

FELIPE SILVA

Estudo comparativo da resposta imune do macrófago humano infectado com diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*

São Paulo

2023

FELIPE SILVA

Estudo comparativo da resposta imune do macrófago humano infectado com diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Marcia de Sá Guimarães

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4287
FMVZ

Silva, Felipe

Estudo comparativo da resposta imune do macrófago humano infectado com diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* / Felipe Silva. – 2023.
115 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Orientadora: Profa. Dra. Ana Marcia de Sá Guimarães.

1. Tuberculose. 2. Resposta imune. 3. Macrófagos THP-1. 4. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. 5. *Mycobacterium canettii*. I. Título.



CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Comparative study of immune response of human macrophages infected with different species from the Mycobacterium tuberculosis complex*", protocol number CEUAX 2576250919 (ID 001216), under the responsibility Ana Marcia De Sá Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day October 15, 2019.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Estudo comparativo da resposta imune do macrófago humano infectado com diferentes espécies do complexo Mycobacterium tuberculosis*", protocolado sob o CEUAX nº 2576250919, sob a responsabilidade de Ana Marcia De Sá Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 15 de outubro de 2019.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Silva, Felipe.

Título: Estudo comparativo da resposta imune do macrófago humano infectado com diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho a todos que me acompanharam durante a minha trajetória como pesquisador, desde a iniciação científica até o mestrado. Primeiro, a minha orientadora Pro AnaMarciadeSáG, a pessoa mais inteligente que já conheci. As meninas do laboratório de Micoplasma, em especial a Aline e a May (sa). Gostaria também de dedicar este trabalho as Deusas de Purdue, Naíla e Andrea, que me acolheram com muito amor durante a BEPE. Ao Marcelo, Carol Cisco e Menegas (Fillipe) por toda ajuda na construção e conclusão deste trabalho. Aos meus amigos da formação original do LaPAM, Cristina (Cris K.Z), Gio (Giovanni), Alexandre e, em especial, a Kess (Kerstin), TaianaT (Taiana), Nailão (Naila) e Milão (Camila). A Ritinha que, sem ela eu não teria feito mestrado, e a Marrau (Mayara) que é a irmã que a vida me deu. Por fim, ao meu pai João e, em especial, a minha mãe Alaide que não me deixou desistir do mestrado, lutou para que eu tivesse condições de concluí-lo e que, por isso, está se tornando mestra tanto quanto o seu filho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de números de processo 2016/26108-0 e 2019/21847-8, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de número 001 e à Morris Animal Foundation de número D17ZO-307 pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Ana Marcia por todas as oportunidades, orientação e por ser minha mentora nestes últimos seis anos.

Ao professor Jorge Timenetsky por ter deixado eu utilizar o seu laboratório em todas as vezes que precisei.

Agradeço a professora Denise por toda a ajuda com a metodologia de citometria de fluxo e a Joelcimar do CEFAP pelo auxílio com os equipamentos de citometria.

Agradeço a Carolina Bertelli e ao Tadeu por todo o auxílio técnico.

Ao Marcelo, Carol Cisco e Fillipe pela ajuda com os experimentos de infecção e de citometria de fluxo.

Agradeço a Naila Soler e Taiana Taina pela ajuda com a bioinformática e a Camila Araujo por ter sido minha companheira de NB3 e por ter me auxiliado, do início ao fim, do desenvolvimento deste trabalho.

"It's not really a measure of mental health to be well-adjusted in a society that's very sick."

- The OA

RESUMO

SILVA, FELIPE. **Estudo comparativo da resposta imune do macrófago humano infectado com diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii***. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

A tuberculose (TB) é uma doença de humanos e animais causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Apesar da alta similaridade genética, patógenos do MTBC apresentam variações em predileção hospedeira e virulência. Aqueles adaptados aos humanos incluem *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), distribuído mundialmente, e *Mycobacterium africanum* L5 e L6, restritos ao oeste africano. Dentre espécies adaptadas aos animais, destacam-se *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae*, principais causadores da TB bovina e zoonótica, capazes de infectar diversas espécies hospedeiras, incluindo humanos. Outra micobactéria tuberculosa de importância, que não faz parte do MTBC, é o *Mycobacterium canettii*, oriunda de um ancestral comum ao MTBC e identificada causando TB em humanos no leste africano. Esses são os patógenos de maior relevância para TB humana, sendo a doença zoonótica ou não. Independente do ecotipo bacteriano, a principal característica da patogênese das micobactérias tuberculosas é sua capacidade de sobreviver no interior de macrófagos por meio da manipulação das vias microbicidas. Por consequência, a persistência intracelular dessas bactérias leva a apoptose ou necrose dos macrófagos, contribuindo para controle ou disseminação da infecção. Diversos estudos avaliaram a interação de M.tb com macrófagos e sua persistência intracelular, porém, poucos incluem outros representantes do MTBC. Assim, os objetivos deste estudo foram inicialmente (i) desenvolver uma metodologia de quantificação de bactérias do MTBC (M.tb, *M. africanum* L5 e L6, *M. bovis*, *M. caprae*) e *M. canettii* por citometria de fluxo, para facilitar o desenvolvimento dos experimentos e, em seguida, (ii) comparar as dinâmicas da infecção das espécies de MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1 avaliando a taxa de infecção, índice de fagocitose e morte celular. Primeiramente, verificamos que a quantificação por UFC (unidades formadoras de colônias) de M.tb em meio sólido Middlebrook 7H10 ou 7H9-Ágar suplementados com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) e 18 mM de piruvato de sódio é cerca de 10 vezes maior que as outras espécies do MTBC e *M. canettii*. Para compreender essa discrepância, o citômetro de fluxo LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences) foi empregado para quantificar as bactérias cultivadas em meio líquido comparando duas metodologias de fluorescência: marcação com CF-SE (5-(e-6) carboxyfluorescein, succinilmidyl ester) e transformação com plasmídeo pMSP::dsRed2. Enquanto o CF-SE marcou apenas 40 a 80% das bactérias, dsRed2 foi expresso em ~100% das populações bacterianas. Bactérias-dsRed2 puderam então ser quantificadas com acurácia pela citometria de fluxo após ajustes em *threshold* de PE (*phycoerythrin*) e voltagem PMT (tubo fotomultiplicador) de FSC (*forward scatter*) para a diminuir a oscilação do equipamento e a taxa de aborto de eventos, com baixo *false discovery rate* (FDR) e coeficientes de variações entre replicatas. Com a nova metodologia, as quantificações por UFC e citometria de fluxo mostraram-se equivalentes para M.tb, mas significativamente diferentes nas outras espécies avaliadas, indicando que o meio sólido não é capaz de suportar o crescimento adequado de espécies não-M.tb. Em seguida, com o novo protocolo de quantificação bacteriana, comparamos as taxas de infecção e os índices de fagocitose em macrófagos THP-1 das bactérias do MTBC e *M. canettii* utilizando diferentes

multiplicidades de infecção (MOIs de 2:1, 5:1, 10:1 e 20:1). Ambos os índices se comportaram de forma dose-dependente para todas as espécies, exceto para *M. caprae*, que apresentou índices semelhantes em todas as MOIs, em níveis que só foram obtidos em MOIs mais elevadas (10:1 e 20:1) pelas outras espécies do MTBC. Adicionalmente, os índices de *M. canettii* superaram significativamente os das espécies do MTBC em todas as MOIs. Para explicar este achado, sequenciamos o genoma completo de *M. canettii* e mostramos que a estirpe testada perdeu uma das cópias do gene *pks5* (policetídeo sintase 5) responsável pela síntese de lipooligossacarídeos. A perda espontânea deste gene tem sido associada a uma maior infectividade de *M. canettii* em macrófagos, explicando os achados. Por fim, os níveis de morte celular avaliados durante 96h indicam que *M. bovis* e *M. caprae* induzem níveis maiores de apoptose 24h p.i. em macrófagos THP-1. À medida que a infecção progride, os níveis de necrose aumentam, entretanto *M. caprae* superou todas as espécies em 72h e 96h de infecção. Em conclusão, esse é um estudo comparativo entre as espécies do MTBC que traz importantes contribuições metodológicas e de entendimento da infecção do macrófago por espécies do MTBC e *M. canettii*.

Palavras-chave: Tuberculose, resposta imune, macrófagos THP-1, complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*

ABSTRACT

SILVA, FELIPE. **Comparative study of the immune response of human macrophages infected with different strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium canettii*.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Tuberculosis (TB) is a human and animal disease caused by bacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Despite high genetic similarity, MTBC pathogens show variance in host predilection and virulence. Those adapted to humans include *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), distributed worldwide, and *Mycobacterium africanum* L5 and L6, restricted to West Africa. Among animal-adapted species, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* stand out, the main causatives of bovine and zoonotic TB, capable of infecting several host species, including humans. Another tuberculous mycobacteria of importance, which is not part of MTBC, is *Mycobacterium canettii*, originating from a common ancestor to MTBC and identified as causing TB in humans in East Africa. These are the most relevant pathogens for human TB, whether the disease is zoonotic or not. Regardless of the bacterial ecotype, the main feature of the pathogenesis of tuberculous mycobacteria is their ability to survive inside macrophages by manipulating microbicidal pathways. Consequently, the intracellular persistence of these bacteria leads to apoptosis or necrosis of macrophages, contributing to the control or dissemination of the infection. Several studies evaluated the interaction of M.tb with macrophages and its intracellular persistence, however, few include other MTBC representatives. Thus, the objectives of this study were initially (i) to develop a methodology for quantification of MTBC species (M.tb, *M. africanum* L5 and L6, *M. bovis*, *M. caprae*) and *M. canettii* by flow cytometry, to facilitate the development of experiments and then (ii) to compare the dynamics of infection of MTBC and *M. canettii* species in THP-1 macrophages evaluating the infection rate, phagocytosis index and cell death. First, we verified that the quantification by CFU (colony forming units) of M.tb in solid media Middlebrook 7H10 or 7H9-Agar supplemented with 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose and catalase) and 18 mM of sodium pyruvate it is about 10 times larger than the other MTBC species and *M. canettii*. To understand this discrepancy, the LSR Fortessa™ Cell Analyzer flow cytometer (BD Biosciences) was used to quantify bacteria cultured in liquid medium comparing two fluorescence methodologies: staining bacteria with CF-SE (5-(e-6) carboxyfluorescein, succinylimidyl ester) and transformation with plasmid pMSP::dsRed2. While CF-SE marked only 40 to 80% of bacteria, dsRed2 was expressed in ~100% of bacterial populations. Bacteria-dsRed2 could then be accurately quantified by flow cytometry after adjusting the threshold of PE (phycoerythrin) and PMT voltage (photomultiplier tube) of FSC (forward scatter) to reduce equipment oscillation and the rate of abort events, with low false discovery rate (FDR) and coefficients of variations between replicates. With the new methodology, quantifications by CFU and flow cytometry were equivalent for M.tb, but significantly different in the other evaluated species, indicating that the solid medium is not able to support the adequate growth of non-M.tb species. Then, using the new bacterial quantification protocol, we compared the infection rates and phagocytosis rates in THP-1 macrophages infected with MTBC and *M. canettii* using different multiplicities of infection (MOIs of 2:1, 5:1, 10:1 and 20:1). Both indices behaved in a dose-dependent manner for all species, except for *M. caprae*, which presented similar indices in all MOIs, at levels that were only obtained in higher MOIs (10:1

and 20:1) by other MTBC species. Additionally, *M. canettii* indices significantly outperformed the MTBC species in all MOIs. To explain this finding, we sequenced the complete genome of *M. canettii* and showed that the tested strain lost one *pks5* gene copie (*polyketide synthase 5*) responsible for the synthesis of lipooligosaccharides. Spontaneous loss of this gene has been associated with greater infectivity of *M. canettii* in macrophages, explaining the findings. Finally, the levels of cell death evaluated during 96h indicate that *M. bovis* and *M. caprae* induce higher levels of apoptosis 24h p.i. in THP-1 macrophages. As the infection progresses, necrosis levels increase, however *M. caprae* outperformed all species at 72h and 96h of infection. In conclusion, this is a comparative study between MTBC species that brings important methodological contributions and to the understanding of macrophage infection by MTBC species and *M. canettii*.

Keywords: Tuberculosis, immune response, THP-1 macrophage, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium canettii*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquematização das principais vias de sinalização celular ativadas por receptores de membrana plasmática em infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Adaptado de Mishra, 2017).
- Figura 2 - Esquematização representando os receptores citosólicos ativados na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. (Adaptado de Mishra, 2017).
- Figura 3 - Quantificação das micobactérias por UFC (unidades formadoras de colônias). Micobactérias quantificadas por UFC em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) e 18 mM de piruvato de sódio (7H10-OADC-Pyr) e 7H9-OADC-Pyr com ágar. (A) Cultivo bacteriano fresco em densidade óptica (D.O. $_{600nm}$) aproximadas de 0,4: Os grumos foram removidos do cultivo pela passagem em agulhas de diferentes calibres, decantado, diluído serialmente e plaqueado. (B) Cultivo bacteriano congelado em D.O. $_{600nm}$ aproximadas de 0,4. O estoque bacteriano foi descongelado, centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos, lavados duas vezes com Middlebrook 7H9-OADC-Pyr, resuspendido no mesmo meio, diluído serialmente e plaqueado.
- Figura 4 - Quantificação das micobactérias marcadas com CF-SE por citometria de fluxo. Bactérias cultivadas em Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18mM de piruvato de sódio e 0,05% de Tween 80 (7H9-OADC-Pyr-Tween) foram quantificados por citometria de fluxo utilizando suas características morfológicas e a marcação por CF-SE (5-(*e*-6) *carboxyfluorescein, succinilmidyl ester*). (A) Cultivo bacteriano quantificado citometria de fluxo utilizando morfologia (*não marcadas*) ou marcação por CF-SE (*marcadas CF-SE*). (B) Percentual de bactérias marcadas com CF-SE a partir do meio líquido.
- Figura 5 - Quantificação das micobactérias transformadas com pMSP12::dsRed2 por citometria de fluxo e unidades formadoras de colônia (UFCs). Bactérias cultivadas em Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18mM de piruvato de sódio, 0,05% de Tween 80 (7H9-OADC-Pyr-Tween) e 25 ng/μl de canamicina (7H9-OADC-Tween-Pyr-Can) foram quantificados por citometria de fluxo utilizando seu sinal de fluorescência (PE-A). (A) Comparação entre a quantificação por citometria de fluxo do meio líquido e por UFCs em meio Middlebrook 7H10-OADC-Pyr-Can. (B) Percentual de bactérias identificadas como emitindo fluorescência dsRed2 no meio líquido. (C) Cada replicata é oriunda de um experimento independente cuja D.O. $_{600nm}$ é indicada no eixo x. As médias das replicatas estão representadas pela barra preta. D.O. = densidade óptica.
- Figura 6 - Efeito da quebra de grumos na dispersão bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* na citometria de fluxo. Perfil populacional de *M. tuberculosis* H37Rv transformado com pMSP12::dsRed2 em citômetro LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences, EUA) antes e após protocolo de retirada de grumos com passagens em agulhas e decantação.

Figura 7 - Dispersão populacional dos valores de quantificação das micobactérias em experimentos independentes. (A) Três experimentos independentes de quantificação de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transformado com pMSP12::dsRed2 por citometria de fluxo (CF) e unidades formadoras de colônia (UFC). (B) Experimentos independentes de quantificação por UFC das micobactérias. Bactérias foram quantificadas em meio Middlebrook 7H10 com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18 mM de piruvato de sódio e 25 ng/μl de canamicina.

Figura 8 - Dot plots de citometria de fluxo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transformado com pMSP12::dsRed2. (A, B, C) *M. tuberculosis* H37Rv analisado em protocolo A. (D) Meio Middlebrook 7H9 com 10% OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18 mM de piruvato de sódio, 0,05% de Tween 80 e 25 ng/μl de canamicina submetido ao protocolo de inativação com paraformaldeído 4%. (E, F) *M. tuberculosis* H37Rv analisado no protocolo E.

Figura 9 - Concentrações em bactérias por mililitro (mL) medidas por citometria de fluxo (CF) e unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *Mycobacterium canettii*. (A) Quantificações das bactérias do MTBC e *M. canettii* em citômetro de fluxo LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences, EUA) utilizando diferentes protocolos (A, E e E + ajuste de contagem). (B) Comparação das quantificações obtidas por citometria de fluxo e unidades formadoras de colônia. Bactérias foram quantificadas em meio Middlebrook 7H10 com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18 mM de piruvato de sódio e 25 ng/μl de canamicina. *** $p < 0,0001$ ns: $p = 0,32$.

Figura 10 - Taxa de infecção (i.e. percentual de macrófagos infectados com bactérias-dsRed2) de espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *M. canettii*. (A) *Mycobacterium tuberculosis*; (B) *Mycobacterium africanum* L5; (C) *Mycobacterium africanum* L6; (D) *Mycobacterium caprae*; (E) *Mycobacterium bovis*; (F) *Mycobacterium canettii*. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. Valores apresentados com mediana de triplicatas. Valores acima das barras são as medianas dos percentuais das taxas de cada condição. MOI: multiplicidade de infecção. Apenas comparações estatisticamente significativas são mostradas (i.e. $p \leq 0,05$). Todas as outras comparações par-a-par não indicadas foram não significativas. Análises estatísticas foram realizadas com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas em Prism 9. Controles negativos, isto é, triplicatas de células sem bactérias (x 6) apresentaram uma taxa de eventos considerados positivos (células PE+) de 0.35 a 1.35%.

Figura 11 - Índice de fagocitose (% de bactérias que internalizaram) de macrófagos THP-1 infectados com espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*. Índice foi calculado como sendo: número de bactérias quantificadas pelo citômetro 4h p.i. por poço/número de bactérias inoculadas na monocamada no momento da infecção x 100. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. (A) *Mycobacterium tuberculosis*; (B) *Mycobacterium africanum* L5; (C) *M. africanum* L6; (D) *Mycobacterium caprae*; (E) *Mycobacterium bovis*; (F) *M. canettii*. Valores apresentados com mediana de triplicatas. Valores acima das barras são as medianas dos percentuais

das taxas de cada condição. MOI: multiplicidade de infecção. Apenas comparações estatisticamente significativas são mostradas (i.e. $p \leq 0,05$). Todas as outras comparações par-a-par não indicadas foram não significativas. Análises estatísticas foram realizadas com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas em Prism 9. Índice calculado a partir de controle negativo (i.e., células não infectadas) ficou em 0,014%.

Figura 12 - Contexto gênico dos genes *up* e *downstream* relacionados a *pks5*. A estirpe *Mycobacterium canettii* CIPT 140010059 foi utilizada como referência para recuperar as sequências nucleotídicas dos genes *pks5-1* e *pks5-2*. Posteriormente, as sequências recuperadas foram submetidas ao *blast* local contra os genomas de *M. canettii* C02321 (utilizado neste estudo) e da estirpe laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv. Os resultados do *blast* mostraram alinhamento da *pks1* com 98% de identidade e 99% de cobertura e da *pks5-2* com 94% de cobertura e 99% de identidade, porém, esta última foi alinhada a mesma sequência encontrada na *pks-1*. Os genes *up* e *downstream* foram avaliados e confirmaram que *M. canettii* C02321 perdeu uma das cópias da *pks5*, assim como, a espécie *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Figura 13 - Dinâmica de infecção de macrófagos THP-1 com espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *Mycobacterium canettii*. (A) Número de células por poço ao longo da infecção. Células foram soltas com TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, EUA) e contadas em câmara de Neubauer. (B) Quantificação das bactérias intracelulares ao longo da infecção. Monocamadas foram lizadas com 0.15% Tween 80 e quantificadas em com citometria de fluxo. (C-F) Perfil de morte dos macrófagos THP-1 no tempo de 24 horas (C), 48 horas (D), 72 horas (E) e 96 horas (F) pós infecção. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. Total de células mortas são aquelas identificadas como Live/Dead^{high}. Células em necrose são aquelas identificadas como Live/Dead^{high} CASP3/7-. Células em apoptose são aquelas identificadas como Live/Dead^{high} CASP3/7+. Dado o grande número de comparações com significância estatística, os principais achados são descritos no texto. Barra em preto = controle negativo (i.e. células não infectadas).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7H9-OADC-Tween-Pyr - meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC, 18 mM de piruvato de sódio, 0,05% de Tween 80.

7H9-OADC-Tween-Pyr-Can - meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC, 18 mM de piruvato de sódio, 0,05% de Tween 80 e 25 ng/μl de Canamicina.

AP-1 – Proteína ativadora 1

APC – Células apresentadoras de antígenos

BCCM – Belgian Coordinated Collection of Microorganism

BEI RESOURCES – Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository

CARD – caspase

CDS - *coding DNA sequences*

CF – Citometria de fluxo

CFP10 – *Culture filtrate protein 10 kDa*

CF-SE - *5-(e-6) carboxyfluorescein, succinilmidyl ester*

D.O_{600 nm} – Densidade óptica

DC – Células dendríticas

DsDNA – DNA de fita dupla

ESAT-6 – *Early Secreted Antigenic Target 6 kDa*

ESX1 – *ESAT-6 Secretory System 1*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IF – Índice de fagocitose

IFN – Interferon

IL – Interleucina

L5 – *Mycobacterium africanum* 17458 linhagem 5

L6 – *Mycobacterium africanum* L12222 linhagem 6

LAM – Lipoarabinomannan

LAM – Lipoarabinomannan

LM – Lipomannans

LOS - lipooligosacarídeos

LXA₄ – Lipoxina 4

M.tb – *Mycobacterium tuberculosis*

M.tb – *Mycobacterium tuberculosis*

MA – Macrófagos alveolares

ManLAM – Lipoarabinomannan manolisado

MAPK - *myeloid differentiation primary-response protein 88*

MDDC – célula dendrítica originadas de monócitos humanos de sangue periférico

MDM – macrófagos originadas de monócitos humanos de sangue periférico

MDP – Muramil – dipeptídeo

MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade II

MMP - metaloproteinase de matriz

MOI – Multiplicidade de infecção

MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

NO – Óxido Nítrico

NOS – Espécies reativas de nitrogênio

NOS2/NOS3 – Óxido nítrico sintase

OADC – Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógeno

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGE₂ – Prostaglandina 2

PI3K - fosfatidilinositol-3 kinase

PI3P - fosfatidilinositol-3-fosfato

PIMs – Manosídeos de fosfatidilinositol

pks - polyketide synthase

PMA - *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

PPAR γ - proliferador de peroxissoma gama

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões

PYD - domínio pirina

RD – *Regions of difference*

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rRNA - RNA ribossomais

TB – Tuberculose

TDM - Dimicolato de trealose

TGF - *transforming growth factor*

TLR – Receptores *Toll Like*

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNFR – Receptores TNF

TRIF - *Toll-interleukin-1 receptor containing adaptor inducing IFN- α/β*

tRNA - RNAs transportadores

TSSS – Sistema de Secreção do Tipo VII

UFC – Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 A MICROBIOLOGIA DAS MICOBACTÉRIAS	25
2.2 <i>Mycobacterium canettii</i> E O COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.3 A INFECÇÃO PULMONAR E FORMAÇÃO DE GRANULOMAS	26
2.4 RESPOSTA IMUNE INATA DA TB.....	29
2.4.1 Receptores dos macrófagos e suas vias de sinalização.....	29
2.4.2 Receptores de fagocitose e sinergismo com os PRRs	33
2.4.3 Papel das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta do macrófago contra <i>M. tuberculosis</i>	33
2.4.4 Papel das principais citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas envolvidas na resposta do macrófago contra <i>M. tuberculosis</i>	35
2.5 FUNÇÕES CELULARES ASSOCIADAS AO MACRÓFAGO	36
2.5.1 Fagocitose e o fagossomo	36
2.5.2 Morte celular (apoptose e necrose).....	37
2.6 INFLAMASSOMOS.....	38
2.7 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE BACTERIANA	39
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVOS GERAIS	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3.2.1 Objetivo geral (i).....	43
3.2.2 Objetivo geral (ii)	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 BIOSSEGURANÇA	44
4.2 CULTIVO E ESTOQUE DAS MICOBACTÉRIAS	44
4.3 Objetivo (i)	45
4.3.1 Quantificação das micobactérias em meios de cultura pelo método de UFC.....	45
4.3.2 Quantificação das micobactérias por citometria de fluxo.....	45
4.3.3 Marcação das micobactérias com CF-SE	46
4.3.4 Transformação das micobactérias com o plasmídeo pMSP12::dsRed2	46

4.3.5	Avaliação de diferentes protocolos de quantificação utilizando o citômetro de fluxo <i>LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences)</i>	47
4.3.6	Análises estatísticas	48
4.4	Objetivo (ii)	48
4.4.1	Manutenção e diferenciação das células THP-1	48
4.4.2	Infecção dos macrófagos THP-1	49
4.4.3	Avaliação da taxa de infecção e índice de fagocitose das bactérias MTBC-dsRed2 e <i>M. canettii</i> -dsRed2 em macrófagos THP-1	49
4.4.4	Quantificação da morte celular dos macrófagos THP-1 infectados com as espécies do MTBC- <i>M. canettii</i> -dsRed2.....	50
4.4.5	Análises estatísticas	51
4.4.6	Extração e sequenciamento do DNA da espécie <i>M. canettii</i> C02321	51
4.4.7	Montagem e anotação do genoma	51
4.4.8	Avaliação do contexto gênico das <i>pks5-1</i> e <i>pks5-2</i> de <i>M. canettii</i> C02321	52
5.	RESULTADOS.....	53
5.1	Objetivo geral (i)	53
5.1.1	Crescimento disgônico de espécies do MTBC impede a quantificação por UFC em meio sólido	53
5.1.2	Marcação superficial de membrana com CF-SE resulta em uma população heterogênea de bactérias marcadas e não marcadas	54
5.1.3	Quantificação por citometria de fluxo das bactérias transformadas com plasmídeo pMSP12::dsRed2 garante homogeneidade das células bacterianas marcadas	56
5.1.4	A utilização de Tween 80 e passagem em agulhas promove ruptura dos grumos em meios líquidos.....	58
5.1.5	Otimização dos protocolos de quantificação por citometria de fluxo	59
5.2	Objetivo geral (ii)	66
5.2.1	Exceto <i>M. caprae</i> , as espécies do MTBC e <i>M. canettii</i> infectam macrófagos THP-1 de forma dose-dependente	66
5.2.2	Índices de fagocitose do MTBC e <i>M. canettii</i> em macrófagos THP-1	68
5.2.3	<i>M. canettii</i> C02321 apresenta uma cópia do gene <i>pks5</i> em seu genoma.....	70
5.2.4	Dinâmica de infecção do MTBC e <i>M. canettii</i> em macrófagos THP-1	71
6.	DISCUSSÃO.....	75
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
8.	REFERÊNCIAS	84

9.	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	103
9.1.	FIGURA SUPLEMENTAR 1	103
9.2.	FIGURA SUPLEMENTAR 2	105
9.3.	FIGURA SUPLEMENTAR 3	107
9.4.	FIGURA SUPLEMENTAR 4	109
9.5.	FIGURA SUPLEMENTAR 5	111
9.6.	FIGURA SUPLEMENTAR 6	113
9.7.	FIGURA SUPLEMENTAR 7	114

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada principalmente por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *Mycobacterium canettii*. A TB é a causa número um de mortes por um único agente infeccioso. Bacilos deste gênero podem culminar na forma clássica da doença pela manifestação pulmonar (TB pulmonar) ou pela infecção em outros sítios extrapulmonares (TB extrapulmonar) (ACHARYA *et al.*, 2020). Dados recentes reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) evidenciaram que 10,6 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1.4 milhões morreram pela doença somente em 2021. O Brasil é o único país das américas a estar nos 30 maiores países com alta incidência de TB e de TB em pessoas vivendo com HIV (Vírus da imunodeficiência humana) (WHO, 2022).

Onze espécies constituem o MTBC e são capazes de infectar humanos e animais. Dentre essas espécies, temos as estirpes altamente adaptadas aos humanos (patógenos especialistas) como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium africanum* (L1 e L2) e estirpes com tropismo mais irrestrito de hospedeiro infectando diferentes animais (patógenos generalistas), como *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae*. Essas bactérias evoluíram clonalmente de um ancestral comum entre *M. tuberculosis* e *M. canettii* através de deleções genéticas (RDs; *regions of difference*), mutações nucleotídicas e transposições de elementos de inserção. Devido a esta evolução clonal, os genomas do MTBC possuem similaridade genética de ~99.95% em regiões alinháveis, e grandes recombinações e transferência horizontal de genes são consideradas ausentes (GALAGAN, 2014). As diferentes espécies do MTBC são diferenciadas de acordo com seus padrões de RDs, que servem como padrão ouro da classificação taxonômica. A micobactéria tuberculosa *M. canettii*, diferente das bactérias do complexo MTBC, realiza transferência horizontal de genes e seus mecanismos de recombinação gênica são diferentes, não fazendo parte deste complexo (SUPPLY *et al.*, 2013). Contudo, *M. canettii* ainda compartilha muitos genes homólogos com MTBC, constituindo grande parte do seu genoma (~3.9Kb).

A TB é causada principalmente por *M. tuberculosis* (M.tb) que é transmitida predominantemente por via de aerossóis que, uma vez inalados, atingem os alvéolos e são fagocitados por macrófagos alveolares (COHEN *et al.*, 2018). Apesar de ativarem a maquinaria microbicida dessas células, as bactérias sobrevivem no interior dos macrófagos infectados, interferindo em vias de acidificação do fagossomo e morte celular, retardando o aparecimento da resposta imune adaptativa e induzindo a secreção de citocinas anti-inflamatórias (CHAI *et al.*, 2020). Apesar disso, a resposta imune consegue conter a disseminação bacteriana pelo

aprisionamento do bacilo no interior de granulomas, no qual permanece em um estado de dormência (baixa atividade metabólica e replicativa). O granuloma, principal lesão da TB, é um aglomerado organizado de células imunológicas e pode apresentar características fibróticas, necróticas ou caseosas. O granuloma caseoso é o cenário tardio da infecção, em que sua estrutura é desfeita e a bactéria ativa é liberada nas vias respiratórias, reiniciando seu ciclo de transmissão (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012). As interações patógeno-hospedeiro que levam a persistência bacteriana no sítio da infecção vêm sendo estudadas para *M.tb*, mas são pouco exploradas em outras espécies do MTBC. Assim, propomos com esse estudo expandir o estudo da interação das outras espécies do MTBC e *M. canettii* em macrófagos humanos, avaliando as taxas de infecção e índices de fagocitose, a dinâmica temporal da infecção e a morte celular. Para atingir esses objetivos, enfrentamos alguns desafios que exigiram a padronização de algumas metodologias, e assim também reportamos o desenvolvimento de uma técnica de quantificação de MTBC utilizando citometria de fluxo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A MICROBIOLOGIA DAS MICOBACTÉRIAS

As micobactérias (*Mycobacterium* spp) são microrganismos pertencentes ao filo Actinobacteria e podem ser classificadas de acordo com seu nicho ecológico e patogenicidade: micobactérias patogênicas obrigatórias, são altamente virulentas e transmitidas de humano-humano, animais-humanos e animais-animais; micobactérias potencialmente patogênicas, são patógenos oportunistas que estão presentes no meio-ambiente, infectam espécies específicas de animais e podem infectar humanos imunocomprometidos; e micobactérias saprofíticas ambientais, espécies encontradas no meio-ambiente e que não são patogênicas (HONDA; VIRDI; CHAN, 2018; KAZDA *et al.*, 2009). A principal forma de transmissão das micobactérias patogênicas ocorre por vias aéreas, causando infecção pulmonar que, em alguns casos, podem ocorrer em sítios extrapulmonares (GOPALASWAMY *et al.*, 2020).

