modeling and immunomodulation. The factors we should consider when designing novel treatment strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 55, 2014-February-14 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00055> >.

WHO. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries:

policy statement., 2011.

WHO. Global Tuberculosis report 2012. 2012.

WHO. Global Tuberculosis report 2016. 2016.

WHO. Global tuberculosis report 2018., 2018.

YANG, Z. et al. MicroRNA-223 regulates inflammation and brain injury via feedback to NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage. **Mol Immunol**, v. 65, n. 2, p. 267-76, Jun 2015. ISSN 1872-9142 (Electronic)

YOON, C. et al. Point-of-care C-reactive protein-based tuberculosis screening for people living with HIV: a diagnostic accuracy study. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 12, p. 1285-1292, Dec 2017. ISSN 1474-4457 (Electronic)

ZEKA, A. N.; TASBAKAN, S.; CAVUSOGLU, C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4138-4141, 2011. ISSN 1098-660X

ZELLER, T. et al. Molecular Characterization of the NLRC4 Expression in Relation to Interleukin-18 Levels. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 8, n. 5, p. 717-26, Oct 2015. ISSN 1942-3268 (Electronic)

ZHAI, W. et al. The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 340, 2019. ISSN 1422-0067.

ZHANG, G. et al. Allele-Specific Induction of IL-1 β Expression by C/EBP β and PU.1 Contributes to Increased Tuberculosis Susceptibility. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004426, 2014.

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis. **N Engl J Med**, v. 368, n. 8, p. 745-55, Feb 21 2013. ISSN 1533-4406 (Electronic)

Appendix

Nesse capítulo são reportados os dados obtidos dos ensaios de padronização tanto do ensaio de ativação de NLRP3 inflamassoma nos macrófagos humanos (Mø) diferenciados de monócitos, com uso de LPS e de cepas de micobactéria. Os resultados obtidos serviram de base para o desenvolvimento dos ensaios celulares apresentados em seguida.

. Padronização do ensaio de ativação do NLRP3 inflamassoma

Macrófagos diferenciados de monócitos de 28 doadores saudáveis foram estimulados com 1µg/mL de LPS por 3, 8, 18, 24 e 48 horas, na presença ou ausência de 1mM de ATP por 15 minutos, e a ativação do NLRP3 inflamassoma foi mensurada através da produção de IL-1β.

Na **Figura 1** estão reportados os resultados da cinética de produção de IL-1β. Após 3, 8 e 18 horas (h), o LPS induziu um aumento na produção de IL-1β nos Mø (3h: 15,05±3,54; 8h: 40,03±6,17; 18h: 40,87±8,87 pg/mL, respectivamente), porém não em níveis estatisticamente significativos quando comparados ao basal (R: 6,70±1,25 pg/mL; p>0,05). Apenas a partir de 24 horas os níveis de IL-1β são encontrados estatisticamente mais elevados em relação ao basal (24h: 81,21±10,78 pg/mL versus R: 6,70±1,25 pg/mL; p<0,0001), além disso, em 48 horas os níveis também são estatisticamente maiores do que no basal (121,9±22,56 pg/mL versus R: 6,70±1,25 pg/mL; p<0,0001), no entanto, não há diferença significativa entre 24 e 48 horas (p>0,05), sugerindo que entre 24 e 48 horas a produção de IL-1β atinge seu platô.