Características fenotípicas das micobactérias foram primeiramente descritas por Robert Koch em 1882 (CAMBAU; DRANCOURT, 2014). São bactérias em formato de bacilo e possuem uma parede celular composta por lipídeos complexos e ácidos micólicos. Por isso, as micobactérias não coram pelo método de Gram, mas sim pelo método de Ziehl-Neelsen e são denominadas de bacilo álcool-ácido resistentes. As micobactérias podem ter crescimento rápido ou lento, mas são nutricionalmente exigentes, possuindo metabolismo celular aeróbio, com exceção de algumas estirpes que são microaerófilas e outras que suportam mudanças de ambientes aeróbios para anaeróbios (LEWIS; FALKINHAM, 2015; PFYFFER; PALICOVA, 2015). Outro fenótipo importante das micobactérias é seu crescimento em meios de cultivo em colônias de aspecto liso (do inglês, *smooth*) ou rugoso (do inglês, *rough*) (JULIÁN *et al.*, 2010). Presente principalmente nas bactérias patogênicas, o crescimento rugoso é determinado por um fator de virulência micobacteriano conhecido como fator corda (do inglês, *cording factor*). O fator corda é um dos marcos evolutivos que separa as micobactérias ambientais das micobactérias patogênicas, o que resultou em um grupo de patógenos intracelulares chamado de complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (ORGEUR; BROSCHE, 2018).

2.2 *Mycobacterium canettii* E O COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

O MTBC é constituído por espécies adaptadas a humanos (especialistas) e animais (generalistas). Estruturadas de acordo com sua relação filogenética, as micobactérias adaptadas aos humanos incluem *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* linhagens L1-L4 e L7,

Mycobacterium africanum L5-L6 e linhagens L8-L9 (KANABALAN *et al.*, 2021). Essas espécies também são classificadas em linhagens antigas e linhagens modernas, levando em conta a sua ancestralidade dentro do complexo. As linhagens antigas incluem L1 e L5 a L9 e, exceto pela L1 que é encontrada nas Filipinas, estão geograficamente restritas ao continente africano. Por outro lado, as linhagens modernas L2 a L4 estão globalmente distribuídas, sendo encontradas na Ásia, África, Américas e Europa (CHINER-OMS; COMAS, 2019; KANABALAN *et al.*, 2021). O MTBC é constituído de 9 espécies adaptadas aos animais, das quais *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium bovis* apresentam grande relevância para economia agropecuária e a saúde animal. Adicionalmente, essas espécies também podem ocasionar transmissão zoonótica, contudo, não prevalecem em hospedeiros humanos (GAGNEUX, 2018).

Mycobacterium canettii é uma micobactéria tuberculosa filogeneticamente próxima ao MTBC (NGABONZIZA *et al.*, 2020). O MTBC e *M. canettii* compartilham um ancestral comum, possivelmente uma micobactéria ambiental. *Mycobacterium canettii* é possivelmente um patógeno oportunista e exibe a característica morfológica de colônia lisa. As especiações do MTBC e *M. canettii* são acompanhadas de mutações nucleotídicas e deleções genéticas (CHINER-OMS *et al.*, 2019). Uma dessas mutações aconteceu no *locus* do gene da policetideo sintase *pks5* (do inglês, *polyketide synthase*), resultando em remodelação da parede bacteriana de lisa para rugosa em MTBC e aumento da virulência (BORITSCH *et al.*, 2016a; GAGNEUX, 2018). A partir disso, o MTBC evoluiu de forma clonal, com espécies compartilhando ~99,95% de identidade nucleotídicas, e suas deleções genéticas de até 12.3 Kb (*regions of difference*, RD) são o padrão ouro para classificação taxonômica do complexo (GAGNEUX, 2018). Apesar de compartilhar 98% de identidade com as bactérias do MTBC, o genoma do *M. canetti* é mosaico, apresentando recombinação gênica e transferência horizontal de genes, o que não ocorre dentro do complexo (CHINER-OMS *et al.*, 2019). Por fim, mesmo com a alta similaridade genética entre espécies do MTBC e do *M. canettii* com MTBC, a predileção e persistência populacional desses microrganismos variam de acordo com as linhagens e espécies, sendo necessários mais estudos para o entendimento da adaptabilidade patógeno-hospedeiro.

2.3 A INFECCÃO PULMONAR E FORMAÇÃO DE GRANULOMAS

As infecções por micobactérias tuberculosas ocorrem principalmente por vias aéreas e podem levar a doença pulmonar. Indivíduos infectados e com manifestações clínicas de TB pulmonar expõem o bacilo ao ambiente via aerossol gerado durante a tosse (MARTINEZ *et*

al., 2019). Estes aerossóis ficam em suspensão no ambiente até serem inalados por indivíduos saudáveis. Uma vez nas vias respiratórias, as micobactérias podem estagnar no trato respiratório superior, propiciando infecções extrapulmonares (e.g. infecções de linfonodo e orofaringe), ou podem atingir sítios alveolares, levando a infecção pulmonar (BUSSI; GUTIERREZ, 2019). Ao atingirem os alvéolos, os bacilos são fagocitados por macrófagos alveolares (MA) que, por sua vez, iniciam sua atividade bactericida e induzem a inflamação (COHEN *et al.*, 2018). Entretanto, fatores de virulência presentes em micobactérias patogênicas fazem com que elas prosperem no ambiente intracelular. Dentre eles, lipídeos de membrana e sistemas de secreção do tipo VII (TSSS) especializados conferem resistência a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, interferem em vias de maturação e acidificação fagolisossomal e, por fim, permitem o escape das bactérias para o citosol (MEENA; RAJNI, 2010). Com isso, essas células se tornam nichos de replicação do bacilo nos estágios iniciais da resposta imune inata.

A compreensão da resposta imune inata da infecção com micobactérias até a formação dos granulomas é proveniente, em grande parte, de estudos *in vivo* e *in vitro* com a estirpe M.tb. Lipídeos de membrana de M.tb são reconhecidos pelos MA através de receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptors*, PRRs), promovendo a secreção de sinalizadores celulares e a fagocitose. Após a fagocitose, as micobactérias residem dentro de vacúolos celulares denominados de fagossomos. As citocinas pró-inflamatórias induzidas nesse estágio são membros da família de Interleucinas (IL) 1, Interferon (IFN)- γ e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α (DOMINGO-GONZALEZ *et al.*, 2017). A IL-1 β , secretada perante a ativação dos inflamassomas, faz com que os MA infectados migrem para o interstício pulmonar (COHEN *et al.*, 2018). O IFN- γ ativa as vias microbicidas dos macrófagos infectados, fazendo-os produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS), moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) Classe 2 e promove a maturação dos fagossomo (DE MARTINO *et al.*, 2019; KLIMP *et al.*, 2002; NATHAN *et al.*, 1984). Por fim, a resposta inflamatória é potencializada pela citocina TNF- α que, além de poder regular a apoptose celular, induz a secreção de quimiocinas como CCL5, CXCL9 e CXCL10. Este quadro inflamatório cria um gradiente quimiotático que recruta células dendríticas, neutrófilos e macrófagos derivados de monócitos ao local da inflamação (DOMINGO-GONZALEZ *et al.*, 2017). Entretanto, a M.tb fagocitada utiliza fatores de virulência para sobreviver no interior dos fagossomos, evadindo das respostas imunológicas inatas.

A evasão da resposta inata por M.tb acontece por: (i) manipulação da maturação e acidificação dos fagossomos; (2) acesso da bactéria ao citosol; (3) regulação da morte celular do macrófago infectado. Completado a fagocitose, o fagossomo contendo a M.tb deve ser

direcionado aos lisossomos para a sua acidificação levando, assim, a morte da bactéria (MEENA; RAJNI, 2010). Esse direcionamento é regido por GTPases Rab, mais precisamente, pela transição da Rab 5 para a Rab 7 na membrana fagossomal. Entretanto, a transição (ou maturação) é bloqueada por, por exemplo, lipídeos lipoarabinomannan (LAM) e fosfatase SapM da micobactéria, impedindo a biogênese do fagolisossomo (DERETIC *et al.*, 2006). Adicionalmente, vias de acidificação alternativas, como o recrutamento de V-ATPases ao fagossomo, também são bloqueados (WONG *et al.*, 2011). Em seguida, O TSSS micobacteriano ESX1 (do inglês *ESAT-6 Secretory System 1*) secreta os fatores de virulência ESAT-6 e CFP10 (*Early Secreted Antigenic Target 6 kDa/Culture filtrate protein 10 kDa*) que conseguem lisar membranas fagossomais (PENG; SUN, 2016). Com isso, as micobactérias restringem a acidificação, escapam do fagossomo e acessam o citosol, onde se replicam até lizarem as células e infectarem outras células. Por fim, a apoptose celular, responsável por conter a infecção e aumentar a eficiência do *priming* de células dendríticas com células T, é modulada negativamente por M.tb. Para isso, M.tb restringe a produção de Prostaglandina 2 (PGE₂) e aumenta a de Lipoxina 4 (LXA₄) (BEHAR *et al.*, 2011). Desta forma, células infectadas adquirem um fenótipo necrótico, propício a disseminação bacteriana a outras células do sistema imune.

Com a progressão da infecção e atuação de outras células imunológicas, como células dendríticas (DC), inicia-se o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa. As DC fagocitam as bactérias extracelulares e as células infectadas que entraram em apoptose, processando os antígenos para *priming* com as células T (BEHAR *et al.*, 2011). A partir disso, linfócitos são recrutados ao sítio da infecção e potencializam a liberação de IFN- γ . O aumento do IFN- γ no sítio de infecção leva ao controle da replicação bacteriana, porém, sem a sua completa eliminação (DOMINGO-GONZALEZ *et al.*, 2017). A interação persistente das bactérias com receptores *Toll-Like* (TLR), DC-SIGN e Lectinas tipo C promove a secreção da citocina IL-10. A IL-10 é uma citocina regulatória que diminui a atividade biológica do IFN- γ e, com isso, modula negativamente a atividade microbicida dos fagócitos (REDFORD; MURRAY; O’GARRA, 2011). Outra citocina regulatória induzida por M.tb é o TGF- β (do inglês, *transforming growth factor*), que potencializa a secreção de IL-10 e também retém a ação biológica do IFN- γ favorecendo, assim, a sobrevivência da bactéria (DOMINGO-GONZALEZ *et al.*, 2017; OTHIENO *et al.*, 1999). A falha na erradicação das bactérias gera um estímulo imune persistente, resultando em uma resposta imune robusta, que leva a formação do granuloma. O granuloma é um “sistema de contenção” necessário para impedir a disseminação bacteriana para outros sítios.

O granuloma, constituído de diferentes células imunológicas, tem o papel de conter a progressão da infecção pelas micobactérias. Sua estrutura clássica consiste em centro necrótico caseoso, de caráter pró-inflamatório, cercado por macrófagos de diferentes tipos e, na região externa ao granuloma, de caráter anti-inflamatório, temos células T e B e outras células imunológicas (MARAKALALA *et al.*, 2016). Com a persistência da infecção e as interações do granuloma com o equilíbrio imunológico do hospedeiro, temos diferentes cenários clínicos, determinados pela heterogeneidade do granuloma. A maioria das infecções serão resolvidas, onde a resposta inflamatória local do granuloma é capaz de eliminar o bacilo, tornando-o calcificado. O segundo cenário é a persistência das bactérias dentro dos granulomas em um estado de dormência (não há replicação), contendo a disseminação bacteriana. Por fim, o granuloma pode perder sua vascularização e tornar-se instável devido a perturbações imunológicas, favorecendo a cavitação e acesso dos bacilos as vias respiratórias do hospedeiro, desta forma, favorecendo a transmissão a outros hospedeiros (NDLOVU; MARAKALALA, 2016). Pouco se sabe sobre os determinantes que atribuem a heterogeneidade aos granulomas, assim como, as respostas inflamatórias por eles geradas que levaram a reativação, ou não desses bacilos para a sua disseminação. Contudo, levanta-se a hipótese de que os processos iniciais da infecção pelo bacilo, surgimento de novos granulas, assim como a resposta imunológica local, podem estar ligados com a manifestação da doença ou *clearance* bacteriano (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017).

2.4 RESPOSTA IMUNE INATA DA TB

2.4.1 Receptores dos macrófagos e suas vias de sinalização

Bactérias M.tb são reconhecidas por macrófagos alveolares através de PRRs. Esses incluem os receptores TLR, Lectinas do tipo C, receptores citosólicos e receptores NOD-like (SIA; RENGARAJAN, 2019). Os padrões moleculares associados a patógeno (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns* ou PAMPs) de M.tb que são reconhecidos por esses receptores incluem, por exemplo, os glicolipídios (*e.g.* LAMs, lipomananos – LMs, lipoarabinomananos manosilados - ManLAM, manosídeos de fosfatidilinositol – PIMs) e proteínas *heat shock* (HSP60/65). A interação dos PRRs com os ligantes de M.tb resulta em modulação da fagocitose, apoptose e ativação da ação microbicida dos macrófagos por IFN- γ (SIA; GEORGIEVA; RENGARAJAN, 2015a).

Um esquema das vias de ativação mediadas por esses receptores é apresentado na figura 1 para facilitar o entendimento. Os PAMPs de *M.tb* ativam os receptores TLR de membrana plasmática e TLR endossomais. A ativação de TLRs de membrana citoplasmática como TLR1-6, TLR2-6 e TLR4 levam à expressão de mediadores pró-inflamatórios (KAWAI; AKIRA, 2010). Sua sinalização ocorre via molécula adaptadora MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary-response protein* 88) que propagará a sinalização a duas vias subjacentes. Essas vias são proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a do modulador essencial NEMO, resultando em na liberação de fatores de transcrição da proteína ativadora 1 (AP-1) e NF- κ B, respetivamente. A liberação desses fatores de transcrição leva a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, TNF α , IL-12 e a produção de Óxido Nítrico (NO) (SARAAV; SINGH; SHARMA, 2014). Adicionalmente, a interação do TLR4 com o seu ligante sinaliza a via alternativa TRIF (*Toll-interleukin-1 receptor containing adaptor inducing IFN- α/β*), promovendo a liberação de IFN- β pelo Fator Regulador de Interferon 3 (IRF3) e NF- κ B (VU *et al.*, 2017).

Diferentes componentes da parede de *M. tuberculosis* são reconhecidos pelos receptores TLR. Os ligantes de TLR2 são as lipoproteínas LpqH/LprA e os glicolipídios ManLAM, LM e PIM. Por outro lado, os principais ligantes do TLR4 são as proteínas HSP60/65 (SARAAV; SINGH; SHARMA, 2014). Quando ligado a ManLAM, o TLR2 induz a transcrição de genes do óxido nítrico sintase (NOS2 e NOS3) e de citocinas pró inflamatórias. O TLR4 e os TLR7/TLR9, receptores endossomais que reconhece RNA e DNA CpG metilado de *M.tb*, transcrevem genes codificadores de interferons do Tipo 1 (VU *et al.*, 2017). Apesar da resposta microbida executada pelos TLR, a persistência da infecção gera estímulos contínuos desses receptores, principalmente do TLR2. Com isso, há o aparecimento das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β que, por sua vez, atuam restringindo a ação do IFN- γ e, consequentemente, a ativação dos macrófagos. A deficiência da resposta ao IFN- γ debilitara a síntese de intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico e a produção de moléculas MHCII, restringindo a ação bactericida do macrófago (ESQUIVEL-SOLÍS *et al.*, 2009).

O dimicolato de trealose (TDM), um componente presente em grande quantidade na parede celular de *M.tb*, é reconhecido pelo receptor Mincle. Receptores do tipo Mincle ativam complexos CARD9-Bcl10-MALT1 e, via NF- κ B, induz a produção das citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas estão associadas ao estímulo da resposta imune Th1/Th17 e formação do granuloma. O ligante do receptor Dectin-1 ainda é desconhecido, porém suas vias *downstream* são as mesmas do receptor Mincle e induzem a produção das citocinas IL12p40,

TNF- α , RANTES (CCL5), G-CSF e IL-6 (SCHOENEN *et al.*, 2010). O receptor de Manose se liga à ManLAM do M.tb e irá atuar sob o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ), responsável pela transcrição de genes que traduzirão produtos que controlarão a resposta imune. Dentre estes, podemos citar a ciclooxygenase 2, IL-8 e fator anti-apoptótico mcl-1. A ciclooxygenase 2 e a IL-8 regulam a resposta imune por intermédio de metabólitos de ácido araquidônicos e pelo recrutamento de neutrófilos. O fator anti-apoptótico mcl-1 irá retardar o processo de apoptose dos macrófagos infectados. (ARNETT *et al.*, 2018; PRISCILLA MARIANE CARDOSO *et al.*, 2017; SIA; GEORGIEVA; RENGARAJAN, 2015b).

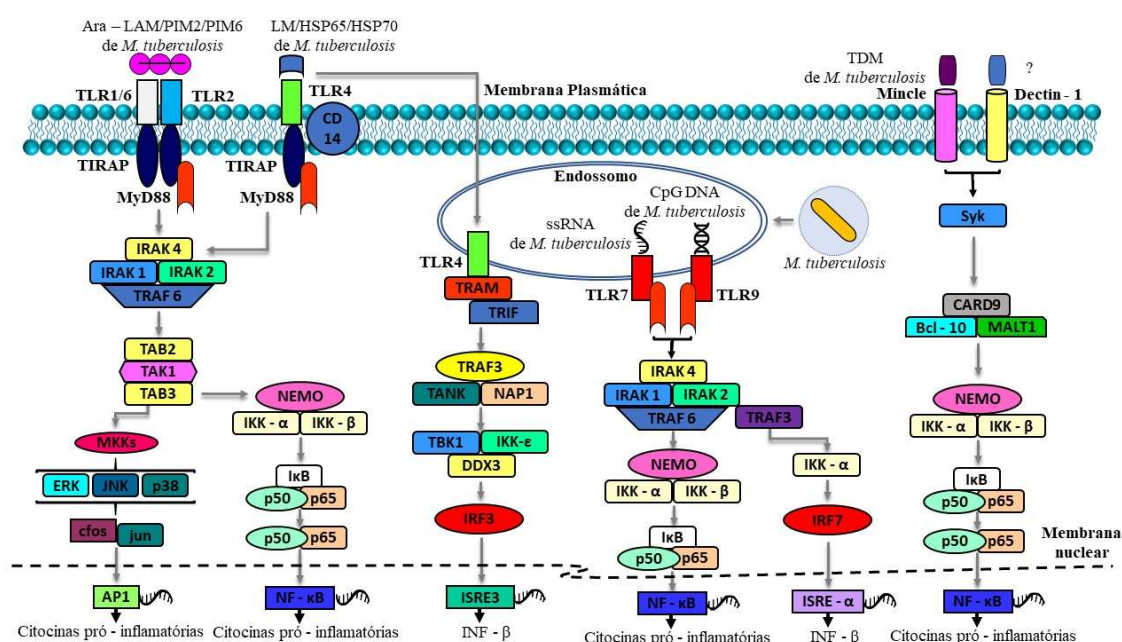


Figura 1. Esquematização das principais vias de sinalização celular ativadas por receptores de membrana plasmática em infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Adaptado de Mishra, 2017).

Os receptores citosólicos *Nod-like*, por intermédio da interação com moléculas de DNA e outros produtos secretadas pelo ESX-1 das micobactérias, promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Figura 2). Alguns destes receptores sinalizam a presença de dsDNA (DNA fita dupla) no citosol pela via STING/TBK1/IRF3 e induzem a produção de IFN- β (MISHRA *et al.*, 2017a). Adicionalmente, pela via de sinalização AIM2, dsDNA pode também promover a ativação do complexo proteico oligomérico do inflamassoma resultando na ativação da caspase-1 e expressão aumentada de IL-1 β (MISHRA *et al.*, 2010a). Os receptores NOD2 realizam o reconhecimento de muramil- dipeptídeo (MDP) de M.tb e promovem a produção de

citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) além de aumentar a expressão de genes pertinentes à autofagia como IGRM (família M GTPase relacionada à imunidade), LC3 e do peptídeo antimicrobiano catelicidina humana (LL-37) (JUÁREZ *et al.*, 2012).

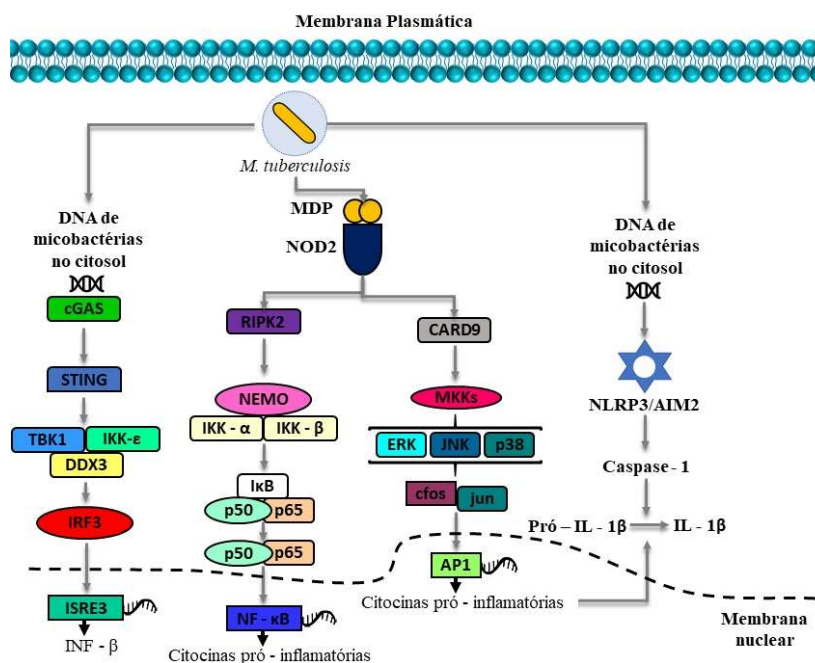


Figura 2. Esquematização representando os receptores citosólicos ativados na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. (Adaptado de Mishra, 2017).

Diversos estudos avaliaram a interação dos PRRs com o *M.tb* com o objetivo de elucidar os mecanismos que fazem com que sua ativação e das suas cascatas de sinalização favoreçam a prevalência bacteriana nas células hospedeiras (MISHRA *et al.*, 2017a; MORTAZ *et al.*, 2015). Os principais fatores de transcrição envolvidos nas cascatas dos PRRs são NF- κ B, AP-1, ISRE3 e ISRE7. Esses fatores de transcrição promovem estímulos sobre genes da resposta imune que traduzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo TNF- α , IL-8, IL-6, IL-10, IL-12, IL-1 β , TGF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-2, CCL5, G-CSF, CXCL1, CXCL9, CXCL-10, e CXCL11, que coordena componentes da resposta imune inata e recrutam células inflamatórias para o sítio da infecção (WANG *et al.*, 2003). Esses mecanismos imunológicos são bastante estudados em *M.tb*, contudo suas avaliações não se estendem às outras bactérias do MTBC.

2.4.2 Receptores de fagocitose e sinergismo com os PRRs

A fagocitose é um processo realizado por células especializadas (fagócitos profissionais: macrófagos, monócitos, células dendríticas) que promovem a ingestão e destruição de células mortas e microrganismos. Para isso, receptores de fagocitose reconhecem o alvo e promovem a reestruturação do citoesqueleto celular para englobamento, por exemplo, de microrganismos (JAUMOILLÉ; WATERMAN, 2020). Os receptores fagocíticos propriamente ditos incluem os Receptores Fagocíticos não Opsônicos, Receptores Fagocíticos Opsônicos e Receptores de Células Apoptóticas (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2020). Para fins didáticos, iremos abordar os receptores com participação no reconhecimento de *M.tb*. Os receptores não opsônicos incluem principalmente as Lectina do Tipo C (e.g. Mincle, receptor de manose, Dectin-1) que interagem diretamente aos microrganismos para induzir a fagocitose. Os receptores Mincle e o receptor de Manose reconhecem TDM e ManLAM de *M.tb*, respectivamente. O receptor Dectin-1 também reconhece *M.tb*, porém seu ligante não é conhecido para este patógeno (MISHRA *et al.*, 2017b). Estes receptores são considerados receptores fagocíticos genuínos uma vez que, quando expressos em células não fagocíticas, garantem a capacidade de indução de internalização (FREEMAN; GRINSTEIN, 2014). Dentre os receptores fagocíticos opsônicos podemos citar os receptores de complemento (CR), sendo o CR3 (também conhecido como CD11b/CD18, Mac-1, $\alpha_M \beta_2$) de grande relevância para *M.tb*. Apesar de ser um receptor de complemento, o CR3 interage com alvos opsonizados e não opsonizados e apresenta grande capacidade de promover a fagocitose (LE CABEC *et al.*, 2002). Os ligantes da parede de *M.tb* reconhecidos por este receptor são Antígeno 85c e oligossacarídeos (VELASCO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2003). Por fim, dentre os receptores que reconhecem células apoptóticas com papel no reconhecimento de *M.tb* está o CD14. O CD14, assim como, os receptores Scavenger e MARCO (receptores não opsônicos) podem não estar envolvidos diretamente na fagocitose, porém atuam sinergicamente com outros receptores (e.g. TLR) no reconhecimento de ligantes de *M.tb* (BOWDISH *et al.*, 2009).

2.4.3 Papel das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta do macrófago contra *M. tuberculosis*

Como abordado anteriormente, diversos processos e estímulos celulares, assim como a secreção de certas citocinas, contribuem para a persistência intracelular das micobactérias patogênicas. O IFN- γ é principalmente secretado por células T CD4 durante a infecção por

M.tb, podendo ser secretado também por macrófagos infectados (CAPPELLI *et al.*, 2001). Essa citocina ativa a função bactericida dos macrófagos, além de estimular transcrição de moléculas MHCII necessárias para apresentação de antígenos. É bem estabelecido que existe um atraso no processamento e apresentação dos seus antígenos nos estágios iniciais da infecção por M.tb. O estímulo crônico das lipoproteínas e glicolipídeos de M.tb nos TLR, principalmente TLR2, leva a uma regulação negativa das moléculas MHCII induzidas pelo IFN- γ (SIA; GEORGIEVA; RENGARAJAN, 2015b). O IFN- γ liga-se ao seu receptor que, por sua vez, sinaliza pela via JAK-STAT a transcrição do transativador de MHCII – CIITA (do inglês, *MHC class II transactivator*). O CIITA é o regulador responsável por induzir fatores de transcrição do MHCII e de moléculas acessórias que o auxiliam no direcionamento aos compartimentos endossomais. Entretanto, o estímulo constante do TLR2 leva através de MAPK a indução de proteínas capazes de inibir a transcrição de CIITA e, conseqüentemente, as moléculas MHC-II (HARDING; BOOM, 2010; KINCAID; ERNST, 2003; WANG *et al.*, 2005). Este efeito sobre o MHC-II é estrategicamente arquitetado para limitar a apresentação de antígenos específicos das micobactérias ao sistema imune.

Citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-12 são expressas pelo macrófago durante a infecção com M.tb e desempenham importantes funções celulares. IL-1 β trata-se de uma importante citocina relacionada com proliferação, diferenciação e apoptose celular que é expressa pela via de sinalização envolvendo NF- κ B e ativação do inflamassoma, com subsequente clivagem da proteína inativa pró-IL-1 β em IL-1 β pela ação da caspase-1. O antígeno ESAT-6 de M.tb foi reportado como responsável pela indução da caspase-1 via NLRP3, enquanto que o DNA de M.tb induz a caspase via AIM-2. A IL-1 β é essencial para a resistência do hospedeiro à infecção em modelos animais (FREMOND *et al.*, 2007; MAYER-BARBER *et al.*, 2010) e para a promoção da resposta Th17 em humanos (STEPHEN-VICTOR *et al.*, 2016). Por outro lado, o TNF- α está relacionado ao mecanismo de apoptose dos macrófagos, sendo que durante a infecção *in vitro* essa citocina inibe a taxa de replicação de M.tb. A produção de TNF- α ocorre via interação do TLR2 durante o contato com as PAMPs mencionados anteriormente (CLAY; VOLKMAN; RAMAKRISHNAN, 2008; XU *et al.*, 2014). A citocina IL-12 apresenta papel regulatório nas células T, durante a produção de IFN- γ e desenvolvimento da resposta imunológica Th1. Demonstrou-se anteriormente que o desequilíbrio na produção dessa citocina causa variações na susceptibilidade a infecção por Mtb (SIA; GEORGIEVA; RENGARAJAN, 2015c).

2.4.4 Papel das principais citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas envolvidas na resposta do macrófago contra *M. tuberculosis*

Pertencentes ao grupo de citocinas anti-inflamatórias destacam-se TGF- β , IL-10 e interferons tipo I. O TGF- β mostrou importante relevância na proliferação e regulação da resposta citotóxica de células T e imunomodulação dos macrófagos pela inibição de IFN- γ durante a infecção por *M.tb* (KRISTIN N *et al.*, 2016; WARSINSKE *et al.*, 2017). A IL-10, presente em níveis elevados nos pacientes com TB pulmonar ativa, diminui a ação microbicida dos macrófagos evitando a produção de reativos de oxigênio e nitrogênio em resposta ao IFN- γ . Além disso, também ocorre o bloqueio da secreção de citocinas pró-inflamatórias devido a deficiência na apresentação de antígenos pelas APCs (células apresentadoras de antígeno), contribuindo para diminuição de TNF- α , IL-12 (REDFORD; MURRAY; O’GARRA, 2011). Os interferons do tipo 1, além de contribuírem para indução do IL-10, inibem citocinas protetoras como TNF- α , IL-12 e IL-1 β e interferem na resposta do macrófago ao IFN- γ (MCNAB *et al.*, 2014).

A resposta quimiotática durante a infecção por *M.tb* tem grande importância no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa durante o curso da infecção. A quimiocina CXCL-8 (IL-8), secretada logo no primeiro contato da resposta inata com o patógeno, atrairá neutrófilos para o sítio da infecção em por intermédio da interação dos seus receptores CXCR-1 e 2 com a IL-8 (BIZZARRI *et al.*, 2006). Através da interação com o receptor CXCR-3, as quimiocinas CXCL-9, 10 e 11 (que são produzidas através de indução por IFN- γ) promovem desenvolvimento da resposta imune adaptativa recrutando células T ao pulmão. A inativação e potencialização de quimiocinas ocorrem por enzimas metaloproteinase de matriz (MMP), da qual tem destaque a MMP9. A MMP9 cliva as quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10, alterando recrutamento de linfócitos T ao pulmão e também exacerbando o efeito atrativo da IL-8, que recrutará mais neutrófilos ao local da infecção. Os neutrófilos são a principal fonte de MMP e estão fortemente correlacionados com a progressão da TB e desestruturação do granuloma. Conclui-se então que as quimiocinas e suas respostas perante a infecção são de grande importância para a progressão da doença (GROOM; LUSTER, 2011; MONIN; KHADER, 2014; VAN DEN STEEN *et al.*, 2000, 2003).

2.5 FUNÇÕES CELULARES ASSOCIADAS AO MACRÓFAGO

2.5.1 Fagocitose e o fagossomo

Após o reconhecimento de componentes extracelulares de *M.tb* por intermédios dos PRRs, o processo de fagocitose é iniciado e o patógeno é retido em fagossomos. Contudo, as micobactérias patogênicas possuem mecanismos que levam a falhas na maturação e na fusão do fagossomo com o lisossomo, bloqueando a acidificação do mesmo (PETHE *et al.*, 2004; RUSSELL, 2001, 2007; STURGILL-KOSZYCKI *et al.*, 1994). A não acidificação do fagossomo leva ao impedimento de aquisição e atividades de hidrolases lisossomais, estacionando o processo maturativo do fagossomo. Além disso, a interação com receptor de Manose e/ou Mincle com ManLAM e TDM, respectivamente (descritos anteriormente) de *M.tb* e suas respostas seguintes regularão a resposta inflamatória, permitindo a sobrevivência e manutenção no nicho replicativo dessas bactérias dentro do macrófago (REKHA *et al.*, 2015).

Após a fagocitose, o LAM e ManLAM de *M.tb* diminui a sinalização por cálcio nos macrófagos, interferindo nos processos seguintes de maturação do fagossomo. A restrição do fluxo de cálcio leva a deficiência no recrutamento da proteína EEA1, responsável pela entrega de hidrolases da rede Trans-Golgi para o fagossomo. O não recrutamento da EEA1 acarreta no estacionamento da maturação do fagossomo entre os estágios marcados por GTPases Rab5 e Rab7 (DERETIC *et al.*, 2006; FRATTI *et al.*, 2003). O grupo Rab de GTPases atuam no transporte de membrana do sistema endossomal, em que Rab5 é gradativamente desassociada dos fagossomos conforme adquirem a Rab7 durante a sua maturação. Adicionalmente, o cálcio também é necessário para recrutamento e ativação de fosfatidilinositol-3 kinase (PI3K) hVPS34 que dará origem a molécula fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), de grande relevância para o processo de maturação do fagossomo. Posteriormente, identificou-se que *M.tb* secreta fosfatase ácida (SapM) que consumirá o PI3P, resultando em parada do processo de maturação do fagossomo (MOTTOLA, 2014; SAIKOLAPPAN *et al.*, 2012; VERGNE *et al.*, 2005). Por fim, TDM (RAO; MEENA, 2011) também interfere na maturação do fagossomo, impedindo a fusão de vesículas fagolisossomais através da sua inserção na bicamada lipídica desses compartimentos (RAO; MEENA, 2011).

O escape da micobactéria para o citosol é outro importante mecanismo da patogenicidade de *M.tb* que resulta em necrose celular (SIMEONE *et al.*, 2012b, 2015; VAN DER WEL *et al.*, 2007). A eficiência *in vitro* deste mecanismo mostrou-se variável de acordo com a estirpe bacteriana. Por exemplo, *M. bovis* BCG não realiza o escape para o citosol devido

da ausência da região RD1 que codifica o sistema de secreção ESX-1, que secreta o ESAT-6. Foi descrito que a ESAT-6, juntamente com o PDIM, contribuem para o rompimento do fagossomo e promovem o escape da bactéria ao citosol (QUIGLEY *et al.*, 2017a; REPASY *et al.*, 2013; WELIN; LERM, 2012). Como diferentes estirpes possuem diferentes atividades do sistema de secreção, sua capacidade de escape é possivelmente modulável. Estudos de avaliação da maturação/acidificação do fagossomo e escape bacteriano para o citosol em outras bactérias do MTBC ainda não foram reportados na literatura.

2.5.2 Morte celular (apoptose e necrose)

As mortes celulares, como a necrose e a apoptose de macrófagos infectados, apresentam respostas que podem contribuir para o controle ou a disseminação das micobactérias durante o processo infeccioso (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016a; ODDO *et al.*, 1998a). A morte por apoptose normalmente controla a disseminação da infecção para outros sítios pulmonares. A inibição desse mecanismo nos estágios iniciais da infecção por *M.tb* é uma estratégia bacteriana para manter seu nicho replicativo e limitar a apresentação e *priming* com células T CD8⁺ via fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células dendríticas.

A apoptose é um processo de caráter não inflamatório que leva a ativação das caspases 3, 7, 8, 9 e 10, envelopamento o conteúdo celular dentro de vesículas com membranas e encolhimento/fragmentação nuclear (MORACO; KORNFIELD, 2014a; RIENDEAU; KORNFIELD, 2003). Algumas vias, extrínseca e intrínseca, são reportadas por ativar o processo de apoptose celular. A via extrínseca é iniciada em decorrência da ativação de caspases iniciadoras e executoras, sendo realizada por receptores TNF (TNFR) após a interação destes com ligantes específicos. Resultante da ativação das caspases, ocorre a clivagem de substratos específicos que fragmentam o DNA, provocando a morte celular (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016b). A via intrínseca tem como característica a ativação das caspases iniciadoras e executoras em decorrência da liberação do citocromo c mitocondrial no citosol. Devido a permeabilização da membrana externa das mitocôndrias, o citocromo c é liberado e interage com a proteína Apaf-1 promovendo a formação do complexo multimérico de sinalização denominado apoptossomo. O apoptossomo, por sua vez, sinaliza a ativação das caspases mencionadas acima, desencadeando os processos de morte celular (KIM *et al.*, 2005; LI *et al.*, 1997; MORACO; KORNFIELD, 2014b). A família de genes *bcl-2* (linfoma de células B-2) é capaz de regular a via intrínseca, induzindo, como no caso da proteína Bim, ou inibindo

a apoptose (MOLDOVEANU *et al.*, 2014). Durante a infecção com *M.tb*, a regulação de genes pró-apoptóticos é feita por codificadores de TNF- α (RODRIGUES *et al.*, 2013), FAS, ligante de FAS (ODDO *et al.*, 1998b), Bim (AGUILÓ *et al.*, 2014a) e caspases 3, 5, 7 e 8 (AGUILÓ *et al.*, 2014b; DUAN *et al.*, 2002). A regulação negativa destes genes (e.g TNFR e FAS) faz com que micobactérias virulentas tenham formas de modular a morte celular por apoptose (ODDO *et al.*, 1998b).

Por outro lado, a morte celular por necrose é um processo de caráter inflamatório caracterizado pelo rompimento da membrana plasmática e liberação de componentes citoplasmáticos e nucleares no ambiente extracelular. Neste processo, padrões moleculares associados a dano (DAMPs) são liberados pela lise das células e seu reconhecimento estimula respostas imunológicas inflamatórias e reparatórias (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016b). Apesar desse processo parecer inerte ao controle da célula, novas propostas sugerem que mecanismos como influxo de cálcio, interação das quinases RIP1-RIP3 e liberação do peptídeo mitocondrial ciclofilina-D possam regular a indução da necrose (MCCALL, 2010).

2.6 INFLAMASSOMOS

Os inflamassomos são complexos proteicos multiméricos que, por intermédio de receptores PRR, principalmente os NOD-like, ativam vias inflamatórias responsáveis pela tentativa de controle da infecção. Os principais tipos de inflamassoma nas infecções por *M.tb* são o NLRP3 e AIM2 que são ativados por diferentes PAMPs, já descritos acima. Através de mecanismos envolvendo domínio N-terminal de ativação e recrutamento de caspase (CARD) e domínio pirina (PYD), ocorre a ativação da enzima caspase-1 que irá clivar a pró-IL-1 β na sua forma ativa IL-1 β , que é de grande importância durante os processos imunológicos perante ao *M.tb* (KRISHNAN; ROBERTSON; THWAITES, 2013; MISHRA *et al.*, 2010b). Processos como a piroptose e pironecrose também são mediados pelo inflamassoma, resultando em quebra do gradiente iônico celular e secreção de citocinas (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016b; WAWROCKI; DRUSZCZYNSKA, 2017).

2.7 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE BACTERIANA

A enumeração de células bacterianas é amplamente utilizada em análises microbiológicas e ensaios científicos. Nos ensaios científicos, a quantidade de bactérias é o parâmetro para ajustes de inóculos de infecção como, por exemplo, a multiplicidade de infecção (MOI) utilizada em modelos experimentais de células *in vitro*. Uma vez que muitos patógenos induzem respostas de forma dose-dependente, a quantificação acurada dessas bactérias se torna vital para validar todas as descobertas científicas do ensaio. A quantificação bacteriana pode ser realizada por métodos diretos, que medem o número de células, ou métodos indiretos, que relaciona o número de bactérias pelos seus metabólitos gerados (TURANO; PIRALI, 1988). Quantificação direta de bactérias incluem métodos como: (i) Quantificação por Unidades Formadoras de Colônias (UFC); (ii) Quantificação por turbidez; (iii) Quantificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real; (iv) Quantificação bacteriana por epifluorescência; e (v) Quantificação por citometria de fluxo.

- (i) Quantificação por Unidade Formadora de Colônias: consiste na diluição seriada do cultivo e, em seguida, sua distribuição em uma placa de meio sólido. Após o período de incubação, as bactérias crescem e formam colônias visíveis que podem ser contadas. O princípio desse método é de que células bacterianas individuais dão origem as colônias visíveis no ágar (JASSON *et al.*, 2010). Entretanto, sabemos que muitas espécies bacterianas como, por exemplo, *M.tb* crescem formando agregados celulares (grumos) e sua quantificação por esse método torna-se imprecisa. Por isso, essas espécies de bactérias passam por tratamentos prévios de ruptura dos grumos, como a passagem da cultura em agulhas de diferentes calibres e adição de detergentes ao cultivo, como Tween 80 (WAYNE, 1994). Adicionalmente, fatores como tempo e condições de incubação, forma do preparo dos meios do cultivo e seus agentes solidificantes podem afetar o número de bactérias visíveis, subestimando a contagem bacteriana (CUNDELL, 2015). Por fim, esta técnica seleciona para contagem as bactérias viáveis, desconsiderando as que não são cultiváveis (porém viáveis), subestimando a contagem (RINSOZ *et al.*, 2008).
- (ii) Quantificação por turbidez: Utilizado para quantificar o número total e taxa de replicação bacteriana, este método mede a dispersão da luz em uma amostra. (LINDQVIST, 2006). Isso é possível porque, conforme as bactérias se replicam, há o

aumento da sua massa celular e, consequentemente, quanto maior a massa maior será a dispersão de luz (MADIGAN *et al.*, 2016). Dois métodos comumente utilizados para avaliação da turbidez de uma amostra são a escala de McFarland e equipamentos de espectrofotometria (e.g. espectrofotômetro). A escala de McFarland consiste em tubos com turbidez variáveis, porém, com um número de células conhecido. Esses tubos são representativos de diferentes concentrações bacterianas e, quando comparados aos cultivos de estudos, fornecem estimativas da concentração de bactérias em UFC/mL (ZAPATA; RAMIREZ-ARCOS, 2015). Os equipamentos de espectrofotometria conseguem incidir um feixe de luz em uma amostra e detectar a luz que não foi dispersa pelas células bacterianas (MADIGAN *et al.*, 2016). Esse valor é definido como densidade óptica. Com os valores de densidade óptica é possível calcular parâmetros de crescimento de um microrganismo (e.g. taxa de replicação, aumento logaritmo da população, tempo lag) (BEGOT *et al.*, 1996). A desvantagem dos métodos de turbidez é que sua quantificação só é precisa em amostras homogêneas. Bactérias que crescem em grumos ou em biofilmes e a densidade óptica não será representativa da massa celular do cultivo (MADIGAN *et al.*, 2016). Comparações entre diferentes espécies de bactérias e condições de cultivo são também problemáticas utilizando este método devido a diferenças de composição das paredes celulares que podem influenciar na turbidez. Assim, valores equivalentes de turbidez não necessariamente indicam o mesmo número de bactérias.

- (iii) Quantificação por Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real: utiliza a amplificação e quantificação do número de cópias de um gene/RNA alvo para determinar a quantidade de bactérias em uma amostra. Para isso, o número de cópias do produto amplificado é comparado a uma curva padrão, relacionando a cópias/genoma de um microrganismo (FEY *et al.*, 2004; LYONS; GRIFFEN; LEYS, 2000). Esse é um método extremamente poderoso para quantificar bactérias não cultiváveis como, por exemplo, *Mycobacterium leprae* que não cresce em meios sintéticos (TRUMAN *et al.*, 2008). Uma das desvantagens é que ensaios precisam de muitos passos de otimização. A extração do material genômico das bactérias deve ser igualmente eficiente entre as amostras a serem comparadas para evitar imprecisões na quantificação. Como as micobactérias possuem uma parede espessa de lipídeos complexos, a extração do seu material genômico e sua quantificação pode ser desafiadora (TRUMAN *et al.*, 2008; VAN TONGEREN; DEGENER; HARMSSEN,

2011). Em nossa experiência, as diferentes espécies do MTBC não apresentam eficiências equivalentes na extração do seu material genético, o que impede a quantificação por este método.

- (iv) Quantificação bacteriana por epifluorescência: utiliza microscópios de fluorescência para quantificar bactérias previamente marcadas com um fluoróforo (e.g. Laranja de Acridina, 4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI, *Live/Dead* BacLight kit, SYBR Gold) (SEO; AHN; ZO, 2010a). Para isso, as células marcadas são distribuídas em uma superfície, por exemplo, filtros de polycarbonato ou em lâminas de vidro e lidas no equipamento. Uma desvantagem desta técnica é que a distribuição do material nessas superfícies não é uniforme e, a depender do campo observado, a estimativa de células bacterianas pode ser super/subestimada (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2016). Por isso, é necessário a aquisição e análise de um número grande de campos, o que se torna uma tarefa laboriosa quando realizada manualmente. Muitos microscópios de fluorescência são acompanhados de softwares capazes de contar células individuais de forma automatizada. Contudo, alguns software não são capazes de distinguir aglomerados celulares usando apenas dados de duas dimensões (SEO; AHN; ZO, 2010b). Por isso, esse método geralmente subestima a contagem total quando comparado ao método manual. Adicionalmente, os grumos emitem sinais intensos de fluorescência que mascaram a fluorescência de células individuais, diminuindo o limiar de detecção e a contagem pelo programa (SEO; AHN; ZO, 2010b). Outra problemática dessa técnica é que muitos fluoróforos marcam de forma variável a população de bactérias em uma amostra. Um estudo publicado por Ryan *et. al.* demonstrou que a marcação de M.tb com Auramina O, Auramina – Rhodamina e Sybr Gold marcou ~ 55%, 65% e 100% da população de bactérias, respectivamente (RYAN; SHAPIRO; LENAERTS, 2014). Apesar de trabalhosa, essa técnica é extremamente poderosa para identificação de bactérias não cultiváveis.
- (v) Quantificação por citometria de fluxo: A citometria de fluxo utiliza a dispersão da luz e aquisição de fluorescência para detectar, a nível *single cell*, as características físicas e químicas de células eucarióticas e procarióticas (WU *et al.*, 2015). Na microbiologia, esta técnica é empregada na contagem de microrganismos e ensaios de viabilidade bacteriana. O número total de bactérias pode ser facilmente determinado pelo citômetro através do volume de amostra lido pelo equipamento ou através de microesferas de

contagem. As microesferas de contagem possuem um valor de concentração conhecido e, quando misturadas a amostra, fornecem o referencial para contagem da população de bactérias (WU *et al.*, 2015). A utilização de bactérias fluorescentes aumenta a especificidade da técnica, uma vez que elas se destacam dos *debris* encontrados durante a quantificação. Adicionalmente, ensaios de viabilidade podem ser realizados em bactérias por dupla-marcação de corantes fluorescentes permeáveis a membrana e de alta afinidade com dsDNA (BERNEY *et al.*, 2007). Apesar da aplicabilidade, a detecção de bactérias pelo citômetro pode ser desafiadora, uma vez que a maioria dos equipamentos apresentam um limite de detecção de 0,5 μm (LACROIX *et al.*, 2010). Entretanto, estudos bacterianos por essa metodologia expandiram em possibilidade com o surgimento de fluorocromos específicos para avaliação de atividade metabólica, respostas a espécies reativas de oxigênio e a antibióticos (BARR *et al.*, 2021b; PARBHOO; SAMPSON; MOUTON, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- (i) Desenvolver uma nova metodologia de quantificação de bactérias do MTBC e *M. canettii* por citometria de fluxo.
- (ii) Comparar as dinâmicas da infecção das espécies de MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1 avaliando a taxa de infecção, índice de fagocitose e morte celular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Objetivo geral (i)

- (i) Comparar as quantificações entre micobactérias do MTBC e *M. canettii* utilizando método de UFC.
- (ii) Comparar as eficiências da marcação superficial de membrana com fluoróforo CF-SE e da marcação via transformação com plasmídeo pMSP12::dsRed2 de micobactérias por citometria de fluxo.
- (iii) Padronizar a quantificação por citometria de fluxo das bactérias-dsRed2 e comparar os valores obtidos com os de quantificação por UFC.

3.2.2 Objetivo geral (ii)

- (i) Determinar as taxas de infecção e os índices de fagocitose das bactérias do MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1.
- (ii) Sequenciar o genoma completo da estirpe *Mycobacterium canettii* C02321 e avaliar a presença dos genes *pks5-1* e *pks5-2* em seu genoma.
- (iii) Acompanhar a dinâmica da infecção das espécies de MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1 de acordo sua replicação intracelular e morte celular induzida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BIOSSEGURANÇA

As estirpes de micobactérias envolvidas neste estudo foram manipuladas em laboratório de biossegurança nível 3+ “Prof. Dr. Klaus Eberhard Stewien”, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

4.2 CULTIVO E ESTOQUE DAS MICOBACTÉRIAS

Foram utilizadas as micobactérias *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium africanum* 17458 (L5), *Mycobacterium africanum* L12222 (L6), *Mycobacterium bovis* SP38, *Mycobacterium caprae* 201913 e *Mycobacterium canettii* C02321. Essas micobactérias foram adquiridas nos repositórios de microrganismos BEI Resources (*Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository*, ATCC, EUA) ou do BCCM (*Belgian Coordinated Collections of Microorganism*, Bélgica), exceto *M. bovis* SP38 (KRAEMER ZIMPEL *et al.*, 2017). As bactérias recebidas estavam acondicionadas em meio Löwenstein-Jensen ou Middlebrook 7H9-OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) com 20% de glicerol.

Ao recebimento, as micobactérias foram repicadas em meio líquido Middlebrook 7H9 (BD, EUA) suplementado com 10% de OADC e 18 mM de piruvato de sódio (Dinâmica, Brasil). As bactérias foram cultivadas em garrafas de cultura celular T25 cm² e/ou T75 cm² (Greiner Bio-one, Áustria) com tampa semi-aberta e mantidas em estufa a 37 °C até que atingissem a densidade óptica (D.O._{600 nm}) de 0,4. Em seguida, os grumos foram removidos pela passagem dos cultivos em agulhas de 21G (5 vezes), 26G (5 vezes) e 29G (1 vez), respectivamente, seguido de decantação por 5 minutos para retirada do sobrenadante. O sobrenadante sem grumos foi congelado em freezer -80 °C com 20% de glicerol. Posteriormente, novos estoques bacterianos foram realizados, cultivando as bactérias em meio Middlebrook 7H9 (BD, EUA) suplementado com 10% de OADC, 18 mM de piruvato de sódio (Dinâmica, Brasil), 0,05% de Tween 80 (Inlab, LTDA, Brasil) e com ou sem 25 ng/μl de canamicina (7H9-OADC-Tween-Pyr ou 7H9-OADC-Tween-Pyr-Can). Quando cultivados na presença de Tween 80, o processo de eliminação de grumos consistia na passagem em seringas de 26G (2 vezes) e 29G (1vez) e, em seguida, decantação por 1 minuto. Esse protocolo de retirada de grumos foi adaptado de Leisching *et al.* 2016.

Os estoques bacterianos foram testados para contaminação cruzada entre estirpes de MTBC utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos. Primeiramente, o DNA das bactérias foi extraído utilizando-se um protocolo descrito

anteriormente (BEMER-MELCHIOR; DRUGEON, 1999; SOOLINGEN *et al.*, 1994). Em seguida, o DNA foi submetido a PCR adaptada de WARREN *et al.*, 2006 para identificação das micobactérias através do padrão de RD (*regions of difference*). A reação de PCR foi realizada com Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, EUA) seguindo as orientações do fabricante, e 0,4 μ M de cada primer em 25 μ l de reação.

4.3 Objetivo (i)

4.3.1 Quantificação das micobactérias em meios de cultura pelo método de UFC

As micobactérias foram crescidas a uma D.O._{600nm} aproximada de 0,4 e quantificadas por UFC em meios Middlebrook 7H10-OADC-Pyr (isto é, sem a adição de Tween 80) e/ou meio 7H9-OADC-Pyr com ágar. Conforme mencionado anteriormente, quando necessário foram adicionados 25 ng/ μ l de Canamicina aos meios. Os cultivos ativos foram diluídos serialmente (1:10), plaqueados em triplicata ou quadruplicata nos meios descritos acima, e incubados a 37 °C por 30 dias. A mesma quantificação foi também realizada diretamente do estoque congelado. Em síntese, estoques de 1 mL (\sim D.O._{600nm} de congelamento a 0,4) foram descongelados, centrifugados a 2.000 xg por 10 minutos, lavados duas vezes com meio Middlebrook 7H9-OADC-Tween-Pyr e ressuspensos na mesma quantidade de meio inicial. Em seguida, o cultivo foi plaqueado e incubado conforme descrito acima.

4.3.2 Quantificação das micobactérias por citometria de fluxo

Duas estratégias foram testadas para quantificação das espécies por citometria de fluxo: (i) utilizando as bactérias *wildtype* (bactérias-WT) marcadas com o fluoróforo de membrana 5-(*e*-6) *carboxyfluorescein, succinimidyl ester* (CF-SE) e (ii) utilizando as bactérias do MTBC e *M. canettii* transformadas com o plasmídeo pMSP12::dsRed2 (bactérias-dsRed2). As bactérias-WT e bactérias dsRed2 foram crescidas em meio líquido conforme descrito anteriormente. Além da quantificação por citometria de fluxo, as bactérias-dsRed2 foram quantificadas em por UFC em meio sólido 7H10-OADC-Pyr-Can (conforme descrito no tópico 4.3.1). Todas as alíquotas de bactérias-WT e bactérias-dsRed2 foram inativadas com paraformaldeído (PFA) 4% (Êxodo Científica) por 30 minutos e reservadas até a sua leitura no citômetro de fluxo. As estratégias de *gating* para os experimentos de citometria estão na figura S1 (quantificação utilizando marcação por CF-SE) e figura S2 (quantificação utilizando bactérias dsRed2).

As amostras bacterianas inativadas foram quantificadas em triplicatas por citometria de fluxo utilizando o equipamento LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences, EUA). Cada replicata foi lida por três minutos no equipamento, com o fluxo de amostras configurado para o “low”. Os dados de fluorescência das bactérias marcadas com CF-SE e das bactérias-dsRed2 foram adquiridos nos filtros FITC e PE-A, respectivamente. A quantidade de bactérias por mL em cada amostra foi determinada de forma absoluta através de *beads* de contagem *CountBright* (Thermo Fisher Scientific). Os dados gerados pelo citômetro foram analisados no *software* FlowJo versão 10 (TreeStar, EUA).

4.3.3 Marcação das micobactérias com CF-SE

A marcação com o CF-SE foi feita conforme descrito (TAN; YATES; RUSSELL, 2017). Brevemente, alíquotas do cultivo de bactérias-WT foram separadas em duas amostras, uma para a quantificação das micobactérias sem marcação e outra para a marcação com o fluoróforo CF-SE. O cultivo bacteriano reservado para a marcação foi centrifugado a 2.000 xg por 15 minutos, a 4°C e o *pellet* formado foi lavado 2 vezes com solução de PSB 1X com 0,1% de Tween 80, sendo centrifugado à 2.000 xg por 15 minutos à 4 °C. O pellet de bactérias foi ressuspenso em 1 mL de tampão de acoplamento (Borato de Sódio 0,1 M, pH 8,0 com 0,1% de Tween 80). Em seguida, 5 µL de CF-SE (0,03 mg / mL) foram adicionados sobre a suspensão de bactérias que foram incubadas por 30 minutos, sob agitação a 180 rpm à 37 °C. Essas bactérias foram centrifugadas a 2.000 xg, por 15 minutos, lavadas 2 vezes com PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, e 1.8 mM KH₂PO₄) suplementado 2% de SFB (soro fetal bovino), inativadas com o PFA 4% (Êxodo Científica, Brasil) por 30 minutos e reservadas para análise por citometria de fluxo.

4.3.4 Transformação das micobactérias com o plasmídeo pMSP12::dsRed2

Escherichia coli DH5α, portadoras do plasmídeo pMSP12::dsRed2 foram adquiridas da empresa AddGene (Addgene plasmid #30171; <http://n2t.net/addgene:30171>; RRID: Addgene_30171, cedido por Dr. Lalita Ramakrishnan, EUA) em meio de cultivo sólido. Uma alçada das bactérias foi cultivada a 37°C, em 180 rpm de agitação, por 18h em meio Luria-Bertani com 100 ng/mL de canamicina. O plasmídeo foi extraído com o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemanha) seguindo as orientações do fabricante e, em seguida,

quantificados por NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific) e armazenados em freezer -20 °C até o momento da eletroporação das micobactérias.

As micobactérias foram eletroporadas para a incorporação do plasmídeo pMSP12::dsRed2 utilizando o aparelho Gene-Pulser (BioRad, Califórnia, EUA). Brevemente, as bactérias foram descongeladas e cultivadas em garrafas T75 cm², com 40 mL de meio 7H9-OADC-Tween-Pyr. Ao atingir a D.O._{600nm} entre 0,6 – 0,7, 100 mL dos cultivos foram centrifugados por 15 minutos a 2.000 xg e o pellet bacteriano foi lavado com glicerol 10% diluído em água (duas vezes). O pellet bacteriano foi ressuspendido em 1 mL de glicerol 10% e, a partir disso, 200 µl foram incubados com plasmídeo a temperatura ambiente por 10 minutos. A eletroporação foi realizada com as seguintes configurações: 2500 V, 1000 Ω, 25 uF. Por fim, as bactérias recuperadas foram plaqueadas em meio MiddleBrook 7H10-OADC-Pyr-Can e mantidas em estufa a 37 °C por 30 dias. As colônias transformadas foram transferidas para meio líquido 7H9-OADC-Tween-Pyr-Can e cultivadas até a D.O._{600nm} 0.4, quando foram congeladas em 7H9-OADC-Tween-Pyr e 20% de glicerol.

4.3.5 Avaliação de diferentes protocolos de quantificação utilizando o citômetro de fluxo LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences)

Diferentes *setups* do equipamento foram avaliados, como modificações nos *thresholds* ou voltagens PMT de FSC, SSC, ou PE-A. Esses parâmetros foram ajustados para diminuir o número de eventos abortados (isto é, eventos detectados pelo citômetro, mas não quantificados) e variações no número de eventos por segundo lidos pelo equipamento (instabilidade na leitura). Entendemos que a taxa de abortamento estava mascarando a quantificação de eventos. Cinco protocolos foram avaliados utilizando a estirpe *M. tuberculosis* como teste: (i) protocolo A: voltagens PMT de FSC = 500, SSC = 200 e PE = 605; *threshold* de FSC = 400; (ii) protocolo B (diluição de amostra): *setup* idêntico ao protocolo A, só que as amostras foram diluídas 1:4 e 1:10; (iii) protocolo C (diluição de amostras e mudança em voltagem e *threshold* de SSC): voltagens PMT de FSC = 500, SSC = 250 e PE = 605; *threshold* de SSC = 200, com amostra diluída 1:10; (iv) protocolo D (diluição de amostras e mudança em *threshold* de PE): PMT de FSC = 500, SSC = 200 e PE = 605; *threshold* de PE = 200, com amostra diluída 1:10; (vi) protocolo E (igual ao protocolo D mas com mudança da voltagem de FSC): PMT de FSC = 700, SSC = 200 e PE = 605; *threshold* de PE = 200. Meio 7H9-OADC-Pyr-Tween submetido

ao mesmo processo de inativação em PFA 4% foi utilizado como controle negativo. Foram utilizadas triplicatas técnicas de cada amostra.

4.3.6 Análises estatísticas

Para protocolos selecionados, o coeficiente de variação foi calculado como o desvio padrão dividido pela média de triplicatas técnicas, enquanto a *false discovery rate* (FDR) foi calculada como,

$$FDR (\%) = \frac{\text{número de eventos no meio de cultura/mL}}{\text{número de eventos na cultura de bactérias/mL}} \times 100$$

Concentrações de bactérias/mL calculadas por citometria de fluxo e UFC foram comparadas individualmente para cada espécie utilizando teste t de Student não pareado bicaudal em Prism 9. Resultados foram considerados estatisticamente significativo quando $p \leq 0,05$.

4.4 Objetivo (ii)

4.4.1 Manutenção e diferenciação das células THP-1

Os monócitos THP-1 (ATCC TIB – 202; humana) foram cultivados em meio RPMI-1640-HEPES (25 mM de HEPES e 300 mg/L de L-glutamina, Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific), 40 mM de piruvato de sódio e 5000 U/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina (LGC Biotecnologia) a 37°C, em 5% de CO₂, até alcançarem a concentração de 1×10^6 células/mL (JOHNSON; ABRAMOVITCH, 2015). As células foram utilizadas até a passagem 6 do estoque original. A diferenciação dos monócitos em macrófagos foi realizada em placas de 48 ou 96 poços (Greiner Bio-One), utilizando a concentração de 4×10^6 e 1×10^4 células/poço, respectivamente. Para isso, monócitos em suspensão foram expostos a 40 nM de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*, Sigma) por 24h, seguidos de 48h de cultivo em meio sem PMA e sem antibiótico. Após o processo de diferenciação, os macrófagos foram cultivados em meio sem penicilina/estreptomicina, porém, com a adição de 25 ng/μl de canamicina para a manutenção das bactérias-dsRed2. O método de PCR convencional foi rotineiramente aplicado para avaliar se as células THP-1 estavam livres de *Mycoplasma* spp, utilizando primers para detectar *Mollicutes* (VAN KUPPEVELD et al., 1992).

4.4.2 Infecção dos macrófagos THP-1

Os macrófagos THP-1 foram infectados com as bactérias-dsRed2 em diferentes multiplicidades de infecção (MOI). Para isso, a suspensão bacteriana quantificada por citometria foi ajustada para a MOI de 2:1, 5:1, 10:1 e 20:1 e ressuspendida em meio RPMI-1640-HEPES-SFB com 25 ng/ μ l de canamicina. Os macrófagos THP-1 foram inoculados com as bactérias-dsRed2 e, em seguida, mantidos em estufa de 5% de CO₂, a 37°C por 4 horas. Após 4 horas de infecção, as monocamadas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X. A depender do experimento, as monocamadas foram processadas para avaliação da taxa de infecção e índice de fagocitose, ou também para contagem de células, bactérias internalizadas e morte celular nos tempos de 4h ou 24h, 48h, 72h e 96h, respectivamente. Foram utilizadas duplicatas ou triplicatas técnicas, e controles negativos (i.e. células não infectadas) foram submetidos aos mesmos procedimentos, incluindo as de lavagens, só que sem a adição de bactérias.

4.4.3 Avaliação da taxa de infecção e índice de fagocitose das bactérias MTBC-dsRed2 e *M. canettii*-dsRed2 em macrófagos THP-1

A avaliação da taxa de infecção (i.e. percentual de macrófagos infectados) foi realizada por citometria de fluxo após 4h de infecção. As células infectadas foram desassociadas da placa de cultivo pelo reagente TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) seguindo as orientações do fabricante. Posteriormente, as células em suspensão foram inativadas com PFA 4% por 30 minutos, transferidas para tampão FACS e reservadas para a leitura no citômetro de fluxo. As estratégias de *gating* podem ser consultadas no material suplementar 1.1. Experimentos foram realizados em triplicatas e células não infectadas serviram como controle negativo.

O índice de fagocitose ou taxa de internalização (i.e., percentual de bactérias internalizadas pelos macrófagos) foi avaliada por citometria de fluxo após 4 h de infecção, seguindo o protocolo de quantificação bacteriana descrito acima. Para recuperar as bactérias internalizadas, os macrófagos foram lizados com 0,15% de Tween 80 (diluído em H₂O ultrapura) por 15 minutos a 37°C. Para a avaliação das taxas de infecção e internalização foram capturados 30.000 e 50.000 eventos por amostra, respectivamente. As estratégias de *gating* para os experimentos de citometria estão no material suplementar 1.2 (4h p.i.). Experimentos foram realizados em triplicatas e células não infectadas serviram como controle negativo. O índice de fagocitose (IF) foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$IF (\%) = \frac{\text{número de bactérias quantificadas no citômetro 4h p.i./poço}}{\text{número de total bactérias usadas para inocular a monocamada/poço}} \times 100$$

4.4.4 Quantificação da morte celular dos macrófagos THP-1 infectados com as espécies do MTBC-*M. canettii*-dsRed2.

A morte celular dos macrófagos THP-1 infectados com as bactérias-dsRed2 foi avaliada por contagem de células em câmara de Neubauer e por citometria de fluxo. No mesmo ensaio também foi determinada a quantidade de bactérias internalizadas conforme a metodologia de citometria de fluxo descrita acima (material suplementar 1.3). Macrófagos THP-1 foram infectados como descrito acima, mantidos por 96h em estufa de CO₂ a 37°C e os dados de morte celular foram coletados em 24h, 48h, 72h e 96h pós-infecção. A contagem de células foi realizada utilizando células desassociadas pelo reagente TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) que, em seguida, foram inativadas com PFA 4%, centrifugadas a 2,500 xg por 15 minutos para remoção do excesso de PFA e submetidas a contagem por câmara de Neubauer. Posteriormente, a morte celular por apoptose foi avaliada por citometria de fluxo dos macrófagos infectados utilizando o kit *CellEvent™ Caspase-3/7* (Thermo Fisher Scientific) que quantifica as células com as caspases 3 e 7 ativas. A morte celular por necrose foi quantificada com o *LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit* (Thermo Fisher Scientific), que identifica as células com perturbações de membrana celular e atividade de esterase. Como controle positivo do ensaio, células não infectadas foram induzidas a apoptose com 0,2 µM de Staurosporina (Sigma) por 4 horas e a necrose foi induzida aquecendo as células a 65°C por 5 minutos (figura suplementar 6).