Quando o ATP é adicionado na cultura, o aumento de IL-1β induzido por LPS+ATP se faz significativo já em 3 horas de estimulação (53,23±8,275 pg/mL versus R+ATP 8,79±1,38 pg/mL, p=0,028). A produção de IL-1β é amplificada pelo ATP quando comparada com a condição LPS a partir dos tempos de 8, 18 e 24 horas (8h: LPS 40,03±6,17 pg/mL versus LPS+ATP 121,4±17,47 pg/mL, p=0,0027; 18h LPS 40,87±8,87 pg/mL versus LPS+ATP

163,5±16,0 pg/mL, $p<0,0001$; 24h: LPS 81,21±10,78 pg/mL versus LPS+ATP 182,2±17,0 pg/mL, $p<0,0001$). Em 48 horas o ATP não amplifica a produção de IL-1 β em relação ao LPS (LPS: 121,9±22 pg/mL versus LPS+ATP: 162,1±10,19 pg/mL, $p>0,05$), e foi observado que entre 24 e 48 horas a produção da citocina atinge o platô (LPS+ATP 24 horas: 182,2±17,00 pg/mL versus LPS+ATP 48 horas; 162±10,19 pg/mL, $p>0,05$).

Figura 1. Ativação do NLRP3 inflamassoma em macrófagos diferenciados de monócitos em resposta a LPS e ATP. Macrófagos de doadores saudáveis (n=28) foram estimulados com LPS (1 μ g/mL) por 3, 8, 18, 24 e 48 horas, e ATP (1mM) por 15 minutos. Os dados são representados média $\pm$ erro padrão. A comparação entre Mo estimulados e não estimulados (R, resting), assim como entre w/o ATP e ATP, e entre os grupos de estímulos, foi realizada usando Análise de Variância com 1 fator (ANOVA One-way) com comparação múltipla de Holm-Sidak's. O nível de significância foi $p<0,05$, *R (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$): # LPS+ATP (# $p<0,0001$).

Esses resultados mostram que o LPS é capaz de induzir a produção de IL-1 β pelos macrófagos humanos de uma forma tempo-dependente, e que o ATP extracelular amplifica este efeito, como previamente demonstrado (STOFFELS et al., 2015)

Os macrófagos reconhecem o LPS (PAMP) através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como Toll-like (i.e.:TLR4) (KAWAI; AKIRA, 2011), considerado como um primeiro sinal importante na ativação de NLRP3 inflamassoma (BAUERNFEIND, F. G. et al., 2009), enquanto que o efluxo de K⁺ induzido pelo ATP extracelular (DAMP) representaria um segundo sinal para ativação do NLRP3 inflamassoma através do canal iônico ATP dependente P2X7 (MUNOZ-PLANILLO et al., 2013).

De acordo com os resultados observados, escolhemos o tempo de estimulação de 24 horas para os nossos ensaios, considerando que nesse tempo houve uma maior produção de IL-1 β nos M ϕ estimulados apenas com LPS quanto com LPS e ATP.

Também foi avaliada a produção de uma citocina inflamatória não relacionada com o inflamassoma, o TNF, nos M ϕ estimulados com 1 μ g/mL de LPS por 24 horas e 1mM de ATP por 15 minutos (**Figura 2**). Como esperado, o LPS induz uma produção significativa de TNF- α (LPS: 769,9 $\pm$ 29,13 pg/mL versus R: 14,44 $\pm$ 1,99 pg/mL, $p < 0,0001$). no entanto não existe diferença significativa na produção de TNF- α quando o ATP é adicionado na cultura (LPS+ATP: 798,4 $\pm$ 24,35 contra LPS: 769,9 $\pm$ 29,13; $p = 0,5178$), indicando que a produção de TNF- α não é dependente da ativação do inflamassoma, pelo menos do NLRP3 inflamassoma, como previamente observado em macrófagos de camundongos (BARBERÀ-CREMADES et al., 2017).

Figura 2. Produção de TNF- α em macrófagos diferenciados de monócitos em resposta a LPS e ATP. Macrófagos de doadores saudáveis ($n=28$) foram estimulados com LPS ($1\mu\text{g/mL}$) por 24 horas e ATP (1mM) durante o tempo de 15 minutos. Os dados são representados média $\pm$ erro padrão, análise foi realizada usando Análise de Variância com 1 fator (ANOVA One-way) com comparação múltipla de Holm-Sidak's. O nível de significância foi $p<0,05$ (**** $p<0,0001$; ns sem diferença significativa).