A marcação das células com os kits de detecção de apoptose e necrose foi realizada seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, as células aderidas foram desassociadas com PBS 1X com 2 mM de EDTA gelado por 30 minutos e centrifugadas a 200 xg por 15 minutos para formação do *pellet* celular. Os respectivos sobrenadantes das células desassociadas também foram centrifugados para recuperação de células mortas que descolaram da placa. Assim, juntamos novamente as células e seus sobrenadantes, centrifugamos a 200 xg por 15 minutos e o *pellet* celular foi marcado com os *kits* citados anteriormente. Primeiramente, marcamos as células com o *live/dead* e, em seguida, com o *kit* de apoptose. A concentração do reagente de detecção das caspases 3/7 (kit *CellEvent*) utilizada para marcar as células foi de 10 µM. Após a marcação, as células foram inativadas com PFA 4%, centrifugadas novamente para remoção do PFA e, por fim, ressuspensas em tampão FACS (PBS 1X, 5% soro fetal bovino

e 0,1% de azida sódica). Os ensaios de morte celular foram lidos no equipamento LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences) no qual foram capturados 1500 eventos por amostra. Os filtros utilizados para captura da fluorescência foram FITC (kit *Cell Event*) e BV421 (*live/dead*). As estratégias de *gating* para os experimentos de citometria estão no material suplementar 1.4 e 1.5.

4.4.5 Análises estatísticas

A taxa de infecção e o índice de fagocitose (i.e., percentual de bactérias que internalizaram) foram comparados entre grupos utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para avaliações par-a-par com auxílio da ferramenta Prism 9. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0.05$.

4.4.6 Extração e sequenciamento do DNA da espécie *M. canettii* C02321

A espécie *wild type* de *M. canettii* C02321 foi cultivada em meio 7H9-OADC-Tween-Pyr até a D.O._{600nm} de 0,4. Em seguida, o cultivo bacteriano foi submetido a extração de DNA utilizando protocolos descritos anteriormente (BEMER-MELCHIOR; DRUGEON, 1999; SOOLINGEN *et al.*, 1994). A qualidade do material genômico extraído foi aferida avaliando razões 260/280 e 260/230 no equipamento NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific). O DNA foi enviado ao *Microbial Genome Sequencing Center* (Pensilvânia, EUA) para preparo da biblioteca e sequenciamento do genoma. As bibliotecas genômicas foram construídas com o auxílio do *kit* Nextera™ DNA Flex (Illumina, California, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado com leituras pareadas (*paired-end*) em NextSeq 550 (Illumina), com Nextera™ DNA Flex (250 ciclos) e cobertura mínima de 30X. As leituras obtidas foram depositadas no SRA (*Sequence Read Archive*), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EUA) sob o número de acesso: SRR10522783.

4.4.7 Montagem e anotação do genoma

As leituras geradas pelo sequenciamento das bibliotecas foram submetidas a um controle de qualidade por meio da análise em software FastQC (versão 0.11.9) (SIMON, 2010). Em seguida, as leituras pareadas foram filtradas para remoção de adaptadores, leituras de baixa qualidade e inespecíficas por meio do software Trimmomatic (versão 0.36) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). O genoma de *M. canettii* C02321 foi montado *de novo* utilizando o

software SPAdes (BANKEVICH *et al.*, 2012). As identificações e anotações gênicas foram realizadas automaticamente pelo *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) e o genoma montado foi depositado como BioSample SAMN13381535, número de acesso JACEGV0000000000 (*Mycobacterium canettii* ITM_C02321).

4.4.8 Avaliação do contexto gênico das *pks5-1* e *pks5-2* de *M. canettii* C02321

A presença dos genes da *polyketide synthase* 5-1 (*pks5-1*) e 5-2 (*pks5-2*) no genoma de *M. canettii* C02321 foi determinada por BLASTn (NCBI), utilizando as sequências nucleotídicas de *pks5-1* e *pks5-2* encontradas na estirpe de referência *M. canettii* CIPT 140010059 (NC_015848.1). O contexto gênico desses genes foi comparado ao da estirpe referência e ao da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv (GCF_000195955.2).

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo geral (i)

5.1.1 Crescimento disgônico de espécies do MTBC impede a quantificação por UFC em meio sólido

O método comumente utilizado para quantificar bactérias é por Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Assim, comparamos o crescimento das diferentes bactérias do MTBC e *M. canettii* em meio sólido tradicional Middlebrook 7H10 e meio Middlebrook 7H9 suplementado com ágar. As quantificações foram realizadas de cultivos frescos em D.O._{600nm} aproximada de 0,4 e dos seus respectivos estoques congelados em freezer -80°C. A UFC do cultivo fresco de *M. tuberculosis* foi mais elevada quando comparada as outras espécies bacterianas em D.O._{600nm} semelhantes. A UFC de M.tb apresentou $\sim 5 \times 10^8$ bactérias/mL, enquanto as outras espécies obtiveram UFC de $\sim 1 \times 10^7$ a 3×10^7 bactérias/mL, respectivamente (Figura 3A). O mesmo padrão foi observado quando as bactérias foram quantificadas a partir de cultivos congelados, entretanto, com 1 log de redução em todos os valores de UFC (figura 3B). Não houve divergência de valores de UFC entre as quantificações nos meios 7H10 e 7H9-ágar. Como o meio de cultivo Middlebrook é formulado especificamente para estirpes laboratoriais como *M. tuberculosis*, nos questionamos: a diferença de UFC observada é devido a ineficiência do meio Middlebrook 7H10 em crescer espécies do MTBC que não sejam *M. tuberculosis*? Se sim, esperaríamos encontrar valores de quantificação por citometria (originados do meio líquido) maiores do que os de UFC. Assim, realizamos uma série de experimentos de quantificação por citometria e UFC para responder essa pergunta.

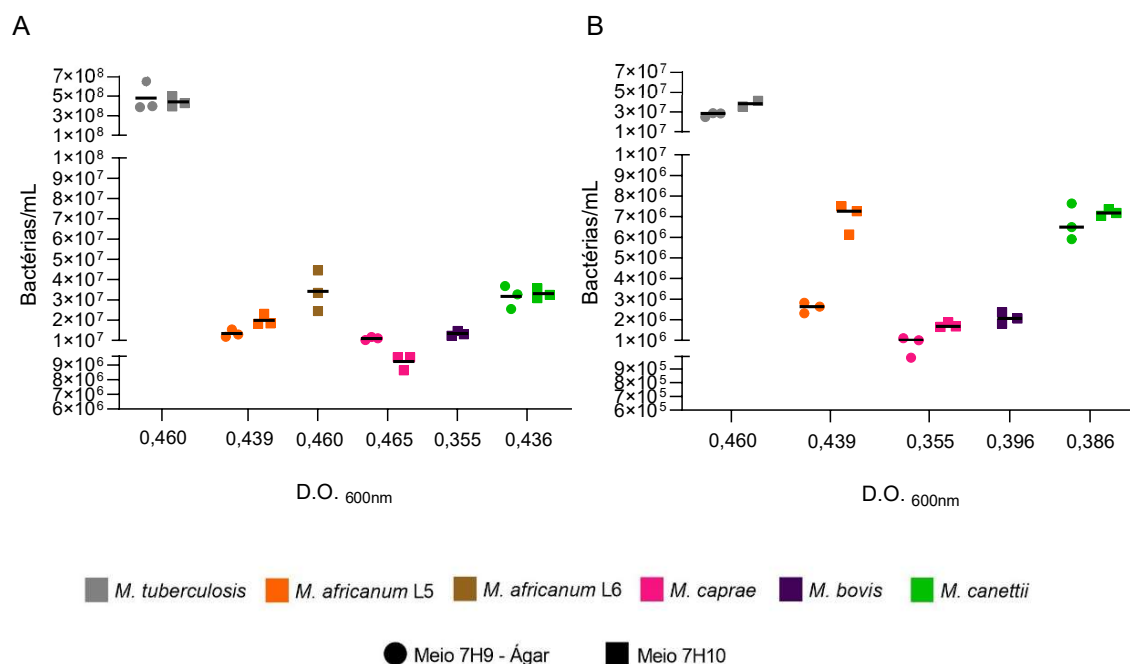


Figura 3. Quantificação das micobactérias por UFC (unidades formadoras de colônias). Micobactérias quantificadas por UFC em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) e 18 mM de piruvato de sódio (7H10-OADC-Pyr) e 7H9-OADC-Pyr com ágar. (A) Cultivo bacteriano fresco em densidade óptica (D.O. 600nm) aproximadas de 0,4: Os grumos foram removidos do cultivo pela passagem em agulhas de diferentes calibres, decantado, diluído serialmente e plaqueado. (B) Cultivo bacteriano congelado em D.O. 600nm aproximadas de 0,4. O estoque bacteriano foi descongelado, centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos, lavados duas vezes com Middlebrook 7H9-OADC-Pyr, resuspendido no mesmo meio, diluído serialmente e plaqueado.

5.1.2 Marcação superficial de membrana com CF-SE resulta em uma população heterogênea de bactérias marcadas e não marcadas

Dada a semelhança fenotípica e a característica clonal evolutiva das espécies do complexo, esperávamos encontrar valores de UFC parecidos entre as bactérias do MTBC crescidas a densidades ópticas similares (GALAGAN, 2014). Assim, levantamos a hipótese que o meio sólido não estava suportando o crescimento correto das espécies do MTBC. Para confirmar esta hipótese, nós estabelecemos um protocolo de quantificação por citometria de fluxo a fim de comparar os resultados obtidos com os valores de UFC. Inicialmente, nós utilizamos bactérias não marcadas e bactérias marcadas com CF-SE para obter o número de bactérias/mL dos cultivos bacterianos frescos. Observamos que os valores de quantificação das bactérias não marcadas foram de 1-2 logs maiores do que os valores obtidos com as

quantificações de bactérias marcadas com CF-SE (Figura 4A). Observamos que isso ocorreu devido a limitada eficiência de marcação das bactérias com fluoróforo, que varia entre 40-80% (Figura 4B). Portanto, concluímos que não seria possível utilizar a marcação com CF-SE para a quantificação das micobactérias por citometria de fluxo. A fim de corrigir esse problema, transformamos todas as espécies de micobactérias envolvidas no projeto em bactérias fluorescente através da incorporação do plasmídeo pMSP12::dsRed2.

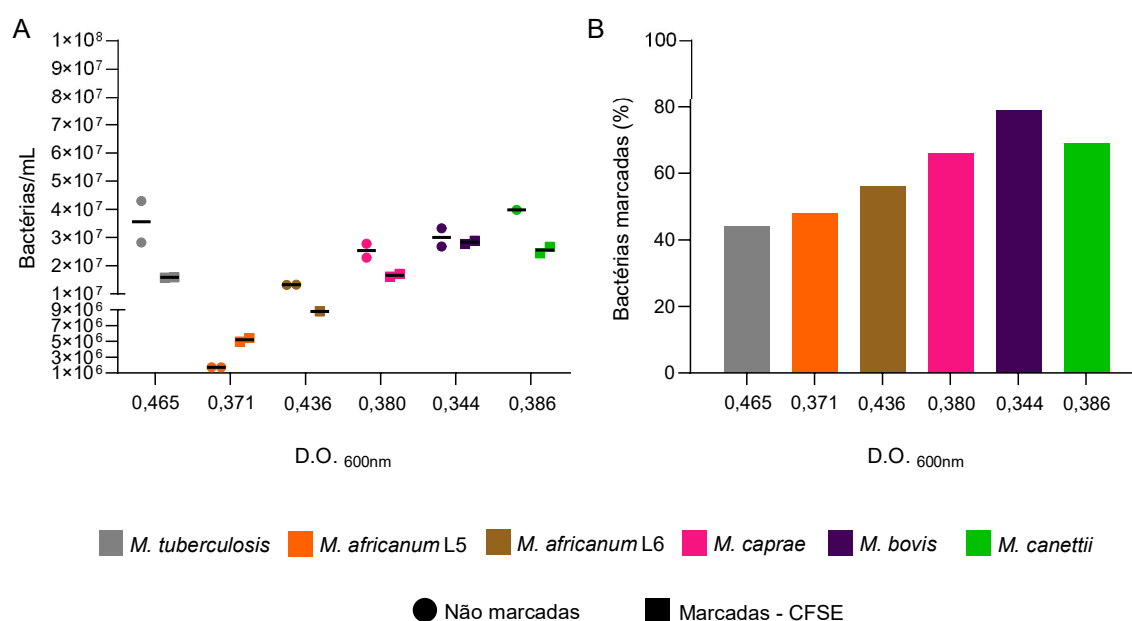


Figura 4. Quantificação das micobactérias marcadas com CF-SE por citometria de fluxo. Quantificação das micobactérias marcadas com CF-SE por citometria de fluxo. Bactérias cultivadas em Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18mM de piruvato de sódio e 0,05% de Tween 80 (7H9-OADC-Pyr-Tween) foram quantificados por citometria de fluxo utilizando suas características morfológicas e a marcação por CF-SE (*5-(e-6) carboxyfluorescein, succinilmidyl ester*). **(A)** Cultivo bacteriano quantificado citometria de fluxo utilizando morfologia (não marcadas) ou marcação por CF-SE (marcadas CF-SE). **(B)** Percentual de bactérias marcadas com CF-SE a partir do meio líquido.

5.1.3 Quantificação por citometria de fluxo das bactérias transformadas com plasmídeo pMSP12::dsRed2 garante homogeneidade das células bacterianas marcadas

Como a marcação com o CF-SE não é homogênea ou 100% eficiente e há perda de bactérias durante o processo de marcação com o fluoróforo CF-SE, optamos por utilizar estirpes constitutivamente fluorescentes na quantificação por citometria de fluxo. Assim, utilizando as bactérias-dsRed2, comparamos as quantificações das espécies por UFC e por citometria de fluxo. Confirmando a nossa hipótese, os valores quantificados por citometria de fluxo foram de 2 a 3 log maiores quando comparados quantificação por UFC, com exceção de M.tb. Para M.tb, observamos que a sua quantificação por UFC era ~ 1 log maior que a quantificação por citometria (Figura 5A). Observamos também que $\sim 100\%$ das bactérias estavam fluorescentes, o que garante que não estaríamos “perdendo” células bacterianas não marcadas (Figura 5B). Adicionalmente, as diferenças entre as quantificações UFC e citometria foram confirmadas em três experimentos independentes (Figura 5C). Com esses dados, podemos inferir que há uma população de bactérias do MTBC (exceto M.tb) que não são quantificadas pelo método convencional de UFC. Entretanto, devido a UFC de M.tb apresentar valores maiores que aqueles obtidos por citometria de fluxo, concluímos que a quantificação por citometria de fluxo ainda não estava ideal, e assim executamos experimentos adicionais de otimização deste protocolo, descritos a seguir.

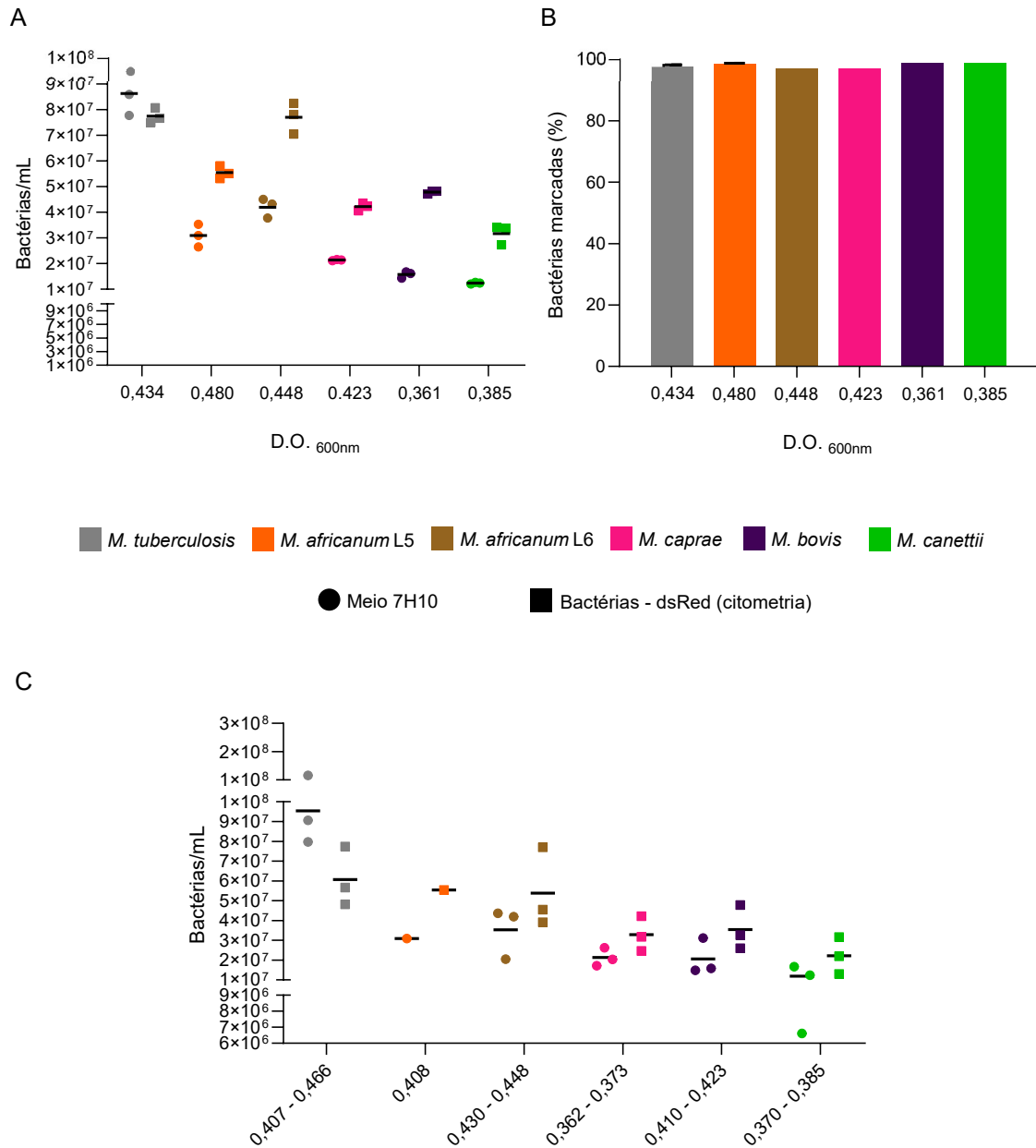


Figura 5. Quantificação das micobactérias transformadas com pMSP12::dsRed2 por citometria de fluxo e unidades formadoras de colônia (UFCs). Bactérias cultivadas em Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18mM de piruvato de sódio, 0,05% de Tween 80 (7H9-OADC-Pyr-Tween) e 25 ng/μl de canamicina (7H9-OADC-Tween-Pyr-Can) foram quantificados por citometria de fluxo utilizando seu sinal de fluorescência (PE-A). **(A)** Comparação entre a quantificação por citometria de fluxo do meio líquido e por UFCs em meio Middlebrook 7H10-OADC-Pyr-Can. **(B)** Percentual de bactérias identificadas como emitindo fluorescência dsRed2 no meio líquido. **(C)** Cada replicata é oriunda de um experimento independente cuja densidade óptica (D.O. 600nm) é indicada no eixo x. As médias das replicatas estão representadas pela barra preta.

5.1.4 A utilização de Tween 80 e passagem em agulhas promove ruptura dos grumos em meios líquidos

Para avaliar se a população sendo quantificada possuía grumos, avaliamos a se a técnica adotada de quebra de grumos estava surtindo efeito em *M. tuberculosis*. Micobactérias são conhecidas por formarem grumos durante crescimento *in vitro* o que poderia levar a um valor subestimado da quantificação por citometria de fluxo. Para diminuir a formação dos agregados bacterianos, Tween 80 foi adicionado ao meio e as bactérias foram crescidas até aproximadamente uma D.O._{600nm} de 0,4, pois a formação de grumos é maior em fases mais tardias de crescimento (LEISCHING *et al.*, 2016). Nós também realizamos um protocolo de passagem em agulhas seguido de decantação. Utilizando citometria de fluxo, avaliamos a dispersão populacional de uma alíquota de *M. tuberculosis* antes e após o protocolo de agulhas e decantação. Resultados indicam uma população mais homogênea, em termos de tamanho e complexidade, proveniente da amostra que foi submetida ao protocolo comparada a que não foi (Figura 6). Com isso, concluímos que a técnica utilizada diminui significativamente a formação de grumos em M.tb.

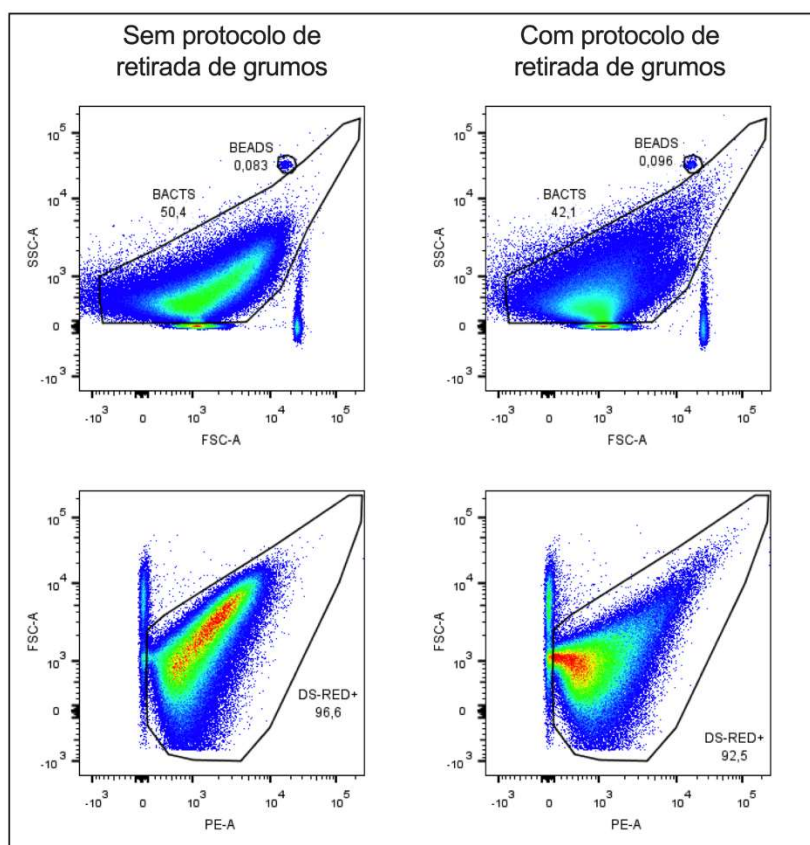


Figura 6. Efeito da quebra de grumos na dispersão bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transformado com pMSP12::dsRed2 em citômetro LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences, EUA) antes e após protocolo de retirada de grumos com passagens em agulhas e decantação.

5.1.5 Otimização dos protocolos de quantificação por citometria de fluxo

Inicialmente, utilizamos o mesmo protocolo apresentado na figura 5 (chamado a partir de agora de Protocolo A) para quantificar amostras de *M.tb* no citômetro de fluxo em três experimentos independentes. Resultados indicam que a quantificação obtida pelo citômetro mostrou resultados consistentemente menores que a UFC (Figura 7A), mostrando que o *setup* deste protocolo inicial do citômetro estava subestimando o número de bactérias. Adicionalmente, as quantificações de *M.tb* por UFC em meios 7H10 apresentam uma ampla dispersão dos valores de quantificação em experimentos individuais e também em replicatas independentes, o que não é visto nas outras micobactérias (figura 7B).

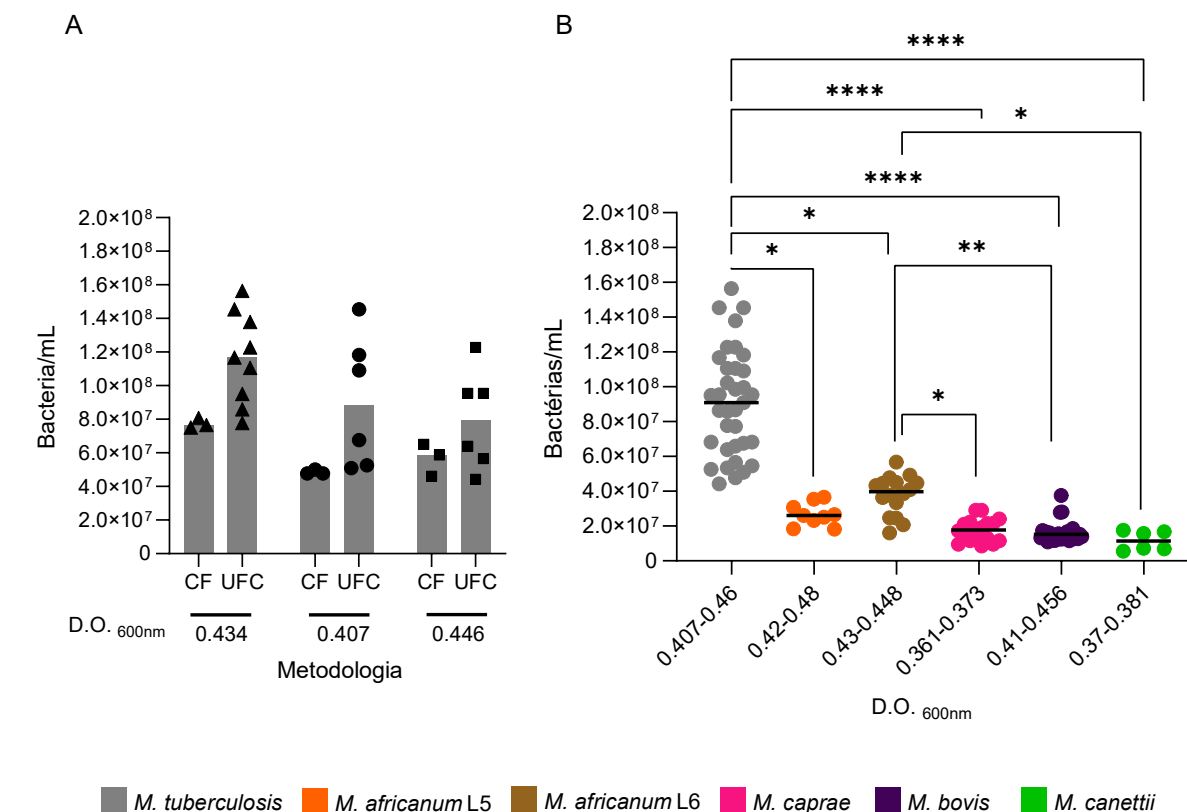


Figura 7. Dispersão populacional dos valores de quantificação das micobactérias em experimentos independentes. (A) Três experimentos independentes de quantificação de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transformado com pMSP12::dsRed2 por citometria de fluxo (CF) e unidades formadoras de colônia (UFC). (B) Experimentos independentes de quantificação por UFC das micobactérias. Bactérias foram quantificadas em meio Middlebrook 7H10 com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18 mM de piruvato de sódio e 25 ng/ul de canamicina.

Durante a passagem da amostra no citômetro de fluxo, a aplicação do protocolo A gerou um número significativo de eventos abortados e uma importante oscilação no número de eventos/segundo (Tabela 1). Assim, optamos inicialmente por diluir a amostra nas razões de 1:4 e 1:10 (protocolo B), mas ainda havia muitos eventos abortados e uma oscilação importante no número de eventos por segundo (Tabela 1). Ao analisar o perfil populacional pelos *dot plots* SSC/FSC, observou-se uma abundante população de eventos (~90% dos eventos) imediatamente abaixo da população principal dsRed2+ (Figura 8A, B). Ao analisarmos amostras do meio de cultura sem bactérias, observamos que essa população abundante também está presente no meio de cultura, sendo possivelmente debris do meio (Figura 8C). Levantamos então a hipótese de que a fonte do elevado número de eventos abortados seria o *debri* do meio

de cultura. Para tentar contornar esse problema, modificamos a voltagem do SSC (protocolo C). Neste protocolo, as microesferas de contagem desapareceram do campo de contagem de eventos e uma parte da população principal também foi perdida, impossibilitando sua aplicação. Por fim, optamos por estabelecer um *threshold* para PE (200), de forma a registrar apenas eventos com fluorescência dsRed2+ (protocolo D). Foi possível observar uma redução significativa no número de eventos abortados e na oscilação do citômetro de fluxo (Tabela 1), mas também uma pequena exclusão da população principal para além do eixo FSC. Essa exclusão foi então solucionada modificando a voltagem do FSC para 700, mantendo o número baixo de eventos abortados e reduzida oscilação (Tabela 1 e Figura 8E, F).

Tabela 1. Evento totais e abortados e número de eventos por segundo durante a quantificação de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv com diferentes protocolos de *setup* do citômetro LR Fortessa (BD Biosciences, EUA).

Protocolo (diluição da amostra)	Eventos totais	Eventos abortados	Amplitude de eventos por segundo*
A (puro)	274.632	231.767	6.900 (600-7.500)
B (1:4)	229.880	168.121	3.800 (200-4.000)
B (1:10)	275.826	229.567	3.200 (400-3.640)
C (1:10)**	NR	NR	NR
D (1:10)	130.640	941	300 (600-900)
E (1:10)	122.368	775	200 (600-800)

* valores aproximados; NR: análise não realizada; ** no protocolo C as microesferas de contagem não podiam ser mais visualizadas, então esse protocolo foi desconsiderado.

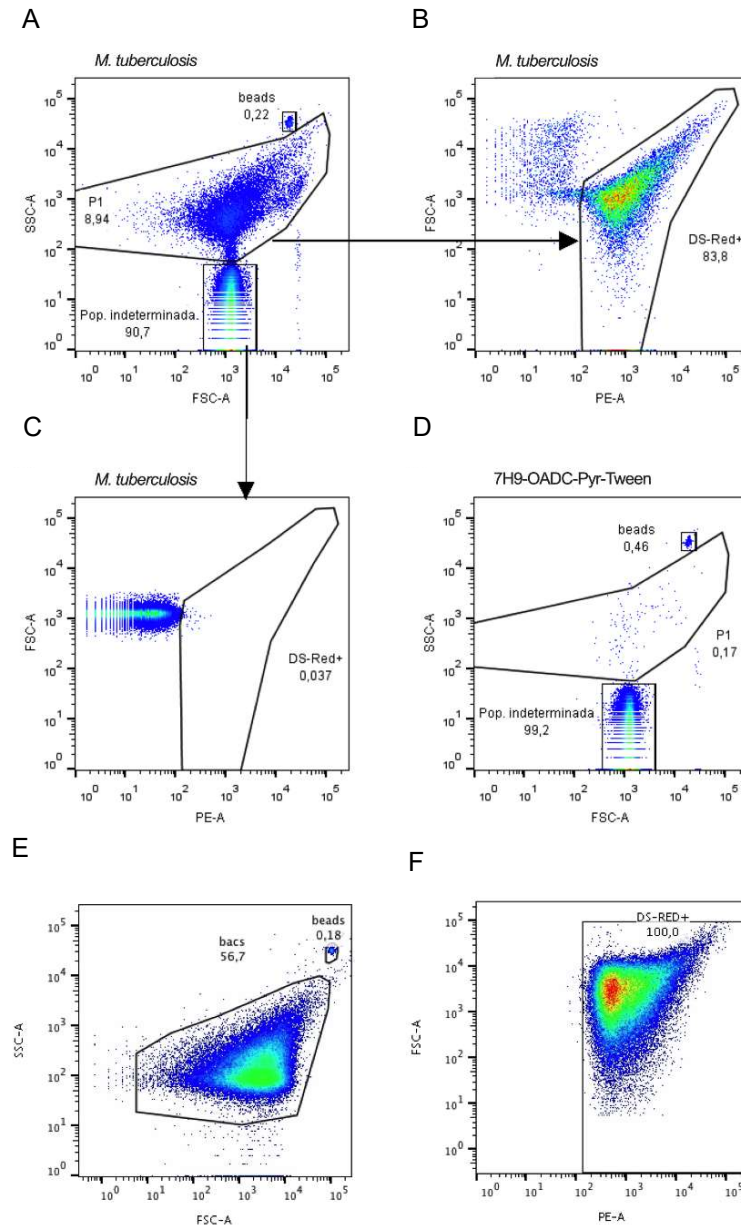


Figura 8. Dot plots de citometria de fluxo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transformado com pMSP12::dsRed2. (A, B, C) *M. tuberculosis* H37Rv analisado em protocolo A. (D) Meio Middlebrook 7H9 com 10% OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18 mM de piruvato de sódio, 0,05% de Tween 80 e 25 ng/μl de canamicina submetido ao protocolo de inativação com paraformaldeído 4%. (E, F) *M. tuberculosis* H37Rv analisado no protocolo E.

Para avaliar se os ajustes de *setup* interferiram positivamente na quantificação final das bactérias por citometria de fluxo, as concentrações de bactérias/mL em caldos com D.O._{600nm} próximas a 0,4 foram calculadas para os protocolos A (protocolo inicial) e E (protocolo mais eficiente). No *dot plot* SSC/FSC (Figura 8E) do protocolo E, nota-se que a população principal correspondeu a 56,7% dos eventos. Na tentativa de identificar onde estariam o restante dos eventos, arrastamos o traço do *gate* de encontro ao eixo SSC-A, o que fez com que > 90% dos eventos aparecessem dentro do *gate*. A contagem do protocolo E com esse ajuste foi então comparada ao protocolo A e ao protocolo E sem ajuste (Figura 9A). É possível observar que o protocolo E aumentou significativamente a quantificação das bactérias, sendo ainda maior quando o ajuste foi aplicado (Figura 9A). Valores de FDR e coeficientes de variação foram considerados baixos para os três protocolos avaliados (Tabela 2). A taxa de FDR para os três protocolos variou de 0,10 a 0,24% para protocolo A; de 1,61 a 2,85% para protocolo E; e de 1,75 a 2,59% para protocolo E com o ajuste de contagem (Tabela 2). Coeficientes de variação para os três protocolos variaram de 0,08 a 0,27%; 0,08 a 0,38% e 0,04 a 1% para as cinco espécies bacterianas avaliadas (Tabela 2).

Em seguida comparamos as quantificações obtidas no protocolo E com ajuste de contagem com as obtidas por UFC em caldos crescidos a uma D.O._{600nm} aproximada de 0,4 (Figura 9B). Enquanto não houve diferença estatística significativa ($p=0,32$) entre as quantificações para *M. tuberculosis*, as quantificações por citometria de fluxo se mostraram muito superior àquelas obtidas pela técnica de UFC para todas as outras espécies do MTBC e *M. canettii*. Esses dados indicam que a espécie *M.tb* cresce melhor no meio sólido utilizado quando comparadas as outras estirpes e que o protocolo de quantificação por citometria está funcionando adequadamente.

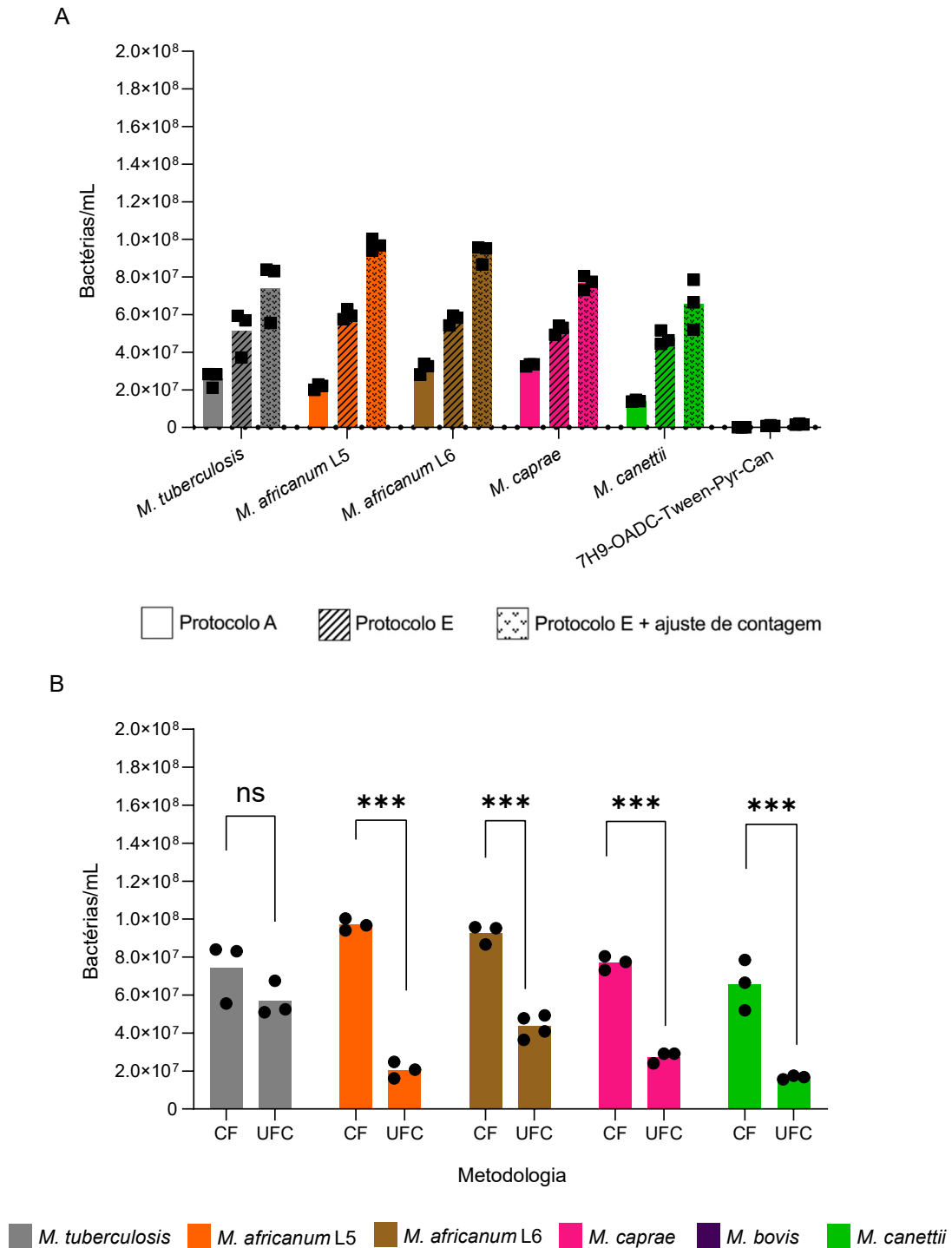


Figura 9. Concentrações em bactérias por mililitro (mL) medidas por citometria de fluxo (CF) e unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *Mycobacterium canettii*. (A) Quantificações das bactérias do MTBC e *M. canettii* em citômetro de fluxo LSR Fortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences, EUA) utilizando diferentes protocolos (A, E e E + ajuste de contagem). (B) Comparação das quantificações obtidas por citometria de fluxo e unidades formadoras de colônia. Bactérias foram quantificadas em meio Middlebrook 7H10 com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18 mM de piruvato de sódio e 25 ng/μl de Canamicina. *p<0,0001 ns: p=0,32.**

Tabela 2. False discovery rate (FDR) e coeficiente de variação das amostras processadas no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences, EUA).

Amostra	Protocolo A		Protocolo E		Protocolo E+ajust.	
	FDR %	CV %	FDR %	CV %	FDR %	CV %
<i>M. tuberculosis</i>	0,14	0,08	1,95	0,30	2,37	0,10
<i>M. africanum</i> L5	0,16	0,23	1,61	0,15	1,75	0,04
<i>M. africanum</i> L6	0,11	0,25	1,68	0,27	1,84	0,22
<i>M. caprae</i>	0,10	0,27	2,85	0,08	2,21	0,11
<i>M. canettii</i>	0,24	0,27	2,03	0,38	2,59	1,00
7H9-OADC-Pyr-Tween-Can*	-	6,64	-	0,74	-	0,44

* Middlebrook 7H9 com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), 18 mM de piruvato, 0,05% d Tween 80 e 25 ng/μl de canamicina.

5.2 Objetivo geral (ii)

5.2.1 Exceto *M. caprae*, as espécies do MTBC e *M. canettii* infectam macrófagos THP-1 de forma dose-dependente

Uma vez estabelecido a quantificação bacteriana, investigamos a taxa de infecção (percentual de macrófagos infectados) e o índice de fagocitose (percentual de bactérias que internalizaram) das bactérias do MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1 com diferentes multiplicidades após 4 horas de infecção. Realizamos dois experimentos independentes, um para avaliação da MOI de 2:1 e 5:1 e outro para a MOI de 10:1 e 20:1.

A taxa de infecção de macrófagos THP-1 mostrou ser dose-dependente para todas as espécies de MTBC e *M. canettii*, exceto *M. caprae* (Figura 10). Percentuais de macrófagos infectados foram significativamente diferentes em pelo menos uma das comparações entre MOI reduzidas (2:1 e 5:1) e elevadas (10:1 e 20:1) em todas as espécies (Figura 10A, B, C, D, F), exceto *M. caprae* (Figura 10D). Adicionalmente, entre as espécies do MTBC, *M. caprae* apresentou percentuais de infecção maiores nas MOIs reduzidas (2:1 e 5:1) comparado a outras espécies (com exceção de *M. africanum* L6 na MOI de 5:1, com taxa semelhante ao *M. caprae*). As outras espécies do MTBC só atingiram ou superaram esses percentuais quando MOIs elevadas (10:1 e 20:1) foram utilizadas. Foi possível também observar que *M. canettii* infectou maiores percentuais de macrófagos comparado a outras espécies avaliadas em todas as MOIs, variando de 13,2% a 52,3%.

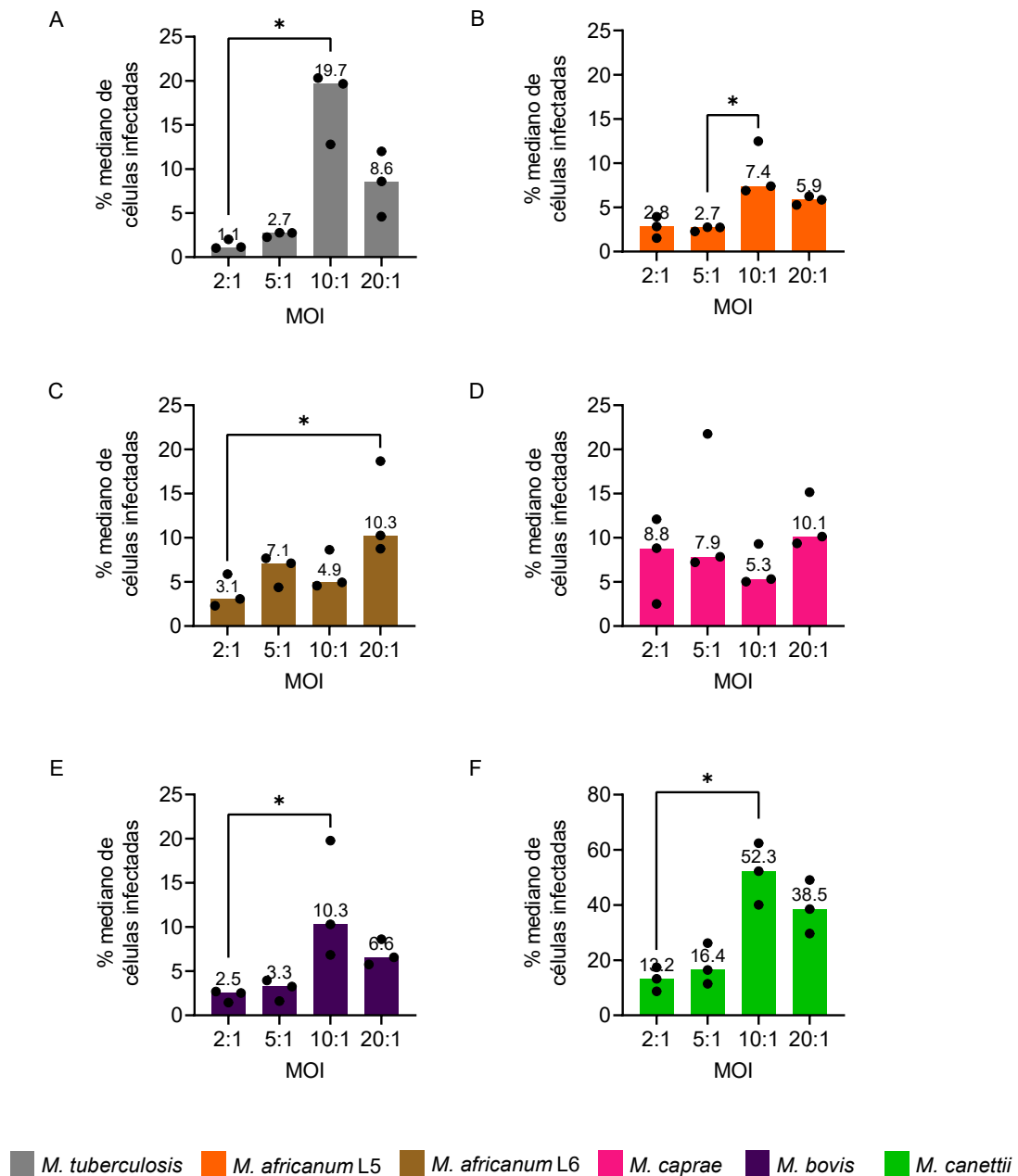


Figura 10. Taxa de infecção (i.e. percentual de macrófagos infectados com bactérias-dsRed2) de espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *M. canettii*. (A) *Mycobacterium tuberculosis*; (B) *Mycobacterium africanum* L5; (C) *M. africanum* L6; (D) *Mycobacterium caprae*; (E) *Mycobacterium bovis*; (F) *M. canettii*. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. Valores apresentados com mediana de triplicatas. Valores acima das barras são as medianas dos percentuais das taxas de cada condição. MOI: multiplicidade de infecção. Apenas comparações estatisticamente significativas são mostradas (i.e. $p \leq 0,05$). Todas as outras comparações par-a-par não indicadas foram não significativas. Análises estatísticas foram realizadas com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas em Prism 9. Controles negativos, isto é, triplicatas de células sem bactérias (x 6) apresentaram uma taxa de eventos considerados positivos (células PE+) de 0.35 a 1.35%.

5.2.2 Índices de fagocitose do MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1

Os índices de fagocitose (i.e., percentual de bactérias que internalizaram nos macrófagos após 4h) foram determinados a partir da lise dos macrófagos infectados com as estirpes do MTBC e *M. canettii*-dsRed2 e posterior quantificação em citômetro de fluxo. Assim como a taxa de infecção, o índice de fagocitose caracteriza-se por ser dose-dependente, exceto para *M. caprae* e *M. africanum* L6 (Figura 11). O mesmo padrão de percentuais mais elevados em *M. caprae* comparado a outras bactérias do MTBC em MOIs reduzidas (2:1 e 5:1) foi observado (Figura 11). Índices de fagocitose foram também consistentemente mais altos em *M. canettii* comparado a outras espécies em todas as MOIs (Figura 11F).

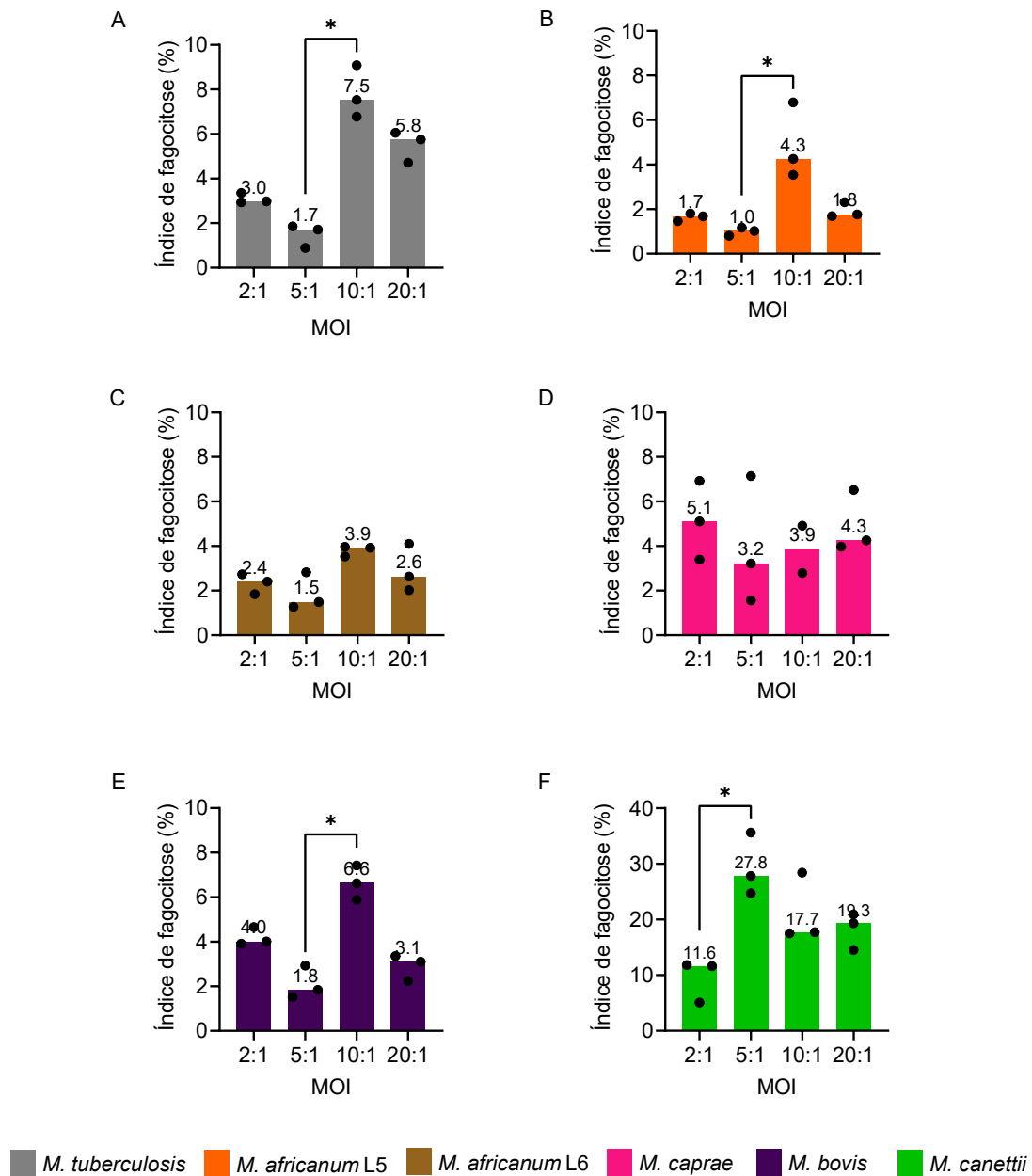


Figura 11. Índice de fagocitose (% de bactérias que internalizaram) de macrófagos THP-1 infectados com espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*. Índice foi calculado como sendo: número de bactérias quantificadas pelo citômetro 4h p.i. por poço/número de bactérias inoculadas na monocamada no momento da infecção x 100. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. (A) *Mycobacterium tuberculosis*; (B) *Mycobacterium africanum* L5; (C) *M. africanum* L6; (D) *Mycobacterium caprae*; (E) *Mycobacterium bovis*; (F) *M. canettii*. Valores apresentados com mediana de triplicatas. Valores acima das barras são as medianas dos percentuais das taxas de cada condição. MOI: multiplicidade de infecção. Apenas comparações estatisticamente significativas são mostradas (i.e. $p \leq 0,05$). Todas as outras comparações par-a-par não indicadas foram não significativas. Análises estatísticas foram realizadas com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas em Prism 9. Índice calculado a partir de controle negativo (i.e., células não infectadas) ficou em 0,014%.

5.2.3 *M. canettii* C02321 apresenta uma cópia do gene *pks5* em seu genoma

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a espécie *M. canettii* apresentou as maiores taxas de infecção e índices de fagocitose quando comparados às bactérias do MTBC. Uma das características evolutivas das espécies do MTBC em comparação a *M. canettii* é a remodelação da parede bacteriana pela perda de uma das cópias do gene policetídeo sintase 5 (do inglês, *polyketide synthase 5*, *pks5*). Geralmente, as estirpes de *M. canettii* apresentam 2 cópias deste gene, o que resulta em colônias de aspecto liso. Entretanto, foi reportado que *M. canettii* pode apresentar perda espontânea da *pks5* (BORITSCH *et al.*, 2016b), resultando em colônias de aspecto rugoso assim como *M.tb*. Adicionalmente, a perda espontânea deste gene leva a uma maior infectividade do *M. canettii* em macrófagos (140). Com isso, sequenciamos, montamos e anotamos o genoma da estirpe de *M. canettii* C02321 utilizada neste estudo para verificar se ambas as cópias do gene *pks5* (*pks5-1* e *pks5-2*) estariam presentes.

O sequenciamento de *M. canettii* C02321 resultou em 1.574.454 leituras, 379.9M bases (cobertura de 85X) que foram montadas em 74 *scaffolds* com N50 de 93.522 nucleotídeos e conteúdo de GC de 65.9%. A anotação pela PGAP resultou em 3.842 regiões de DNA codificante (CDS, *coding DNA sequences*), 3 genes de RNA ribossomais (rRNA), 45 RNAs transportadores (tRNA) e 160 pseudogenes. Em seguida, para analisar a região dos genes *pks5-1* e *pks5-2*, as sequências nucleotídicas destes genes da estirpe de referência *M. canettii* CIPT 140010059 foram recuperadas do banco de dados. O genoma dessa estirpe apresenta as duas cópias da *pks5*. Executamos um BLASTn das sequências recuperadas contra o genoma de *M. canettii* C02321. Observamos que: (i) a *query pks5-1* apresenta 98% de identidade e 99% de cobertura com uma *pks5* do *M. canettii* C02321; (ii) a *query pks5-2* apresenta 99% de identidade e 94% de cobertura também com a mesma sequência de *pks5* do *M. canettii* C02321. Isso ocorreu devido a homologia entre os dois genes e, para confirmar a presença de uma única cópia, avaliamos o contexto gênico dos genes *up* e *downstream* a *pks5-1* da estirpe de *M. canettii* referência, estirpe de estudo e da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv. Conforme esperado, a estirpe *M. canettii* C02321 apresenta uma cópia do gene *pks5-1*, assim como a estirpe *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 12). Assim, a presença de uma única cópia do *pks5* na estirpe do estudo possivelmente explica as altas taxas de infecção e elevados índices de fagocitose observados nas células THP-1, como descrito anteriormente (140).



Figura 12. Contexto gênico dos genes *up* e *downstream* relacionados a *pks5*. A estirpe *Mycobacterium canettii* CIPT 140010059 foi utilizada como referência para recuperar as sequências nucleotídicas dos genes *pks5-1* e *pks5-2*. Posteriormente, as sequências recuperadas foram submetidas ao *blast* local contra os genomas de *M. canettii* C02321 (utilizado neste estudo) e da estirpe laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv. Os resultados do *blast* mostraram alinhamento da *pks1* com 98% de identidade e 99% de cobertura e da *pks5-2* com 94% de cobertura e 99% de identidade, porém, esta última foi alinhada a mesma sequência encontrada na *pks-1*. Os genes *up* e *downstream* foram avaliados e confirmaram que *M. canettii* C02321 perdeu uma das cópias da *pks5*, assim como, a espécie *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

5.2.4 Dinâmica de infecção do MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1

Baseado nos resultados obtidos acima, optamos por utilizar multiplicidades de infecção de 10:1 para as espécies do MTBC-dsRed2 e 1:1 para *M. canettii*-dsRed2 para um ensaio de 96hs. A morte celular dos macrófagos THP-1 foi avaliada em 24h, 48h, 72h e 96h por contagem em câmara de Neubauer e citometria de fluxo com marcadores de apoptose e necrose. Os resultados indicam que os números de células em monocamadas infectadas com as diferentes espécies foram menores quando comparado ao controle negativo durante todo o ensaio (Figura 13A). Em 24h e 48h não foram encontradas diferenças significativas na contagem de células entre as espécies. Entretanto, diferenças significativas foram observadas entre *M. caprae* e *M. canettii* ($p=0.0086$) em 72h p.i. Em 96h p.i., as células infectadas entraram em declínio, com diferenças significativas observadas em *M.tb* e *M. canettii* ($p=0.0126$) (Figura 13A).

O número de bactérias por poço, medido por citometria, aumenta significativamente nas 48h p.i., o que acompanha a queda no número de células a partir das 72hs. Apesar de não haver

diferença estatisticamente significativa, o número de *M. caprae* intracelulares foi maior nas 24h comparado a outras bactérias, em concordância com sua maior capacidade de internalização (Figura 11D). Nos tempos de 48h, 72h e 96h, houve diferença significativa no número de bactérias intracelulares entre *M. bovis* e *M. africanum* L5 ($p=0.016$, 0.0124 , 0.0138 , respectivamente) (Figura 13B).

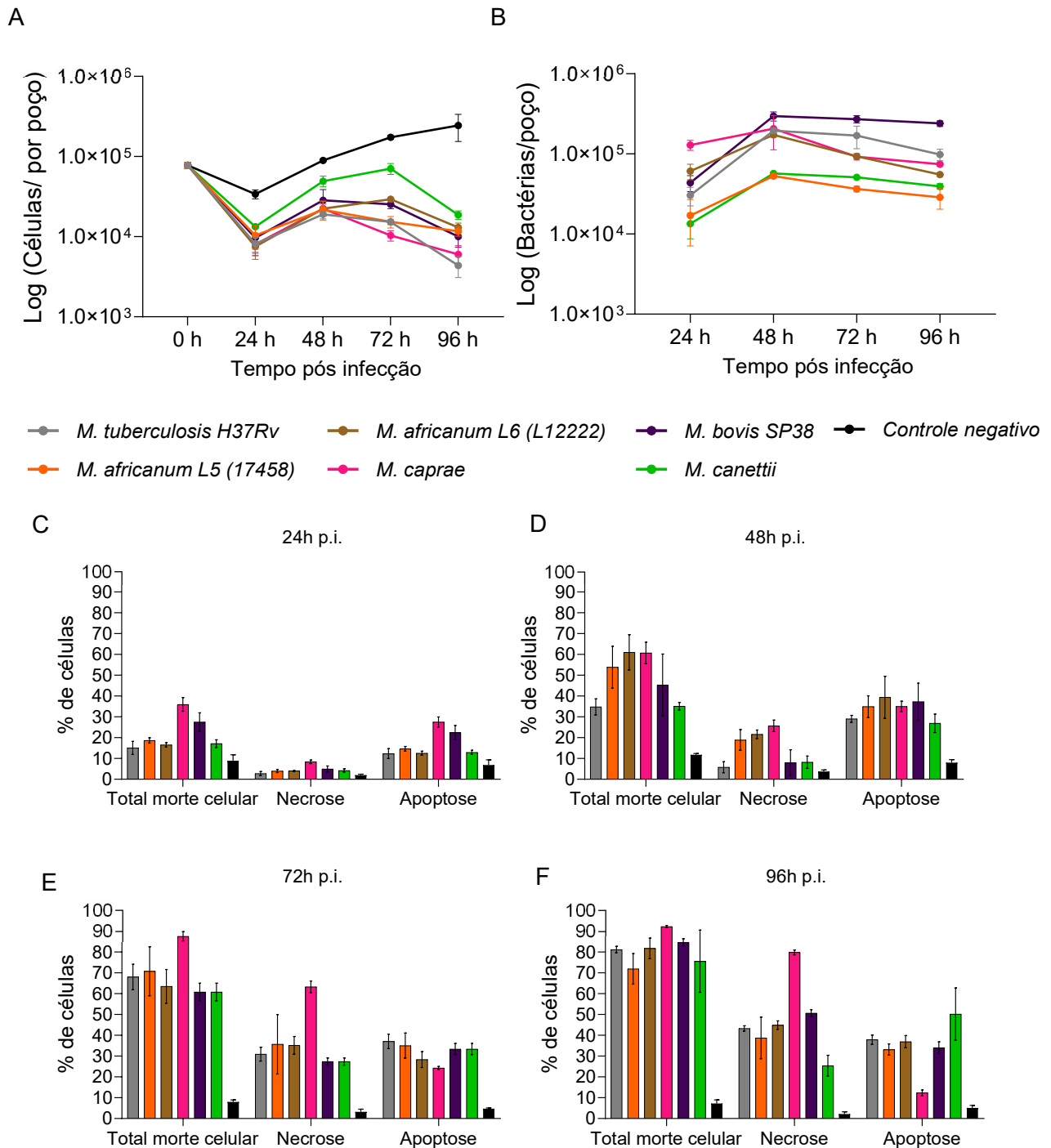


Figura 13. Dinâmica de infecção de macrófagos THP-1 com espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*. (A) Número de células por poço ao longo da infecção. Células foram soltas com TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, EUA) e contadas em câmara de Neubauer. (B) Quantificação das bactérias intracelulares ao longo da infecção. Monocamadas foram lizadas com 0.15% Tween 80 e quantificadas em com citometria de fluxo. (C-F) Perfil de morte dos macrófagos THP-1 no tempo de 24 horas (C), 48 horas (D), 72 horas (E) e 96 horas (F) pós infecção. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. Total de células mortas são aquelas identificadas como Live/Dead^{high}. Células em necrose são aquelas identificadas como Live/Dead^{high} CASP3/7-. Células em apoptose são aquelas identificadas como Live/Dead^{high} CASP3/7+. Dado o grande número de comparações com significância estatística, os principais achados são descritos no texto. Barra em preto = controle negativo (i.e. células não infectadas).

A seguir, quantificamos os níveis de apoptose e necrose dos macrófagos infectados com MTBC-dsRed2 e *M. canettii*-dsRed2. Observou-se um percentual de morte celular mais elevado devido à apoptose em *M. caprae* e *M. bovis* logo nas primeiras 24h p.i. em comparação a outras espécies (Figura 13C). Nas 48h p.i. há um aumento geral na morte celular, com as espécies atingindo níveis semelhantes entre si, mas o percentual de necrose é maior em *M. africanum* L5, L6 e *M. caprae* do que em *M. tb*, *M. bovis* e *M. canettii*. Por outro lado, o percentual de apoptose é semelhante entre as espécies (Figura 13D). Por fim, 72hs e 96hs p.i. houve maiores percentuais de morte celular, principalmente por necrose, no *M. caprae* comparado a outras espécies (Figuras 13E e 13F). Adicionalmente, o percentual de morte celular aumenta significativamente em todas as espécies em 72h e 96h, o que corresponde com a queda no número de células da monocamada observada anteriormente (Figura 13A).