Em seguida para avaliar o efeito da estimulação com LPS nos M ϕ em termo de expressão dos componentes do inflamassoma, verificamos a modulação dos genes *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18* após 3, 8, 18 e 24 horas da estimulação com LPS.

O LPS induziu um aumento significativo da expressão dos genes *NLRP3* e *IL18* ($p<0,05$) de forma tempo dependente (**Figura 3**). Após 24 horas o LPS induziu uma expressão 4 vezes maior de *NLRP3* quando comparado com os macrófagos não estimulados (LPS 24h: $4,609\pm1,20$ versus R $1,000\pm0,00$, $p=0,023$), estimulados por 3 (LPS 24h: $4,609\pm1,20$ versus LPS 3h: $1,429\pm0,354$, $p=0,045$) e 8 horas (LPS 24h: $4,609\pm1,20$ versus LPS 8h: $1,241\pm0,440$, $p=0,035$). De forma semelhante, *IL18*, também apresentou maior expressão

em 24 horas quando comparados com 3 (LPS 24h: $7,481 \pm 1,167$ versus LPS 3h: $2,705 \pm 1,078$, $p=0,024$), 8 ($2,55 \pm 1,132$, $p=0,022$) e 18 ($2,915 \pm 0,8859$ horas de estímulo, $p=0,024$, $p=0,022$ e $p=0,029$, respectivamente). O LPS não induziu modulação significativa da expressão dos genes *IL1B* (Figura 3 C) e *CASP1* (Figura 3 B) ($p>0,05$).

Figura 3 Perfil de expressão dos componentes do inflamassoma em macrófagos diferenciados de monócitos em resposta a LPS. Macrófagos de doadores saudáveis ($n=4$) foram estimulados com LPS ($1\mu\text{g/mL}$) por 3, 8, 18 e 24 horas e ATP (1mM) por 15 minutos e os genes *NLRP3* (A), *CASP1* (B) *IL1B* (C) e *IL18* (D), foram avaliados. GAPDH foi utilizado como gene de referência. Os dados são representados média $\pm$ erro padrão, análise foi realizada usando Análise de Variância com 1 fator (ANOVA One-way) com comparação múltipla de Holm-Sidak's. O nível de significância foi $p<0,05$ (* $p<0,05$; ** $p<0,001$).

Enquanto o nosso dado de *IL1B* esta de acordo com quanto já demosntrado (indução por LPS via NF-kB), nos observamos um aumento de *Il18* que não foi previamente relatado em macrófagos (expressao constitutiva), porem não temos dados sobre a origem das células, se foram de camundongo, linhagem ou humanos (LAMKANFI; DIXIT, 2014).

Em relação a *CASP1* foi mostrado que linhagem celular THP-1 estimuladas com LPS, não aumenta o nível de expressão de *CASP1*, sendo esse gene expresso constitutivamente (LIN, X. Y.; CHOI; PORTER, 2000)

Os nossos dados estão de acordo com (FRANCHI; MUNOZ-PLANILLO; NUNEZ, 2012) aonde se demonstra que a transcrição do *NLRP3* é dependente do NF-kB, e de acordo com o fato que o LPS atua através do TLR4 que ativa esse fator de transcrição (BAUERNFEIND, F. G. et al., 2009; KAWAI; AKIRA, 2011). enquanto o gene da *IL18* e por IRF (KIM et al., 2000). Observa-se que no tempo de 24 horas temos o pico de expressão para *NLRP3*, *IL1B* e *IL18*, enquanto os níveis de *CASP1* estão baixos.

De acordo com os resultados obtidos, decidimos manter apenas a estimulação dos MØ por 24 horas para os demais experimentos. Considerando que a *CASP1* não é significativamente modulada nesses ensaios, a excluímos da nossa investigação.