6. DISCUSSÃO

As espécies do MTBC evoluíram de forma clonal, com 99% de similaridade genética, porém apresentam predileção hospedeira e restrição geográfica (GAGNEUX, 2018). Apesar dos avanços científicos realizados para erradicação da TB, existem poucos estudos que avaliam de forma comparativa diferentes representantes do MTBC. Neste estudo, nos propomos a avaliar de forma comparativa a dinâmica de infecção de espécies de micobactérias adaptadas a humanos e animais em macrófagos humanos THP-1. Para trabalhar com as espécies *M. africanum* L5, *M. africanum* L6, *M. caprae*, *M. bovis* e *M. canettii* em modelos de infecção *in vitro*, precisamos quantificar essas espécies por UFC. Observamos que a espécie *M.tb* apresentou uma UFC com ~ 1 log diferença quando comparada as outras micobactérias, tanto de bactérias frescas quanto do estoque congelado. O mesmo padrão foi observado em meio de cultivo 7H9 suplementado com ágar, evidenciando que não há interferentes no meio tradicional 7H10 que possam inibir o crescimento das bactérias (e.g. verde malaquita). Dada a semelhança fenotípica e característica clonal evolutiva das bactérias do complexo, esperávamos encontrar valores de UFC parecidos entre as bactérias do MTBC crescidas a densidades ópticas similares (GALAGAN, 2014). Como o meio de cultivo Middlebrook é formulado especificamente para estirpes laboratoriais como *M.tb*, nos questionamos: a diferença de UFC observada é devido a ineficiência do meio 7H10-Middlebrook em crescer espécies do MTBC que não sejam *M.tb*? Para confirmar essa hipótese precisamos utilizar métodos alternativos de quantificação, uma vez que métodos de cultura (UFC) podem subestimar a contagem bacteriana devido a presença de bactérias viáveis, mas não cultiváveis (BARR *et al.*, 2021b; RINSOZ *et al.*, 2008).

Para confirmar que a quantificação por UFC estava subestimando a contagem bacteriana, escolhemos a citometria de fluxo como método alternativo de enumeração bacteriana. O método de quantificação por citometria (CF) foi realizado com bactérias *wild type* marcadas e não marcadas com o fluoróforo 5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Succinimidyl Ester (CF-SE). Este fluoróforo é um corante que se liga covalentemente a aminas livres de proteínas presentes na membrana bacteriana (JOHNSON; SPENCE, 2010). Observamos que as quantificações com bactérias marcadas ficaram menores do que as obtidas com bactérias não marcadas (avaliada por FSC e SSC). Adicionalmente, a população bacteriana não foi completamente marcada pelo fluoróforo, variando de 40%-80%. A variabilidade da eficiência de marcação de corantes fluorescentes já foi reportada em *M.tb* anteriormente (RYAN; SHAPIRO; LENAERTS, 2014) e pode estar relacionada a variabilidade proteica presente na membrana externas das micobactérias. Com isso, determinamos que a quantificação por CF utilizando a marcação de membrana não seria efetiva.

Optamos por utilizar estirpes constitutivamente fluorescentes na quantificação por citometria de fluxo. Assim, todas as micobactérias envolvidas neste projeto foram transformadas com plasmídeo pMSP12::dsRed2 (bactérias-dsRed2). Diferente das marcações com CF-SE, observamos uma população homogênea de bactérias fluorescentes (>95%), tornando as bactérias-dsRed2 ideais para a quantificação por este método. Confirmando a nossa hipótese, com exceção de *M.tb*, as quantificações por CF foram superiores as observadas por UFC. Esse dado indica que há uma subpopulação de bactérias viáveis, porém não cultiváveis, que são quantificadas por CF e que a espécie *M.tb* realmente cresce melhor em meios Middlebrok. Convém ressaltar que a deficiência de crescimento das estirpes do MTBC não é exclusiva do meio sólido, pois em meios líquidos elas também atingem fase estacionária mais precocemente que o *M.tb* de acordo com experimentos realizados por outros pesquisadores em nosso laboratório. Esses pontos estão em concordância com a premissa de que, apesar da alta similaridade genética entre as espécies, existem outros fatores que afetam o metabolismo bacteriano. Nosso grupo reportou recentemente que a espécie *M. caprae* apresenta mutações deletérias que afetam seu metabolismo e, conseqüentemente, crescimento *in vitro* (ROMANO *et al.*, 2022). A suplementação adicional de glutamato no meio sólido aumentou significativamente o número de UFC desta espécie, enquanto para *M.tb* não houve diferença (ROMANO *et al.*, 2022).

Apesar de ser possível visualizar que as bactérias do MTBC (exceto *M.tb*) possuem deficiência de quantificação meio sólido, o fato de a UFC de *M.tb* ser maior que a CF indicou que o protocolo precisava de otimização. Observamos em experimentos independentes que *M.tb* apresentou quantificações consistentemente menores de CF do que de UFC. Adicionalmente, os valores de quantificação por UFC de *M.tb* são mais variáveis do que as quantificações de outras espécies avaliadas. Acreditamos que isso é uma característica intrínseca de *M.tb*, possivelmente de todas as espécies do MTBC, e que o limite de quantificação do meio sólido 7H10 para as outras espécies nas condições atuais é de $\sim 2-5 \times 10^7$. Assim, iniciamos os ajustes do protocolo de citometria averiguando a presença de grumos na população bacteriana. Os grumos presentes nos cultivos foram desfeitos pela adição de Tween 80 e quebra física por passagem sequencial em agulhas de diferentes calibres seguido de decantação. Resultados indicam uma população mais homogênea, em termos de tamanho e complexidade, proveniente da amostra que foi submetida a ruptura dos grumos do a que não foi. Assim, concluímos que o protocolo de passagem em agulhas seguido de decantação é eficiente para diminuir significativamente o número de grumos. Esses resultados são suportados

por outros pesquisadores que mostram que a retirada de grumos com agulhas é mais eficiente quando comparada a sonicação ou vórtex (BARR *et al.*, 2021a).

Com o protocolo de ruptura de grumos definido, testamos diferentes parâmetros de configuração do *setup* utilizado para os experimentos de citometria de fluxo. Notamos que, apesar dos ajustes iniciais, a presença de *debris* oriundos do meio de cultura dificultou a aquisição de dados pelo equipamento LSR Fortessa (BD), gerando taxas de aborto elevadas. Como alguns *debris* possuíam sobreposição de tamanho e complexidade com as bactérias, a única maneira de diminuir sua interferência foi inserindo o *threshold* mínimo de fluorescência PE, onde o citômetro passou a contar como evento somente bactérias dsRed2+. Porém, mesmo com esse ajuste, na análise posterior em Flow Jo, os *dot plots* não mostravam todos os eventos juntos a população principal. Os eventos restantes apareciam escondidos no eixo SSC. O instrumento LSR Fortessa possui um limite de detecção de 0,5 μm . Bacilos do MTBC possuem um tamanho de $0,345 \pm 0,029 \mu\text{m}$ de diâmetro e $2.71 \pm 1,05 \mu\text{m}$ de comprimento (YAMADA *et al.*, 2015). Acreditamos que alguns eventos lidos pelo equipamento eram abaixo desse limite de detecção, resultando na anormalidade no *dot plot*. A depender do sentido que o bacilo passa pelo canal de detecção, esse tamanho pode ter sido inferior ao limite de 0,5 μm . Recentemente, o equipamento BD AccuriTM C6 foi utilizado para quantificar micobactérias utilizando a BCG (*M. bovis*) como modelo (BARR *et al.*, 2021a). As vantagens deste equipamento em relação ao LSR Fortessa incluem: capacidade de quantificar o volume processado, dispensando assim o uso de microesferas, e seu pequeno tamanho, próprio para uma bancada de laboratório. Assim como em nosso estudo, o melhor protocolo foi aquele modificando o *threshold* da fluorescência. Porém, a escolha dos autores se baseou na alta FDR obtida tentando modificar apenas os *thresholds* de SSC e FSC (BARR *et al.*, 2021a) e não em taxas de aborto, oscilação de número de eventos/segundo ou deficiência na contagem final, como observado em nosso experimento. Por fim, com as correções no *setup* da CF e corroborando com os resultados até aqui apresentados, confirmamos que as espécies do MTBC, com exceção de *M.tb*, crescem de forma limitada no meio sólido 7H10.

Uma vez estabelecidos os dados de quantificação bacteriana, demos início a caracterização dos índices de fagocitose das micobactérias inoculadas em macrófagos THP-1. A taxa de infecção foi dose-dependente para todas as espécies, exceto *M. caprae* que apresentou taxas de infecção consistente independente das MOIs utilizadas. A espécie *M. canettii* foi a micobactéria com o maior número de células infectadas quando comparada as espécies do MBTC. Buscamos na literatura estudos que reportaram a taxa de infecção por *M.tb* (estirpe de referência) em diferentes modelos celulares. Avaliado por equipamento de *high content*

screening e microscopia eletrônica, macrófagos Raw 264.7 e J774, inoculados em MOIs de 2:1 e 10:1, resultaram em 2%-10% e 20%-30% de células infectadas. Adicionalmente, a taxa de infecção, medida por microscopia confocal, de macrófagos (MDM) e células dendríticas (MDDC) originadas de monócitos humanos de sangue periférico variou em diferentes estudos. Essa variação foi de ~20% de MDM infectados em uma MOI de 5:1 para ~70% e 90% de MDM e MDDC infectados em uma MOI de 10:1, respectivamente (GIACOMINI *et al.*, 2001; VOLPE *et al.*, 2006). O autor atribuiu essa diferença ao receptor CD11b, envolvido na fagocitose das micobactérias (GIACOMINI *et al.*, 2001). Em macrófagos THP-1 diferenciados com PMA, a adição de uma MOI de 50:1 gerou uma taxa de infecção aproximada de 48% (THEUS; CAVE; EISENACH, 2004). Quando comparada ao nosso modelo experimental, uma infecção em MOI de 10:1 (partindo do que foi apresentado em 50:1) resultaria em aproximadamente 10% de infecção dos macrófagos THP-1, o que está de acordo com o observado em nossos experimentos. Assim, inferimos que na maioria dos modelos *in vitro* de infecção com micobactérias, a média de infecção dos macrófagos fica em 10%-20%.

Os índices de fagocitose também se mantiveram dose-dependentes, com exceção de *M. caprae* e *M. africanum* L6. A espécie *M. canettii* apresentou os maiores índices de fagocitose comparado a outras espécies em todas as MOIs. Para *M. caprae*, três possibilidades podem explicar esse achado: (i) *M. caprae* utiliza uma via diferente e mais eficiente de fagocitose comparado a outras estirpes, (ii) *M. caprae* possui uma capacidade maior ou mais rápida de induzir a fagocitose em macrófagos e/ou induzir a comunicação parácrina entre macrófagos que faz o processo de fagocitose mais eficiente (ZUMERLE *et al.*, 2019), ou (iii) a superpopulação bacteriana, com possível formação de grumos, determina a eficiência da fagocitose para as espécies não-*M. caprae*, enquanto *M. caprae* não necessita de uma superpopulação para atingir eficiências comparáveis. É possível que a aglomeração de bactérias aumente a cooperação entre receptores celulares e que *M. caprae*, ao utilizar uma via diferente de fagocitose comparado a outras espécies do MTBC, não necessite dessa cooperação tanto quanto as outras espécies do complexo.

Por outro lado, *M. canettii* é uma micobactéria tuberculosa ancestral mais próxima filogeneticamente do MTBC. Diversos fatores marcam a especiação do MTBC, como a perda do gene *cobF*, relacionado a síntese de vitamina B12, e perda de uma cópia do gene *pks5*, que está envolvida com a produção de lipooligosacarídeos (LOS) (SUPPLY; BROSCHE, 2017). A presença de *pks5* na espécie *M. canettii* faz com que sua parede celular seja diferente da parede celular das espécies do MTBC, apresentando uma morfologia lisa. A ausência de uma das cópias de *pks5* no genoma das estirpes do MTBC fez com que sua parede celular fosse

remodelada de lisa para rugosa (BORITSCH *et al.*, 2016b). Entretanto, foi reportado anteriormente que *M. canettii* pode perder de forma espontânea uma das cópias da *pks5* e que isso está relacionado ao aumento da sua persistência intracelular *in vivo* e *in vitro* (BORITSCH *et al.*, 2016b). Curiosamente, a estirpe de *M. canettii* C02321 utilizada neste estudo possui somente uma cópia da *pks5* conforme mostrado pelo sequenciamento do seu genoma. Adicionalmente, essa espécie demonstrou altas taxas de infecção e índices de fagocitose no nosso modelo experimental. Com isso, podemos levantar a hipótese de que as diferenças dos índices de fagocitose do *M. canettii* com as outras estirpes do MTBC iniciam-se na diferença entre suas paredes e vias de fagocitose estimuladas.

Em seguida, avaliamos a caracterização do tipo de morte celular induzido pelo MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1 ao longo de 96 horas. De forma geral, a morte celular por apoptose foi predominante em 24h p.i., com *M. caprae* e *M. bovis* induzindo níveis mais elevados do que as outras espécies. A apoptose é um processo organizado e sua indução leva ao controle da infecção. Apesar da restrição de acidificação fagossomal ocasionada por micobactérias virulentas, células apoptóticas são fagocitadas por células dendríticas que conseguem digerir corpos apoptóticos infectados e apresentar os antígenos bacterianos as células T (BEHAR *et al.*, 2011). A indução da apoptose por M.tb tem sido associada a expressão de ESAT-6 de forma dose dependente (DERRICK; MORRIS, 2007). Estudos em nosso laboratório (ZIMPEL, 2022) e outros (MALONE *et al.*, 2018) indicam que as estirpes *M. bovis* AF2122/97 e SP38 (utilizada neste estudo) possuem expressões gênicas e proteicas mais elevadas de genes do ESX-1, incluindo o ESAT-6, durante crescimento *in vitro* comparado ao M.tb. Outros estudos com transcriptomas em nosso laboratório confirmam que o *M. caprae* utilizado neste estudo também apresenta o mesmo perfil de superexpressão de ESAT-6. Assim, no momento da inoculação dos macrófagos THP-1 com as estirpes de micobactérias, essas duas espécies expressavam níveis maiores de ESAT-6 que M.tb, o que poderia explicar a maior atividade apoptótica nas primeiras 24hs p.i. [NO_PRINTED_FORM]

Um dos mecanismos de manipulação da apoptose por M.tb é a indução de membros anti-apoptóticos da família de proteínas BCL-2 como, por exemplo, Mcl-1. Ensaio em células THP-1 demonstram aumento do Mcl-1 nos tempos de 24h-48h p.i. (SLY *et al.*, 2003), sugerindo que possa haver uma transição entre apoptose para necrose na medida em que a infecção progride. Neste estudo, observamos uma estagnação nos níveis de apoptose após 48h, momento no qual a necrose começa a aumentar para todas as espécies do MTBC. Em 48h p.i., as espécies atingiram níveis semelhantes de morte celular, entretanto, os níveis de necrose foram maiores em *M. africanum* L5, L6 e *M. caprae* do que em M.tb, *M. bovis* e *M. canettii*.

[NO_PRINTED_FORM]Nos períodos de 72h e 96h a necrose induzida por *M. caprae* superou todas as espécies de micobactérias. É possível que o *M. caprae* induza a uma maior expressão de Mcl-1 via ativação do receptor de manose no momento da fagocitose. Um estímulo diferenciado em dose e/ou tipo de receptor por parte do *M. caprae* comparado a outras espécies do MTBC poderiam explicar os maiores índices de fagocitose, taxa de infecção e uma possível conexão com as maiores taxas de necrose. Um maior escape do fagossomo para o citosol por meio da superexpressão de PDIM e ESAT-6 também poderia explicar maiores níveis de necrose (QUIGLEY *et al.*, 2017b; SIMEONE *et al.*, 2012a). A necrose é uma morte celular de caráter altamente inflamatório, que interrompe os processos celulares do fagócito afetado. Induzida por estirpes virulentas, está relacionada a disseminação da bactéria a outros nichos celulares, assim como a interrupção do processamento de antígenos pelos macrófagos (DIVANGAHI; BEHAR; REMOLD, 2013).

A espécie *M. canettii* foi a única bactéria em que o nível de células apoptóticas aumentou nas 96h p.i. Esse achado está de acordo com o que foi observado em outras micobactérias que, assim como *M. canettii*, não pertencem ao MTBC. Por exemplo, a micobactéria não tuberculosa *M. kansasii* apresentou níveis de apoptose maiores quando comparado ao M.tb (SLY *et al.*, 2003). Assim como em *M. caprae*, esse achado pode estar relacionado a uma ativação diferencial de receptores envolvidos na fagocitose. Em ambos os casos, supõem-se então que as espécies utilizadas neste estudo apresentem diferentes composições lipídicas em suas paredes celulares.

A manipulação de Mcl-1 por M.tb não é o único mecanismo utilizado para o sequestro da apoptose nos macrófagos. Macrófagos infectados com M.tb tem níveis reduzidos da expressão de receptores FAS que, por sua vez, ativam a via extrínseca da apoptose (ODDO *et al.*, 1998c). Do mesmo modo, os receptores TNF 2 (TNFR2) são sabotados durante a infecção por M.tb pela produção de forma solúveis desse receptor. As formas solúveis de TNFR2 competem com o receptor durante o estímulo do seu ligante e, assim, não executam a cascata da apoptose de forma adequada (BALCEWICZ-SABLINSKA; GAN; REMOLD, 1999). Por outro lado, a necrose durante a infecção por M.tb pode ser facilitada através da regulação da produção de eucosanoides como prostaglandina E2 (PGE₂) e Lipoxina A₄ (LX A₄). A PGE₂ tem como papel preservação da integridade da mitocôndria e de membranas celulares. Com isso, esse mediador lipídico garante a correta execução dos processos apoptóticos. Entretanto, a LXA₄ diminui a produção de PGE₂ e encontra-se superexpresso nos macrófagos infectados com M.tb (151). Assim, esses macrófagos adquirem um perfil pró-necrótico e M.tb garante a maior sobrevivência dos bacilos no *milieu* celular (DIVANGAHI; BEHAR; REMOLD, 2013).

No nosso modelo experimental, a espécie *M. caprae* foi a que apresentou maiores níveis de necrose, principalmente após 72h de infecção. Até o momento, não conseguimos dizer se existem outras formas de morte celular acontecendo durante a infecção. Já foi reportado anteriormente que células necróticas infectadas com *M.tb* apresentam acúmulo de peróxidos lipídicos, característica de morte celular por ferroptose (AMARAL *et al.*, 2019). Entretanto, não podemos excluir que a necrose observada em células infectadas com *M. caprae* seja consequência da alta carga de bacilos logo nas 24h p.i. e/ou de diferentes vias de fagocitose sendo ativadas. Assim, esses são resultados preliminares da dinâmica de infecção dos macrófagos e, partindo de novos experimentos, poderemos explorar as diferenças entre as estirpes do MTBC e suas vias de sinalização.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou de forma comparativa a dinâmica de infecção de espécies de micobactérias do MTBC adaptadas a humanos e animais em macrófagos THP-1. Para isso, foi necessário desenvolver um objetivo adicional para o estabelecimento de um método alternativo de quantificação das micobactérias por citometria de fluxo. Isso se deve a observação de que nossas quantificações por UFC de *M.tb* apresentaram discrepâncias significativas quando comparada as outras espécies, mesmo em D.O._{600nm} similares. Reportamos também que esse efeito não é único do meio sólido 7H10 e que em meio 7H9-ágar foi observado o mesmo padrão. Assim, testamos dois métodos de quantificação por citometria de fluxo: (i) com das bactérias marcadas com o corante fluorescente CF-SE e (ii) com bactérias constitutivamente fluorescentes. Nossos resultados demonstraram que a utilização do fluoróforo CF-SE não marca 100% da população bacteriana, levando a valores subestimados de contagem pelo citômetro de fluxo. Por isso, transformamos as micobactérias envolvidas neste estudo em bactérias constitutivamente fluorescentes, o que contornou essa deficiência. Assim, conseguimos estabelecer um protocolo alternativo a UFC que confirmou que as espécies do MTBC (exceto *M.tb*) crescem de forma deficiente nos meios sólidos. Adicionalmente, este método trouxe ganhos com relação a tempo de cultivo, uma vez que resultados de CF podem ser obtidos prontamente e de UFC demoram até 30 dias. Vale ressaltar que apesar do método ser eficaz, o citômetro de fluxo pode encontrar dificuldades de detectar eventos menores que 0,5 μm quando na presença de *debris* do meio de cultivo. Como perspectivas futuras seria necessário desenvolver meios sólidos de cultivo que supram as necessidades metabólicas individuais de cada espécie do MTBC conseguindo, assim, quantificá-las de forma comparável a *M.tb*.

A dinâmica de infecção das espécies do MTBC nos macrófagos THP-1 foi avaliada quanto aos seus índices de fagocitose, replicação intracelular e morte celular por apoptose e necrose. Pela primeira vez foi reportado, de forma comparativa, as taxas de infecção e índices fagocitose de espécies do MTBC e *M. canettii* em macrófagos THP-1. Foi observado que as espécies do MTBC, exceto *M. caprae*, infectam e são internalizadas pelos os macrófagos de forma dose-dependente. Por sua vez, *M. caprae* apresentou índices de fagocitose consistentemente maiores, independente da MOI reduzida, quando comparado as espécies do MTBC. Os índices de fagocitose de outras espécies do MTBC só equipararam com *M. caprae* quando MOIs elevadas foram utilizadas. Adicionalmente, reportamos a perda espontânea de uma das cópias do gene *pks5* da estirpe de *M. canettii* utilizada neste estudo possivelmente explica os maiores níveis de fagocitose nesta espécie comparada ao MTBC. (BORITSCH *et al.*,

2016b) Assim, como passos futuros seria necessário mapear os receptores celulares envolvidos nestas espécies, principalmente *M. caprae* e *M. canettii*, para determinar suas influências na promoção da fagocitose. Adicionalmente, os índices de fagocitose podem ser reavaliados em uma espécie de *M. canettii* que contenha as duas cópias do gene *pks5*, o que poderia demonstrar se houve um ganho de *fitness* bacteriano no nosso modelo experimental. Por fim, reportamos os níveis de apoptose e necrose dos macrófagos THP-1 infectados com as espécies do MTBC e *M. canettii* ao longo de 96h. Nossos resultados mostraram que os níveis de apoptose se comportaram de forma similar ao longo da infecção, exceto por *M. caprae* e *M. bovis* em 24h p.i. e *M. canettii* em 96h p.i. Quanto a necrose, observamos um aumento em 48h p.i. e, em 72h e 96h p.i. a espécie *M. caprae* superou os níveis de necrose induzido pelas outras espécies. Até o momento, não sabemos os mecanismos celulares envolvidos nesta maior indução de necrose dos macrófagos infectados por *M. caprae*. Assim, experimentos futuros são necessários para entender esses mecanismos e expandir o conhecimento da interação patógeno-hospedeiro de diferentes espécies do MTBC. Com isso, avanços científicos podem ser feitos no desenvolvimento de fármacos específicos para erradicação da TB no mundo.

Por fim, salienta-se que as interrupções causadas pela pandemia do SARS-CoV-2 e os desafios metodológicos encontrados neste trabalho impediram o cumprimento de todos os objetivos originalmente propostos no projeto de mestrado. Esses objetivos foram também modificados para acomodar a necessidade de se desenvolver uma metodologia de quantificação bacteriana, cuja ausência impedia o andamento do projeto como um todo. Mesmo com essas adversidades, os resultados apresentados nesta dissertação trouxeram importantes contribuições metodológicas e de entendimento da infecção do macrófago por espécies do MTBC e *M. canettii*, algumas nunca antes descritas.

8. REFERÊNCIAS

ACHARYA, B.; ACHARYA, A.; GAUTAM, S.; GHIMIRE, S. P.; MISHRA, G.; PARAJULI, N.; SAPKOTA, B. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 4065–4075, 1 maio 2020.

AGUILÓ, N.; URANGA, S.; MARINOVA, D.; MARTÍN, C.; PARDO, J. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by Mycobacterium tuberculosis. **Cell death & disease**, v. 5, n. 7, p. e1343, 17 jul. 2014a.

AGUILÓ, N.; URANGA, S.; MARINOVA, D.; MARTÍN, C.; PARDO, J. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by Mycobacterium tuberculosis. **Cell death & disease**, v. 5, n. 7, p. e1343, 17 jul. 2014b.

AMARAL, E. P.; COSTA, D. L.; NAMASIVAYAM, S.; RITEAU, N.; KAMENYEVA, O.; MITTEREDER, L.; MAYER-BARBER, K. D.; ANDRADE, B. B.; SHER, A. A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis–induced cell death and tissue necrosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 3, p. 556–570, 4 mar. 2019.

AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D’IMPÉRIO-LIMA, M. R. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 11–20, jan. 2016a.

AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D’IMPÉRIO-LIMA, M. R. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 11–20, jan. 2016b.

ARNETT, E.; WEAVER, A. M.; WOODYARD, K. C.; MONTROYA, M. J.; LI, M.; HOANG, K. V.; HAYHURST, A.; AZAD, A. K.; SCHLESINGER, L. S. PPAR γ is critical for Mycobacterium tuberculosis induction of Mcl-1 and limitation of human macrophage apoptosis. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007100, 21 jun. 2018.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; GAN, H. X.; REMOLD, H. G. Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with Mycobacterium avium attenuates mycobacteria-induced apoptosis by reduction of TNF-alpha activity. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 4, p. 1230–1237, 1999.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. v.; SIROTKIN, A. v.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 1 maio 2012.

BARR, D. A.; OMOLLO, C.; MASON, M.; KOCH, A.; WILKINSON, R. J.; LALLOO, D. G.; MEINTJES, G.; MIZRAHI, V.; WARNER, D. F.; DAVIES, G. Flow cytometry method for absolute counting and single-cell phenotyping of mycobacteria. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2021a.

BARR, D. A.; OMOLLO, C.; MASON, M.; KOCH, A.; WILKINSON, R. J.; LALLOO, D. G.; MEINTJES, G.; MIZRAHI, V.; WARNER, D. F.; DAVIES, G. Flow cytometry method for absolute counting and single-cell phenotyping of mycobacteria. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 20 set. 2021b.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D.; LABADIE, J. C.; LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, n. 3, p. 225–232, 1 jun. 1996.

BEHAR, S. M.; MARTIN, C. J.; BOOTY, M. G.; NISHIMURA, T.; ZHAO, X.; GAN, H. X.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 3, p. 279–287, maio 2011.

BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2350–2351, 1999.

BERNEY, M.; HAMMES, F.; BOSSHARD, F.; WEILENMANN, H. U.; EGLI, T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3283–3290, maio 2007.

BIZZARRI, C.; BECCARI, A. R.; BERTINI, R.; CAVICCHIA, M. R.; GIORGINI, S.; ALLEGRETTI, M. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1

and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 139–149, out. 2006.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

BORITSCH, E. C.; FRIGUI, W.; CASCIOFERRO, A.; MALAGA, W.; ETIENNE, G.; LAVAL, F.; PAWLIK, A.; LE CHEVALIER, F.; ORGEUR, M.; MA, L.; BOUCHIER, C.; STINEAR, T. P.; SUPPLY, P.; MAJLESSI, L.; DAFFÉ, M.; GUILHOT, C.; BROSCHE, R. pks5-recombination-mediated surface remodelling in Mycobacterium tuberculosis emergence. **Nature Microbiology** 2016 1:2, v. 1, n. 2, p. 1–11, 27 jan. 2016a.

BORITSCH, E. C.; FRIGUI, W.; CASCIOFERRO, A.; MALAGA, W.; ETIENNE, G.; LAVAL, F.; PAWLIK, A.; LE CHEVALIER, F.; ORGEUR, M.; MA, L.; BOUCHIER, C.; STINEAR, T. P.; SUPPLY, P.; MAJLESSI, L.; DAFFÉ, M.; GUILHOT, C.; BROSCHE, R. pks5-recombination-mediated surface remodelling in Mycobacterium tuberculosis emergence. **Nature Microbiology** 2016 1:2, v. 1, n. 2, p. 1–11, 27 jan. 2016b. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201519>>.

BOWDISH, D. M. E.; SAKAMOTO, K.; KIM, M. J.; KROOS, M.; MUKHOPADHYAY, S.; LEIFER, C. A.; TRYGGVASON, K.; GORDON, S.; RUSSELL, D. G. MARCO, TLR2, and CD14 Are Required for Macrophage Cytokine Responses to Mycobacterial Trehalose Dimycolate and Mycobacterium tuberculosis. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. e1000474, jun. 2009.

BUSSI, C.; GUTIERREZ, M. G. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. **FEMS microbiology reviews**, v. 43, n. 4, p. 341–361, 1 jul. 2019.

CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M.; FLYNN, J. L. **Heterogeneity in tuberculosis** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, 27 out. 2017.

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 3, p. 196–201, 1 mar. 2014.

CAPPELLI, G.; VOLPE, P.; SANDUZZI, A.; SACCHI, A.; COLIZZI, V.; MARIANI, F. Human Macrophage Gamma Interferon Decreases Gene Expression but Not Replication of Mycobacterium tuberculosis: Analysis of the Host-Pathogen Reciprocal Influence on

Transcription in a Comparison of Strains H37Rv and CMT97. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7262–7270, 1 dez. 2001.

CHAI, Q.; WANG, L.; LIU, C. H.; GE, B. New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. **Cellular & Molecular Immunology** 2020 17:9, v. 17, n. 9, p. 901–913, 29 jul. 2020.

CHINER-OMS, Á.; COMAS, I. Large genomics datasets shed light on the evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 72, p. 10–15, 1 ago. 2019.

CHINER-OMS; SÁNCHEZ-BUSÓ, L.; CORANDER, J.; GAGNEUX, S.; HARRIS, S. R.; YOUNG, D.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; COMAS, I. Genomic determinants of speciation and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Science Advances**, v. 5, n. 6, 12 jun. 2019.

CLAY, H.; VOLKMAN, H. E.; RAMAKRISHNAN, L. Tumor Necrosis Factor Signaling Mediates Resistance to *Mycobacteria* by Inhibiting Bacterial Growth and Macrophage Death. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 283–294, 15 ago. 2008.

COHEN, S. B.; GERN, B. H.; DELAHAYE, J. L.; ADAMS, K. N.; PLUMLEE, C. R.; WINKLER, J. K.; SHERMAN, D. R.; GERNER, M. Y.; URDAHL, K. B. Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 3, p. 439–446.e4, 12 set. 2018.

CUNDELL, T. The limitations of the colony-forming unit in microbiology. **European Pharmaceutical Review**, v. 20, n. 6, p. 11–13, 2015.

DE MARTINO, M.; LODI, L.; GALLI, L.; CHIAPPINI, E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, p. 350, 27 ago. 2019.

DERETIC, V.; SINGH, S.; MASTER, S.; HARRIS, J.; ROBERTS, E.; KYEI, G.; DAVIS, A.; DE HARO, S.; NAYLOR, J.; LEE, H.-H.; VERGNE, I. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 719–727, maio 2006.

DERRICK, S. C.; MORRIS, S. L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1547–1555, 1 jun. 2007.

DIVANGAHI, M.; BEHAR, S. M.; REMOLD, H. Dying to live: How the death modality of the infected macrophage modulates immunity to Tuberculosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 783, p. 103–120, 2013.

DOMINGO-GONZALEZ, R.; PRINCE, O.; COOPER, A.; KHADER, S. A. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. **Tuberculosis and the Tubercle Bacillus: Second Edition**, p. 33–72, 5 set. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1128/9781555819569.ch2>>.

DUAN, L.; GAN, H.; GOLAN, D. E.; REMOLD, H. G. Critical Role of Mitochondrial Damage in Determining Outcome of Macrophage Infection with Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5181–5187, 1 nov. 2002.

ESQUIVEL-SOLÍS, H.; QUIÑONES-FALCONI, F.; ZARAIN-HERZBERG, A.; AMIEVA-FERNÁNDEZ, R. I.; LÓPEZ-VIDAL, Y. Impaired activation of Stat1 and c-Jun as a possible defect in macrophages of patients with active tuberculosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 158, n. 1, p. 45–54, out. 2009.

FEY, A.; EICHLER, S.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R.; HÖFLE, M. G.; GUZMÁN, C. A. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using Salmonella as a model organism. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3618–3623, jun. 2004.

FRATTI, R. A.; CHUA, J.; VERGNE, I.; DERETIC, V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5437–5442, 29 abr. 2003.

FREEMAN, S. A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunological reviews**, v. 262, n. 1, p. 193–215, 1 nov. 2014.

FREMOND, C. M.; TOGBE, D.; DOZ, E.; ROSE, S.; VASSEUR, V.; MAILLET, I.; JACOBS, M.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V. F. J. IL-1 Receptor-Mediated Signal Is an Essential Component of MyD88-Dependent Innate Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1178–1189, 15 jul. 2007.

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 202–213, fev. 2018.

GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature**, v. 15, 2014.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 514–532, 1 maio 2012. .

GIACOMINI, E.; IONA, E.; FERRONI, L.; MIETTINEN, M.; FATTORINI, L.; OREFICI, G.; JULKUNEN, I.; COCCIA, E. M. Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7033–7041, 15 jun. 2001.

GOPALASWAMY, R.; SHANMUGAM, S.; MONDAL, R.; SUBBIAN, S. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Biomedical Science** 2020 27:1, v. 27, n. 1, p. 1–17, 17 jun. 2020.

GROOM, J. R.; LUSTER, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. **Immunology and cell biology**, v. 89, n. 2, p. 207–15, fev. 2011.

HARDING, C. v.; BOOM, W. H. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. **Nature Reviews Microbiology** 2010 8:4, v. 8, n. 4, p. 296–307, abr. 2010.

HONDA, J. R.; VIRDI, R.; CHAN, E. D. Global environmental nontuberculous mycobacteria and their contemporaneous man-made and natural niches. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 2029, 30 ago. 2018.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 710–730, 1 set. 2010.

JAUMOUILLÉ, V.; WATERMAN, C. M. Physical Constraints and Forces Involved in Phagocytosis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1097, 12 jun. 2020.

JOHNSON, B. K.; ABRAMOVITCH, R. B. Macrophage Infection Models for Mycobacterium tuberculosis. *Em: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [s.l: s.n.].p. 329–341.

JOHNSON, I.; SPENCE, M. T. Z. (ed.). **Introduction to Fluorescence Techniques Molecular Probes™ Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Edition (2010) Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives**

The Molecular Probes® Handbook A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES . 11. ed. [s.l: s.n.]

JUÁREZ, E.; CARRANZA, C.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, F.; LEÓN-CONTRERAS, J. C.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; ESCOBEDO, D.; TORRES, M.; SADA, E. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 4, p. 880–889, abr. 2012.

JULIÁN, E.; ROLDÁN, M.; SÁNCHEZ-CHARDI, A.; ASTOLA, O.; AGUSTÍ, G.; LUQUIN, M. Microscopic Cords, a Virulence-Related Characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, Are Also Present in Nonpathogenic *Mycobacteria*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 7, p. 1751, abr. 2010.

KANABALAN, R. D.; LEE, L. J.; LEE, T. Y.; CHONG, P. P.; HASSAN, L.; ISMAIL, R.; CHIN, V. K. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126674, 1 maio 2021.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 20 maio 2010.

KAZDA, J.; FALKINHAM, J. O.; PAVLIK, I.; HRUSKA, K. **The ecology of mycobacteria: Impact on animal's and human's health**. 2. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 2009. v. 18 p.

KIM, H.-E.; DU, F.; FANG, M.; WANG, X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 49, p. 17545–17550, 6 dez. 2005.

KINCAID, E. Z.; ERNST, J. D. *Mycobacterium tuberculosis* Exerts Gene-Selective Inhibition of Transcriptional Responses to IFN- γ Without Inhibiting STAT1 Function. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 4, p. 2042–2049, 15 ago. 2003.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143–161, 1 nov. 2002.

KRAEMER ZIMPEL, C.; BRANDÃO, P. E.; SOUZA FILHO, A. F. de; DE SOUZA, R. F.; YKUTA, C. Y.; SOARES FERREIRA NETO, J.; SOLER CAMARGO, N. C.; BRYAN

HEINEMANN, M.; GUIMARAES, A. M. S. Complete genome sequencing of *Mycobacterium bovis* SP38 and comparative genomics of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2389, 2017.

KRISHNAN, N.; ROBERTSON, B. D.; THWAITES, G. Pathways of IL-1 β secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93, n. 5, p. 538–47, set. 2013.

KRISTIN N; MOGUCHE, A. O.; PLUMLEE, C. R.; URDAHL, K. B. **TGF- β -mediated inhibition of IFN- γ production by *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells in the infected lung**. [s.l.] The Journal of Immunology, 2016. v. 196

LACROIX, R.; ROBERT, S.; PONCELET, P.; DIGNAT-GEORGE, F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 36, n. 8, p. 807–818, 2010. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0030-1267034>>.

LE CABEC, V.; CARRÉNO, S.; MOISAND, A.; BORDIER, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. Complement Receptor 3 (CD11b/CD18) Mediates Type I and Type II Phagocytosis During Nonopsonic and Opsonic Phagocytosis, Respectively. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 4, p. 2003–2009, 15 ago. 2002.

LEISCHING, G.; PIETERSEN, R. D.; MPONGOSHE, V.; VAN HEERDEN, C.; VAN HELDEN, P.; WIID, I.; BAKER, B. The host response to a clinical MDR mycobacterial strain cultured in a detergent- free environment: A global transcriptomics approach. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–16, 2016.

LEWIS, A. H.; FALKINHAM, J. O. Microaerobic growth and anaerobic survival of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. **International journal of mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 25–30, 1 mar. 2015.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHARDJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479–89, 14 nov. 1997.

LINDQVIST, R. Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: Characterization of strain variation and comparison of methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4862–4870, jul. 2006.

LYONS, S. R.; GRIFFEN, A. L.; LEYS, E. J. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2362–2365, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. [s.l.] Artmed Editora, 2016. v. 1157–158 p.

MALONE, K. M.; RUE-ALBRECHT, K.; MAGEE, D. A.; CONLON, K.; SCHUBERT, O. T.; NALPAS, N. C.; BROWNE, J. A.; SMYTH, A.; GORMLEY, E.; AEBERSOLD, R.; MACHUGH, D. E.; GORDON, S. v. Comparative 'omics analyses differentiate *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* and reveal distinct macrophage responses to infection with the human and bovine tubercle bacilli. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 3, p. e000163, 1 mar. 2018.

MARAKALALA, M. J.; RAJU, R. M.; SHARMA, K.; ZHANG, Y. J.; EUGENIN, E. A.; PRIDEAUX, B.; DAUDELIN, I. B.; CHEN, P. Y.; BOOTY, M. G.; KIM, J. H.; EUM, S. Y.; VIA, L. E.; BEHAR, S. M.; BARRY, C. E.; MANN, M.; DARTOIS, V.; RUBIN, E. J. Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized. **Nature Medicine**, v. 22, n. 5, p. 531–538, 1 maio 2016.

MARTINEZ, L.; VERMA, R.; CRODA, J.; HORSBURGH, C. R.; WALTER, K. S.; DEGNER, N.; MIDDELKOOP, K.; KOCH, A.; HERMANS, S.; WARNER, D. F.; WOOD, R.; COBELENS, F.; ANDREWS, J. R. Detection, survival and infectious potential of *Mycobacterium tuberculosis* in the environment: a review of the evidence and epidemiological implications. **European Respiratory Journal**, v. 53, n. 6, p. 1802302, 1 jun. 2019.

MAYER-BARBER, K. D.; BARBER, D. L.; SHENDEROV, K.; WHITE, S. D.; WILSON, M. S.; CHEEVER, A.; KUGLER, D.; HIENY, S.; CASPAR, P.; NÚÑEZ, G.; SCHLUETER, D.; FLAVELL, R. A.; SUTTERWALA, F. S.; SHER, A. Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 β Production Is Critical for Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3326–3330, 1 abr. 2010.

MCCALL, K. Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 6, p. 882–8, dez. 2010.

MCNAB, F. W.; EWBANK, J.; HOWES, A.; MOREIRA-TEIXEIRA, L.; MARTIROSYAN, A.; GHILARDI, N.; SARAIVA, M.; O'GARRA, A. Type I IFN Induces

IL-10 Production in an IL-27–Independent Manner and Blocks Responsiveness to IFN- γ for Production of IL-12 and Bacterial Killing in *Mycobacterium tuberculosis* –Infected Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 7, p. 3600–3612, 1 out. 2014.

MEENA, L. S.; RAJNI, T. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **The FEBS journal**, v. 277, n. 11, p. 2416–2427, jun. 2010.

MISHRA, A.; AKHTAR, S.; JAGANNATH, C.; KHAN, A. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. **Molecular Immunology**, v. 87, p. 240–248, jul. 2017a.

MISHRA, A.; AKHTAR, S.; JAGANNATH, C.; KHAN, A. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. **Molecular immunology**, v. 87, p. 240–248, 1 jul. 2017b.

MISHRA, B. B.; MOURA-ALVES, P.; SONAWANE, A.; HACOEN, N.; GRIFFITHS, G.; MOITA, L. F.; ANES, E. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046–1063, ago. 2010a.

MISHRA, B. B.; MOURA-ALVES, P.; SONAWANE, A.; HACOEN, N.; GRIFFITHS, G.; MOITA, L. F.; ANES, E. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046–1063, ago. 2010b.

MOLDOVEANU, T.; FOLLIS, A. V.; KRIWACKI, R. W.; GREEN, D. R. Many players in BCL-2 family affairs. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 3, p. 101–111, mar. 2014.

MONIN, L.; KHADER, S. A. Chemokines in tuberculosis: the good, the bad and the ugly. **Seminars in immunology**, v. 26, n. 6, p. 552–8, dez. 2014.

MORACO, A. H.; KORNFELD, H. Cell death and autophagy in tuberculosis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 497–511, dez. 2014a.

MORACO, A. H.; KORNFELD, H. Cell death and autophagy in tuberculosis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 497–511, dez. 2014b.

MORTAZ, E.; ADCOCK, I. M.; TABARSI, P.; MASJEDI, M. R.; MANSOURI, D.; VELAYATI, A. A.; CASANOVA, J.-L.; BARNES, P. J. Interaction of Pattern Recognition

Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2015.

MOTTOLA, G. The complexity of Rab5 to Rab7 transition guarantees specificity of pathogen subversion mechanisms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 180, 2014.

MUTHUKRISHNAN, T.; GOVENDER, A.; DOBRETsov, S.; ABED, R. M. M. Evaluating the Reliability of Counting Bacteria Using Epifluorescence Microscopy. 2016. . Acesso em: 1 jan. 2023.

NATHAN, C. F.; PRENDERGAST, T. J.; WIEBE, M. E.; RICHARD STANLEY, E.; PLATZER, E.; REMOLD, H. G.; WELTE, K.; RUBIN, B. Y.; MURRAY, H. W. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. **The Journal of experimental medicine**, v. 160, n. 2, p. 600–605, 1 ago. 1984.

NDLOVU, H.; MARAKALALA, M. J. Granulomas and inflammation: Host-directed therapies for tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. OCT, p. 1, 24 out. 2016.

NGABONZIZA, J. C. S.; LOISEAU, C.; MARCEAU, M.; JOUET, A.; MENARDO, F.; TZFADIA, O.; ANTOINE, R.; NIYIGENA, E. B.; MULDERs, W.; FISSETTE, K.; DIELS, M.; GAUDIN, C.; DUTHOY, S.; SSENGOOBA, W.; ANDRÉ, E.; KASWA, M. K.; HABIMANA, Y. M.; BRITES, D.; AFFOLABI, D.; MAZARATI, J. B.; DE JONG, B. C.; RIGOUTS, L.; GAGNEUX, S.; MEEHAN, C. J.; SUPPLY, P. A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 9 jun. 2020.

ODDO, M.; RENNO, T.; ATTINGER, A.; BAKKER, T.; MACDONALD, H. R.; MEYLAN, P. R. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 11, p. 5448–54, 1 jun. 1998a.

ODDO, M.; RENNO, T.; ATTINGER, A.; BAKKER, T.; MACDONALD, H. R.; MEYLAN, P. R. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 11, p. 5448–54, 1 jun. 1998b.

ODDO, M.; RENNO, T.; ATTINGER, A.; BAKKER, T.; ROBSON MACDONALD, H.; MEYLAN, P. R. A Fas Ligand-Induced Apoptosis of Infected Human Macrophages

Reduces the Viability of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* 1. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 5448–5454, 1998c.

ORGEUR, M.; BROSCHE, R. **Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex** *Current Opinion in Microbiology* Elsevier Ltd, 1 fev. 2018.

OTHIENO, C.; HIRSCH, C. S.; HAMILTON, B. D.; WILKINSON, K.; ELLNER, J. J.; TOOSSI, Z. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*-induced transforming growth factor β 1 and interleukin-10. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5730–5735, 1999.

PARBHOO, T.; SAMPSON, S. L.; MOUTON, J. M. Recent Developments in the Application of Flow Cytometry to Advance our Understanding of *Mycobacterium tuberculosis* Physiology and Pathogenesis. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 7, p. 683–693, 1 jul. 2020.

PENG, X.; SUN, J. Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Toxicon**, v. 116, p. 29–34, 15 jun. 2016.

PETHE, K.; SWENSON, D. L.; ALONSO, S.; ANDERSON, J.; WANG, C.; RUSSELL, D. G. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 37, p. 13642–13647, 14 set. 2004.

PFYFFER, G. E.; PALICOVA, F. *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*. **Em: Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition**. 10th. ed. [s.l.] American Society of Microbiology, 2015. p. 472–502.

PRISCILLA MARIANE CARDOSO; ZAMBUZI, F. A.; LIMA, L.; BRAUER, V.; SOARES, L.; FONTANARI, C.; BOLLELA, V.; FRANTZ, F. **Neutrophils plasticity during *Mycobacterium tuberculosis* infection is related to the disease progression**. [s.l.] Williams & Wilkins, 2017. v. 198138.2-138.2 p.

QUIGLEY, J.; HUGHITT, V. K.; VELIKOVSKY, C. A.; MARIUZZA, R. A.; EL-SAYED, N. M.; BRIKEN, V. The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. **mBio**, v. 8, n. 2, 1 mar. 2017a.

QUIGLEY, J.; HUGHITT, V. K.; VELIKOVSKY, C. A.; MARIUZZA, R. A.; EL-SAYED, N. M.; BRIKEN, V. The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. **mBio**, v. 8, n. 2, 1 mar. 2017b.

RAO, N.; MEENA, L. S. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and Cord Factor: An Overview. **Research Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011.

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O'GARRA, A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 261–270, 30 maio 2011.

REKHA, R. S.; RAO MUVVA, S. J.; WAN, M.; RAQIB, R.; BERGMAN, P.; BRIGHENTI, S.; GUDMUNDSSON, G. H.; AGERBERTH, B. Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. **Autophagy**, v. 11, n. 9, p. 1688–1699, 2 set. 2015.

REPASY, T.; LEE, J.; MARINO, S.; MARTINEZ, N.; KIRSCHNER, D. E.; HENDRICKS, G.; BAKER, S.; WILSON, A. A.; KOTTON, D. N.; KORNFELD, H. Intracellular Bacillary Burden Reflects a Burst Size for *Mycobacterium tuberculosis* In Vivo. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003190, 21 fev. 2013.

RIENDEAU, C. J.; KORNFELD, H. THP-1 cell apoptosis in response to *Mycobacterial* infection. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 254–9, jan. 2003.

RINSOZ, T.; DUQUENNE, P.; GREFF-MIRGUET, G.; OPPLIGER, A. Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods. **Atmospheric Environment**, v. 42, n. 28, p. 6767–6774, 1 set. 2008.

RODRIGUES, M. F.; ALVES, C. C. S.; FIGUEIREDO, B. B. M.; REZENDE, A. B.; WOHLRES-VIANA, S.; SILVA, V. L. da; MACHADO, M. A.; TEIXEIRA, H. C. Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent *Mycobacterium bovis*. **Immunology**, v. 139, n. 4, p. 503–512, ago. 2013.

ROMANO, G. E.; SILVA-PEREIRA, T. T.; DE MELO, F. M.; SISCO, M. C.; BANARI, A. C.; ZIMPEL, C. K.; SOLER-CAMARGO, N. C.; GUIMARÃES, A. M. de S. Unraveling the metabolism of *Mycobacterium caprae* using comparative genomics. **Tuberculosis**, v. 136, p. 102254, 1 set. 2022.

RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 569–578, ago. 2001.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 11 jan. 2007.

RYAN, G. J.; SHAPIRO, H. M.; LENAERTS, A. J. Improving acid-fast fluorescent staining for the detection of mycobacteria using a new nucleic acid staining approach. **Tuberculosis**, v. 94, n. 5, p. 511–518, 1 set. 2014.

SAIKOLAPPAN, S.; ESTRELLA, J.; SASINDRAN, S. J.; KHAN, A.; ARMITIGE, L. Y.; JAGANNATH, C.; DHANDAYUTHAPANI, S. The fbpA/sapM Double Knock Out Strain of *Mycobacterium tuberculosis* Is Highly Attenuated and Immunogenic in Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36198, 4 maio 2012.

SARAAV, I.; SINGH, S.; SHARMA, S. Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? **Immunology and cell biology**, v. 92, n. 9, p. 741–746, 25 out. 2014.

SCHOENEN, H.; BODENDORFER, B.; HITCHENS, K.; MANZANERO, S.; WERNINGHAUS, K.; NIMMERJAHN, F.; AGGER, E. M.; STENGER, S.; ANDERSEN, P.; RULAND, J.; BROWN, G. D.; WELLS, C.; LANG, R. Cutting Edge: Mincle Is Essential for Recognition and Adjuvanticity of the Mycobacterial Cord Factor and its Synthetic Analog Trehalose-Dibehenate. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 6, p. 2756–2760, 15 mar. 2010.

SEO, E. Y.; AHN, T. S.; ZO, Y. G. Agreement, precision, and accuracy of epifluorescence microscopy methods for enumeration of total bacterial numbers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1981–1991, mar. 2010a.

SEO, E. Y.; AHN, T. S.; ZO, Y. G. Agreement, precision, and accuracy of epifluorescence microscopy methods for enumeration of total bacterial numbers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1981–1991, mar. 2010b.

SIA, J. K.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–12, 2015a.

SIA, J. K.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–12, 2015b.

SIA, J. K.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–12, 2015c.

SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 4, 19 jul. 2019.

SIMEONE, R.; BOBARD, A.; LIPPMANN, J.; BITTER, W.; MAJLESSI, L.; BROSCHE, R.; ENNINGA, J. Phagosomal Rupture by *Mycobacterium tuberculosis* Results in Toxicity and Host Cell Death. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002507, fev. 2012a.

SIMEONE, R.; BOBARD, A.; LIPPMANN, J.; BITTER, W.; MAJLESSI, L.; BROSCHE, R.; ENNINGA, J. Phagosomal Rupture by *Mycobacterium tuberculosis* Results in Toxicity and Host Cell Death. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002507, 2 fev. 2012b.

SIMEONE, R.; SAYES, F.; SONG, O.; GRÖSCHEL, M. I.; BRODIN, P.; BROSCHE, R.; MAJLESSI, L. Cytosolic Access of *Mycobacterium tuberculosis*: Critical Impact of Phagosomal Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004650, 6 fev. 2015.

SIMON, A. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. . Acesso em: 13 jan. 2023.

SLY, L. M.; HINGLEY-WILSON, S. M.; REINER, N. E.; MCMASTER, W. R. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 1, p. 430–437, 1 jan. 2003.

SOOLINGEN, D. van; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in enzymology**, v. 235, n. C, p. 196–205, 1 jan. 1994.

STEPHEN-VICTOR, E.; SHARMA, V. K.; DAS, M.; KARNAM, A.; SAHA, C.; LECERF, M.; GALEOTTI, C.; KAVERI, S. V.; BAYRY, J. IL-1 β , But Not Programed Death-1 and Programed Death Ligand Pathway, Is Critical for the Human Th17 Response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 465, 4 nov. 2016.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P.; COLLINS, H.; FOK, A.; ALLEN, R.; GLUCK, S.; HEUSER, J.; RUSSELL, D. Lack of

acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678–681, 4 fev. 1994.

SUPPLY, P.; BROSCHE, R. The biology and epidemiology of mycobacterium canettii. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1019, p. 27–41, 2017.

SUPPLY, P.; MARCEAU, M.; MANGENOT, S.; ROCHE, D.; ROUANET, C.; KHANNA, V.; MAJLESSI, L.; CRISCUOLO, A.; TAP, J.; PAWLIK, A.; FIETTE, L.; ORGEUR, M.; FABRE, M.; PARMENTIER, C.; FRIGUI, W.; SIMEONE, R.; BORITSCH, E. C.; DEBRIE, A.-S.; WILLERY, E.; WALKER, D.; QUAIL, M. A.; MA, L.; BOUCHIER, C.; SALVIGNOL, G.; SAYES, F.; CASCIOFERRO, A.; SEEMANN, T.; BARBE, V.; LOCHT, C.; GUTIERREZ, M.-C.; LECLERC, C.; BENTLEY, S. D.; STINEAR, T. P.; BRISSE, S.; MÉDIGUE, C.; PARKHILL, J.; CRUVEILLER, S.; BROSCHE, R. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis. **Nature Genetics**, v. 45, n. 2, p. 172–179, 6 fev. 2013.

TAN, S.; YATES, R. M.; RUSSELL, D. G. Mycobacterium tuberculosis: Readouts of bacterial fitness and the environment within the phagosome. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1519, p. 333, 2017. . Acesso em: 27 out. 2021.

THEUS, S. A.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D. Activated THP-1 Cells: an Attractive Model for the Assessment of Intracellular Growth Rates of Mycobacterium tuberculosis Isolates. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 72, n. 2, p. 1169–1173, 2004.

TRUMAN, R. W.; ANDREWS, P. K.; ROBBINS, N. Y.; ADAMS, L. B.; KRAHENBUHL, J. L.; GILLIS, T. P. Enumeration of Mycobacterium leprae Using Real-Time PCR. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, p. e328, 2008.

TURANO, A.; PIRALI, F. Quantification Methods in Microbiology. **Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases**, p. 8–13, 1988.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1066, 2 jun. 2020.

VAN DEN STEEN, P. E.; HUSSON, S. J.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Carboxyterminal cleavage of the chemokines MIG and IP-10 by gelatinase B and neutrophil collagenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 3, p. 889–896, 24 out. 2003.

VAN DEN STEEN, P. E.; PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2673–81, 15 out. 2000.

VAN DER WEL, N.; HAVA, D.; HOUBEN, D.; FLUITSMA, D.; VAN ZON, M.; PIERSON, J.; BRENNER, M.; PETERS, P. J. M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1287–1298, 29 jun. 2007.

VAN TONGEREN, S. P.; DEGENER, J. E.; HARMSSEN, H. J. M. Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 9, p. 1053–1061, 11 set. 2011.

VELASCO-VELÁZQUEZ, M. A.; BARRERA, D.; GONZÁLEZ-ARENAS, A.; ROSALES, C.; AGRAMONTE-HEVIA, J. Macrophage—Mycobacterium tuberculosis interactions: role of complement receptor 3. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, n. 3, p. 125–131, 1 set. 2003.

VERGNE, I.; CHUA, J.; LEE, H.-H.; LUCAS, M.; BELISLE, J.; DERETIC, V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 11, p. 4033–4038, 15 mar. 2005.

VOLPE, E.; CAPPELLI, G.; GRASSI, M.; MARTINO, A.; SERAFINO, A.; COLIZZI, V.; SANARICO, N.; MARIANI, F. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with Mycobacterium tuberculosis. **Immunology**, v. 118, n. 4, p. 449–460, ago. 2006.

VU, A.; CALZADILLA, A.; GIDFAR, S.; CALDERON-CANDELARIO, R.; MIRSAEIDI, M. Toll-like receptors in mycobacterial infection. **European Journal of Pharmacology**, v. 808, p. 1–7, ago. 2017.

WANG, J. P.; ROUGHT, S. E.; CORBEIL, J.; GUINEY, D. G. Gene expression profiling detects patterns of human macrophage responses following *Mycobacterium tuberculosis* infection. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 163–172, 28 nov. 2003.

WANG, Y.; CURRY, H. M.; ZWILLING, B. S.; LAFUSE, W. P. Mycobacteria Inhibition of IFN- γ Induced HLA-DR Gene Expression by Up-Regulating Histone Deacetylation at the Promoter Region in Human THP-1 Monocytic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5687–5694, 1 maio 2005.

WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.; CHEGE, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 7, p. 818–822, jul. 2006.

WARSINSKE, H. C.; PIENAAR, E.; LINDERMAN, J. J.; MATTILA, J. T.; KIRSCHNER, D. E. Deletion of TGF- β 1 Increases Bacterial Clearance by Cytotoxic T Cells in a Tuberculosis Granuloma Model. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1843, 20 dez. 2017.

WAWROCKI, S.; DRUSZCZYNSKA, M. Inflammasomes in *Mycobacterium tuberculosis* -Driven Immunity. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2017, p. 1–9, 4 dez. 2017.

WAYNE, L. G. Cultivation of Mycobacterium tuberculosis for Research Purposes. **Tuberculosis**, p. 73–83, 8 abr. 1994.

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

WHO. **Global Tuberculosis Report 2022**. . Acesso em: 14 dez. 2022.

WONG, D.; BACH, H.; SUN, J.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 48, p. 19371–19376, 29 nov. 2011.

WU, L.; WANG, S.; SONG, Y.; WANG, X.; YAN, X. Applications and challenges for single-bacteria analysis by flow cytometry. **Science China Chemistry** 2015 59:1, v. 59, n. 1, p. 30–39, 15 dez. 2015.

XU, G.; WANG, J.; GAO, G. F.; LIU, C. H. Insights into battles between Mycobacterium tuberculosis and macrophages. **Protein & Cell**, v. 5, n. 10, p. 728–736, 18 out. 2014.

YAMADA, H.; YAMAGUCHI, M.; CHIKAMATSU, K.; AONO, A.; MITARAI, S. Structome analysis of virulent *Mycobacterium tuberculosis*, which survives with only 700 ribosomes per 0.1 fl of cytoplasm. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2015.

ZAPATA, A.; RAMIREZ-ARCOS, S. A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. **Current Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 907–909, 1 jun. 2015.

ZIMPEL, C. K. **Host adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*: a genomic and transcriptional approach**. 2022. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

ZUMERLE, S.; CALÌ, B.; MUNARI, F.; ANGIONI, R.; DI VIRGILIO, F.; MOLON, B.; VIOLA, A. Intercellular calcium signaling induced by ATP potentiates macrophage phagocytosis. **Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 1- 10.e4, 2019.

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

9.1.FIGURA SUPLEMENTAR 1

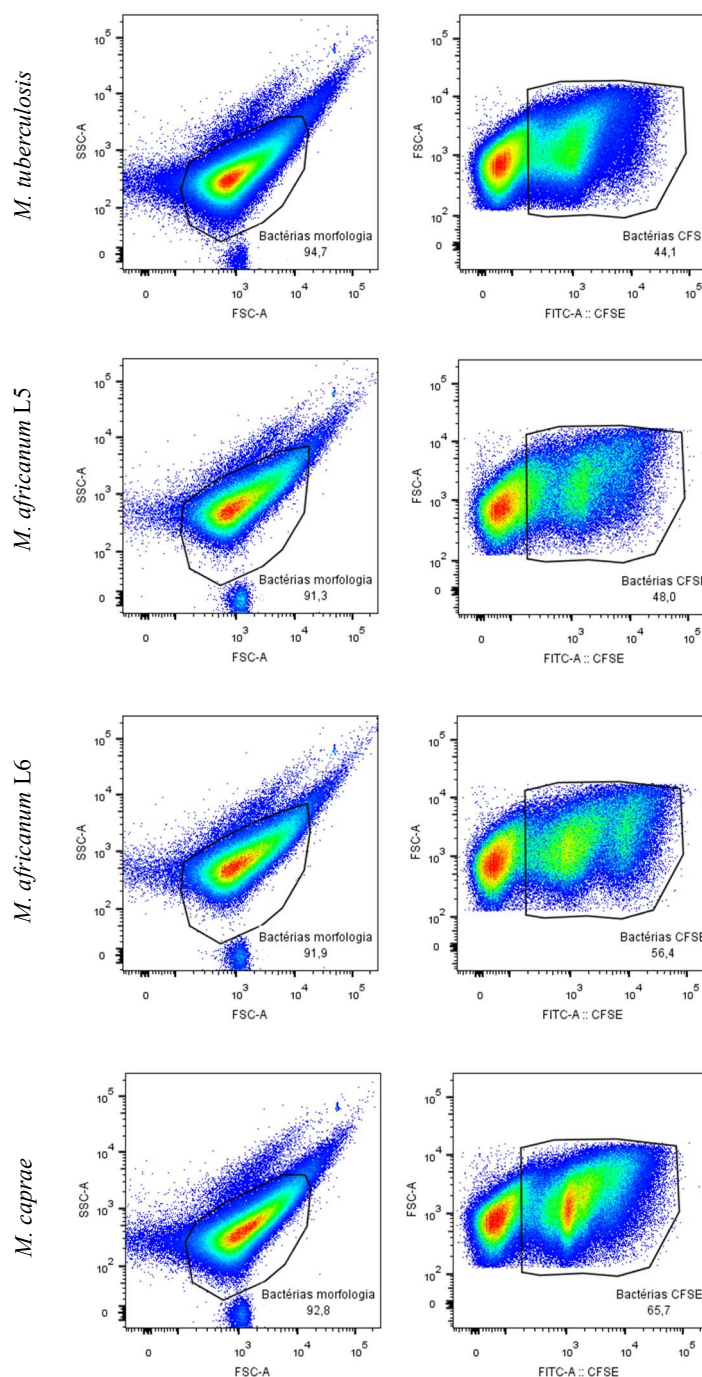


Figura S1. Estratégias de *gating* utilizadas nos ensaios de quantificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* por morfologia e marcação com CF-SE. Cada par de figura mostra as estratégias de *gating* empregadas para seleção da população de bactérias por morfologia e, em seguida, por bactérias positivas para o CF-SE (5-(e-6) carboxyfluorescein, succinilmidyl ester). Os dot plots

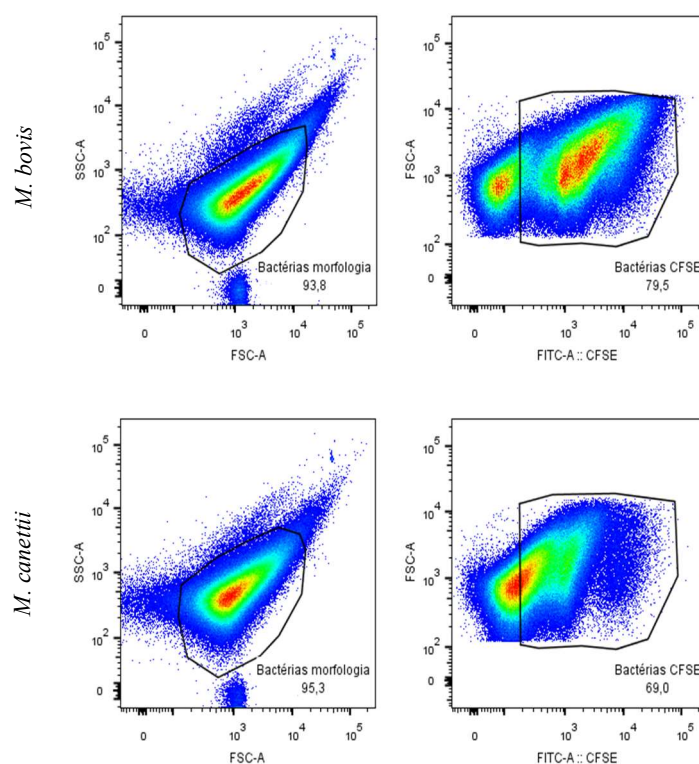


Figura S1. (continuação) Estratégias de *gating* utilizadas nos ensaios de quantificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* por morfologia e marcação com CF-SE. Cada par de figura mostra as estratégias de *gating* empregadas para seleção da população de bactérias por morfologia e, em seguida, por bactérias positivas para o CF-SE (5-(*e*-6) carboxyfluorescein, succinilmidyl ester). Os *dot plots* são representativos de uma replicata técnica.