1. Padronização do ensaio *in vitro* de estimulação de macrófagos com micobactéria

Para determinar as condições de estimulação dos macrófagos com as micobactérias selecionadas para o estudo, decidimos padronizar o ensaio com a cepa BCG. Portanto os macrófagos foram desafiados com BCG com carga de infecção (MOI, do inglês *multiplicity of infection*) decrescente: 10, 1, 0,1, 0.033 e 0.02 (bactéria/MØ), e foi avaliada a ativação do inflamassoma por meio da produção de IL-1 β após 24 e 48 horas de desafio. Como o nosso objetivo era o estudo do NLRP3 inflamassoma, o desafio foi efetuado na presença ou ausência do “segundo” sinal clássico para ativação do NLRP3, 1 mM de ATP por 15 minutos (GATTORNO et al., 2007).

Como observa-se na **Figura 4 (A)** a produção de IL-1 β resultou significativamente elevada independentemente do MOI de BCG utilizado, 10 (24 horas: 374,1 $\pm$ 6,377 pg/mL;

48 horas: $400,0 \pm 9,169$ pg/mL), 1 (24 horas: $366,0 \pm 19,16$ pg/mL, 48 horas: $366,4 \pm 21,72$ pg/mL) e 0,1 (24 horas: $339,9 \pm 23,32$, 48 horas: $341,4 \pm 16,84$ pg/mL) quando comparado com basal (R: $0,9400 \pm 0,1832$ pg/mL) ($p < 0,0001$). Além disso, o uso de ATP como segundo sinal não potencializou a produção de IL-1 β ($p > 0,05$). Ressaltamos também que a quantidade de IL-1 β induzida pelo BCG é aproximadamente 2 vezes maior que aquela induzida pelo LPS (Figura 1).

Quando utilizamos MOI menores (0,033 e 0,02) (Figura 4B), observamos ainda um aumento significativo na produção de IL-1 β induzido pelo BCG quando comparado com o basal (MOI 0,033: $318 \pm 44,48$ pg/mL e MOI 0,02: $138,7 \pm 29,88$ pg/mL, respectivamente; $p < 0,001$ e $p < 0,01$), e também, é possível observar um aumento significativo na produção de IL-1 β na presença do ATP em relação ao basal ($466 \pm 39,44$ pg/mL e $360,0 \pm 80,93$ pg/mL, $p < 0,0001$), além disso, observa-se uma diferença quando comparado as células apenas com BCG em relação BCG e ATP (MOI 0,033: $p = 0,013$; MOI 0,02: $p = 0,016$), sugerindo que o NLRP3 está sendo ativado por BCG, sendo potencializado pelo ATP com baixos MOI e que este efeito não é observado com maiores MOI.

Esses resultados estão de acordo com (BOURIGAULT et al., 2013) onde macrófagos murinos derivados da medula óssea aumentam a produção de IL-1 β em resposta a BCG, no entanto, também tem sido relatado que BCG induz baixa produção de IL-1 β (KRISHNAN; ROBERTSON; THWAITES, 2013), pois não apresenta o sistema de produção ESX-1 que induz a produção de IL-1 β (KOO et al., 2008).

De acordo com esses dados, escolhemos utilizar o MOI=0,033 para os demais experimentos com as cepas virulenta e hipervirulentas, levando em consideração (a) a quantidade mínima de Mtb capaz de ativar o inflamassoma, (b) e de mostrar o efeito do ATP, assim como (c) de preservar a viabilidade dos M ϕ .

Figura 4. Ativação do NLRP3 inflamassoma em macrófagos diferenciados de monócitos desafiados com BCG e ATP. Macrófagos de doadores saudáveis (n=5) foram desafiados com BCG nos MOI de 10, 1, 0,1 (A), 0,033 e 0,02 (B) por 24 e 48 horas, e ATP (1mM) por 15 minutos. Os dados são representados média $\pm$ erro padrão, análise foi realizada usando Análise de Variância com 1 fator (ANOVA One-way) com comparação múltipla de Holm-Sidak's. O nível de significância foi $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).