9.2. FIGURA SUPLEMENTAR 2

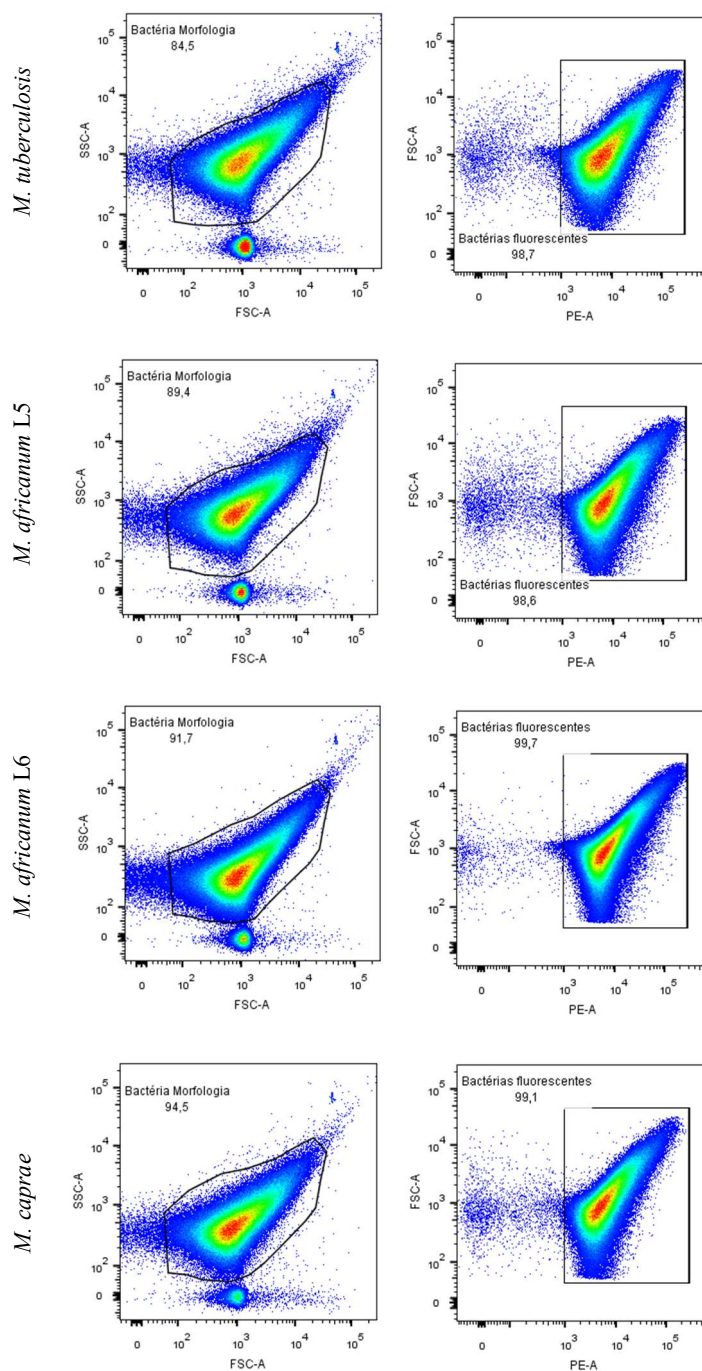


Figura S2. Estratégias de gating de utilizadas nos ensaios de quantificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* transformados com pMSP12::dsRed2. Cada par de figura mostra as estratégias de gating empregadas para seleção da população de bactérias por morfologia e, em seguida, por bactérias positivas para PE-A. Os dot plots são representativos de uma replicata técnica.

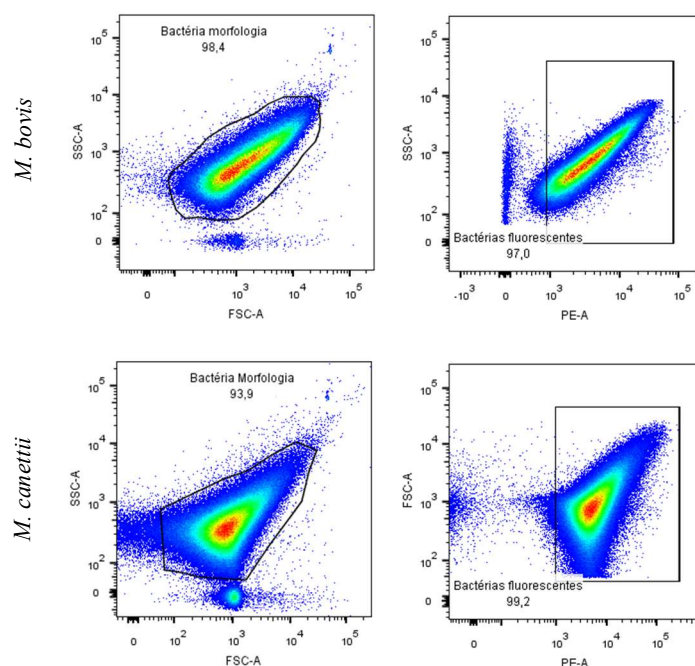


Figura S2. (continuação) Figura S2. Estratégias de *gating* de utilizadas nos ensaios de quantificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* transformados com pMSP12::dsRed2. Cada par de figura mostra as estratégias de *gating* empregadas para seleção da população de bactérias por morfologia e, em seguida, por bactérias positivas para PE-A. Os *dot plots* são representativos de uma replicata técnica.

9.3. FIGURA SUPLEMENTAR 3

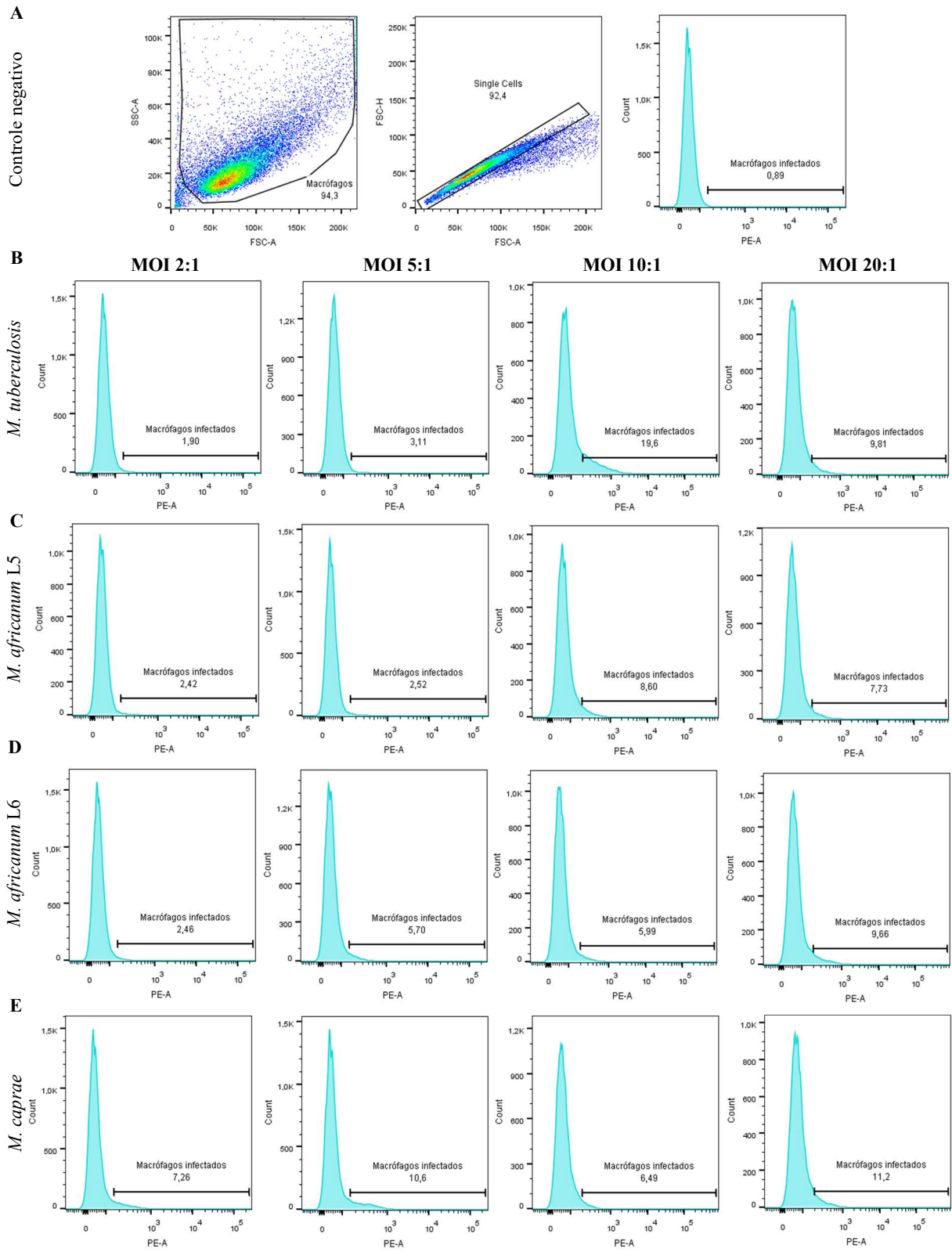


Figura S3. Estratégias de *gating* para avaliação da taxa de infecção (i.e. percentual de macrófagos infectados com bactérias-dsRed2) dos macrófagos THP-1 inoculados com o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. MOI: multiplicidade de infecção. (A) Controle negativo: Utilizamos o controle negativo (i.e. células não infectadas) para demarcar a população de macrófagos. Em seguida, separamos as células únicas e determinamos a população de macrófagos infectados (positivos para fluorescência PE-A). (B-G) macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 em MOIs de 2:1, 5:1, 10:1 e 20:1). (B) *Mycobacterium tuberculosis*; (C) *Mycobacterium africanum* L5; (D) *Mycobacterium africanum* L6; (E) *Mycobacterium caprae*; (F) *Mycobacterium bovis*; (G) *Mycobacterium canettii*.

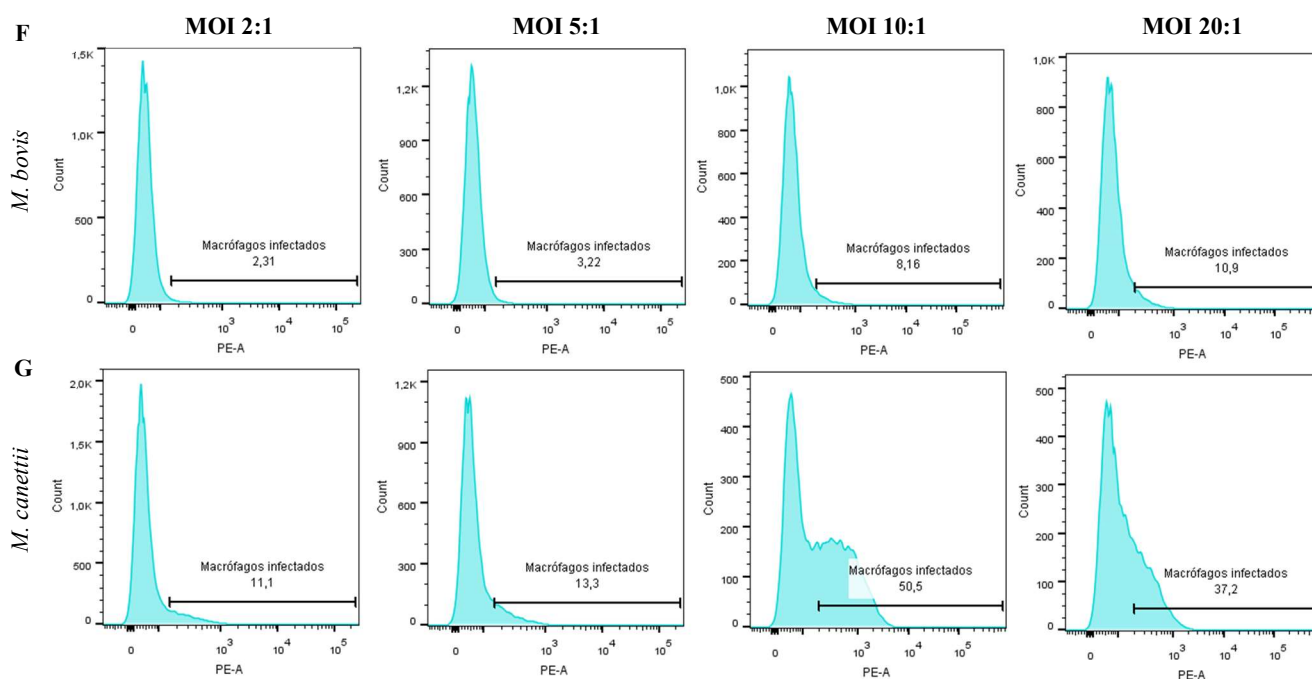


Figura S3. (continuação) Estratégias de *gating* para avaliação da taxa de infecção (i.e. percentual de macrófagos infectados com bactérias-dsRed2) dos macrófagos THP-1 inoculados com o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. MOI: multiplicidade de infecção. (A) Controle negativo: Utilizamos o controle negativo (i.e. células não infectadas) para demarcar a população de macrófagos. Em seguida, separamos as células únicas e determinamos a população de macrófagos infectados (positivos para fluorescência PE-A). (B-G) macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 em MOIs de 2:1, 5:1, 10:1 e 20:1). (B) *Mycobacterium tuberculosis*; (C) *Mycobacterium africanum* L5; (D) *Mycobacterium africanum* L6; (E) *Mycobacterium caprae*; (F) *Mycobacterium bovis*; (G) *Mycobacterium canettii*.

9.4. FIGURA SUPLEMENTAR 4

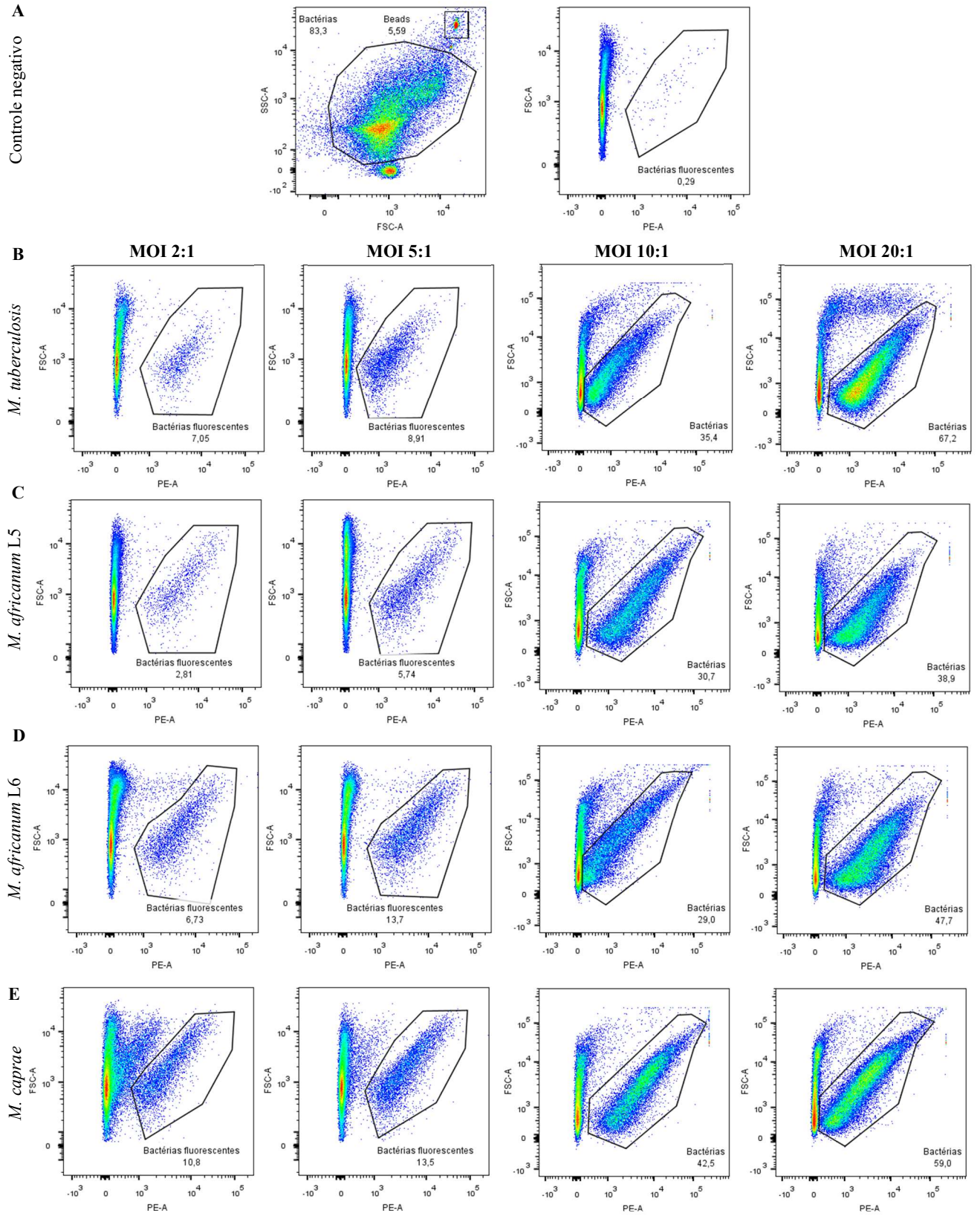


Figura S4. Estratégias de *gating* para avaliação dos índices de fagocitose (i.e. percentual de bactérias que internalizaram) dos macrófagos THP-1 inoculados com o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. MOI: multiplicidade de infecção. (A) Controle negativo: Utilizamos o controle negativo (i.e. células não infectadas lisadas) para demarcar a população de eventos adquiridos. Em seguida, determinamos a população de bactérias internalizadas (positivos para fluorescência PE-A). (B-G) macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 em MOIs de 2:1, 5:1, 10:1 e 20:1). (B) *Mycobacterium tuberculosis*; (C) *Mycobacterium africanum* L5; (D) *Mycobacterium. africanum* L6; (E) *Mycobacterium caprae*; (F) *Mycobacterium bovis*; (G) *Mycobacterium canettii*.

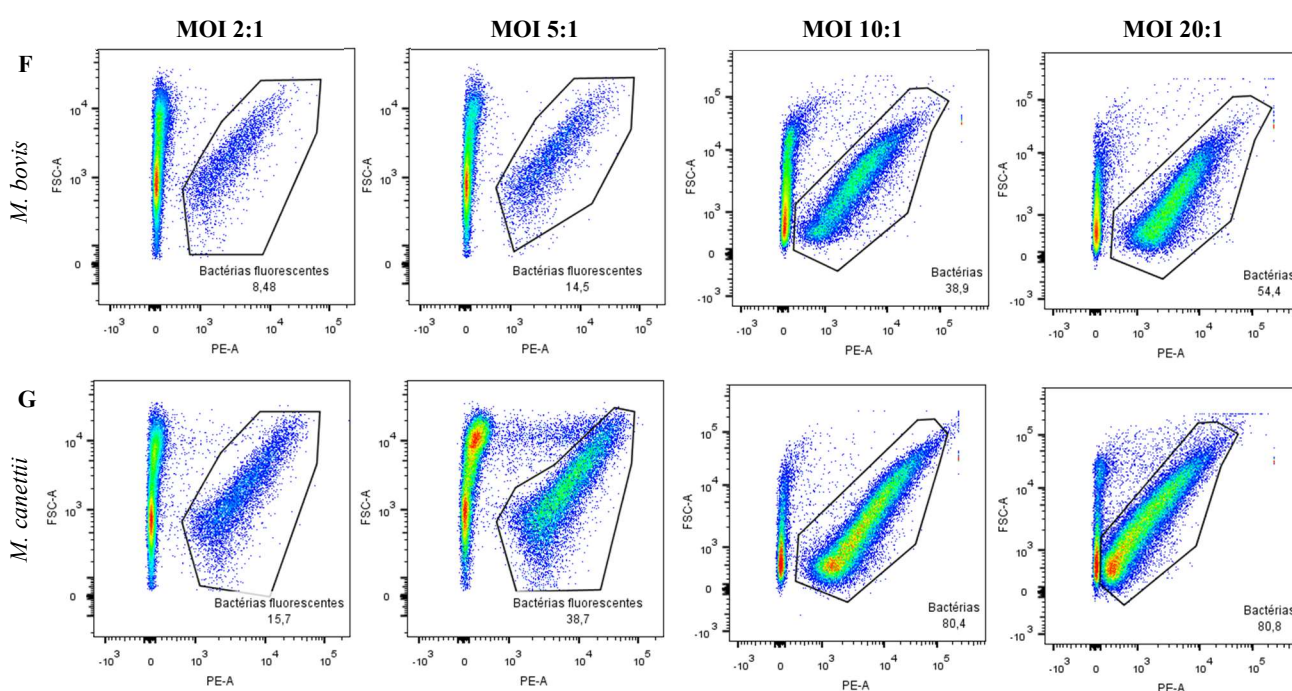


Figura S4. (continuação) Estratégias de *gating* para avaliação dos índices de fagocitose (i.e. percentual de bactérias que internalizaram) dos macrófagos THP-1 inoculados com o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii*. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. MOI: multiplicidade de infecção. (A) Controle negativo: Utilizamos o controle negativo (i.e. células não infectadas lisadas) para demarcar a população de eventos adquiridos. Em seguida, determinamos a população de bactérias internalizadas (positivos para fluorescência PE-A). (B-G) macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 em MOIs de 2:1, 5:1, 10:1 e 20:1). (B) *Mycobacterium tuberculosis*; (C) *Mycobacterium africanum* L5; (D) *Mycobacterium. africanum* L6; (E) *Mycobacterium caprae*; (F) *Mycobacterium bovis*; (G) *Mycobacterium canettii*.

9.5. FIGURA SUPLEMENTAR 5

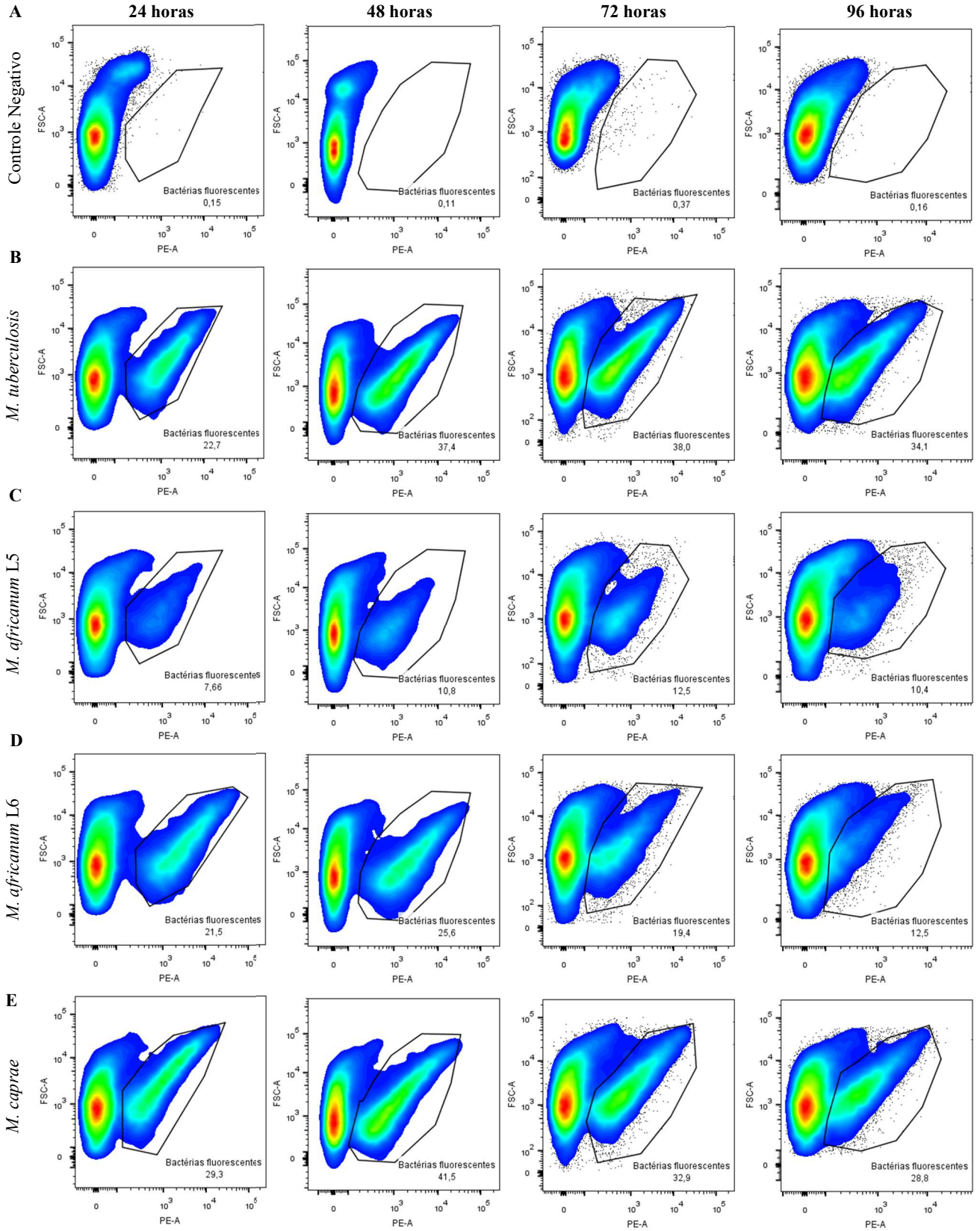


Figura S5. Estratégias de *gating* para quantificação da replicação bacteriana nos macrófagos THP-1 infectados com as espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* ao longo de 96 horas. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. **(A)** Controle negativo: Utilizamos o controle negativo (i.e. células não infectadas lisadas) para demarcar a população de eventos adquiridos. Em seguida, determinamos a população de bactérias internalizadas (positivos para fluorescência PE-A). **(B-G)** macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 acompanhados em 24h, 48h, 72h e 96h pós infecção. **(B)** *Mycobacterium tuberculosis*; **(C)** *Mycobacterium africanum* L5; **(D)** *Mycobacterium. africanum* L6; **(E)** *Mycobacterium caprae*; **(F)** *Mycobacterium bovis*; **(G)** *Mycobacterium canettii*.

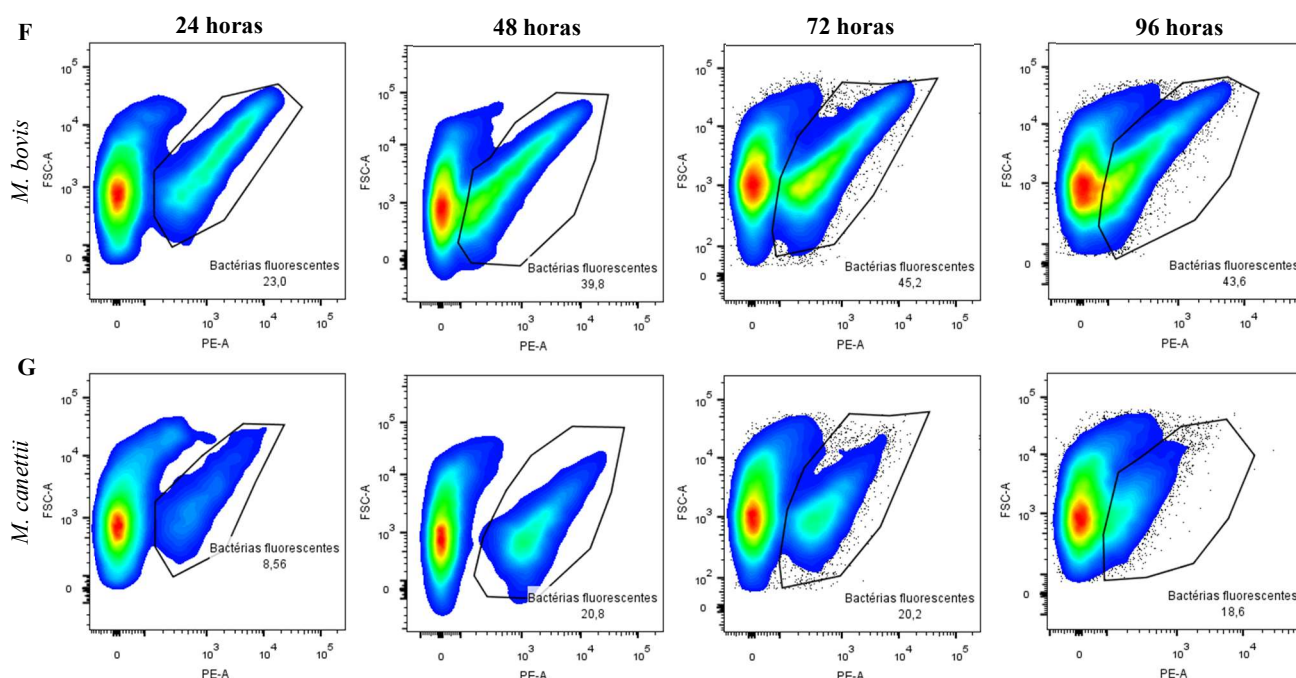


Figura S5. (continuação) Estratégias de *gating* para quantificação da replicação bacteriana nos macrófagos THP-1 infectados com as espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* ao longo de 96 horas. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. **(A)** Controle negativo: Utilizamos o controle negativo (i.e. células não infectadas lisadas) para demarcar a população de eventos adquiridos. Em seguida, determinamos a população de bactérias internalizadas (positivos para fluorescência PE-A). **(B-G)** macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 acompanhados em 24h, 48h, 72h e 96h pós infecção. **(B)** *Mycobacterium tuberculosis*; **(C)** *Mycobacterium africanum* L5; **(D)** *Mycobacterium. africanum* L6; **(E)** *Mycobacterium caprae*; **(F)** *Mycobacterium bovis*; **(G)** *Mycobacterium canettii*.

9.6. FIGURA SUPLEMENTAR 6

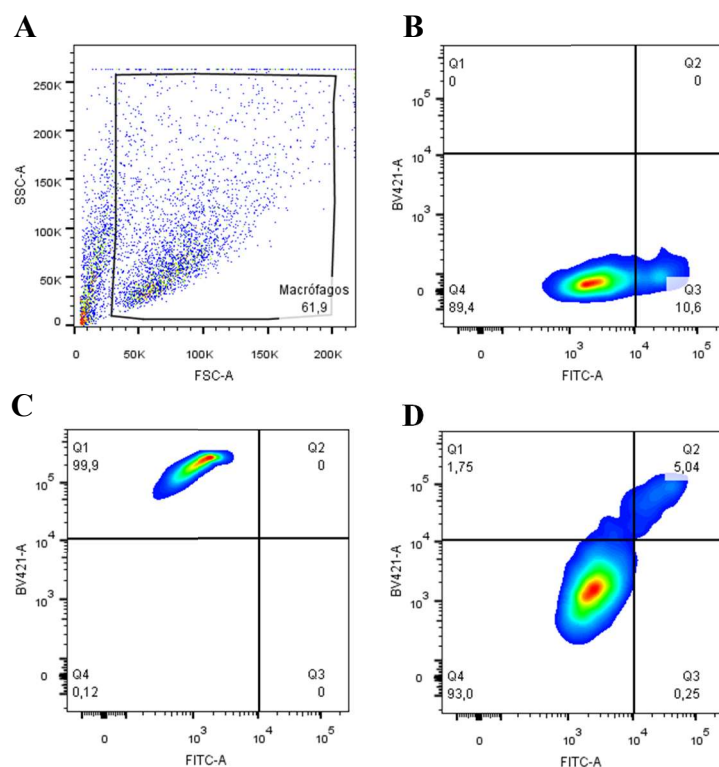


Figura S6. Estratégias de *gating* para avaliação da morte celular por citometria de fluxo. (A) *Gating* da população de macrófagos THP-1. (B) *Gating* da população de macrófagos positivos para caspase 3 e 7. (C) *Gating* da população de macrófagos positivos para Live/Dead (população morta somente). (D) *Gating* final de avaliação da apoptose e da necrose em células sem tratamento.

9.7. FIGURA SUPLEMENTAR 7

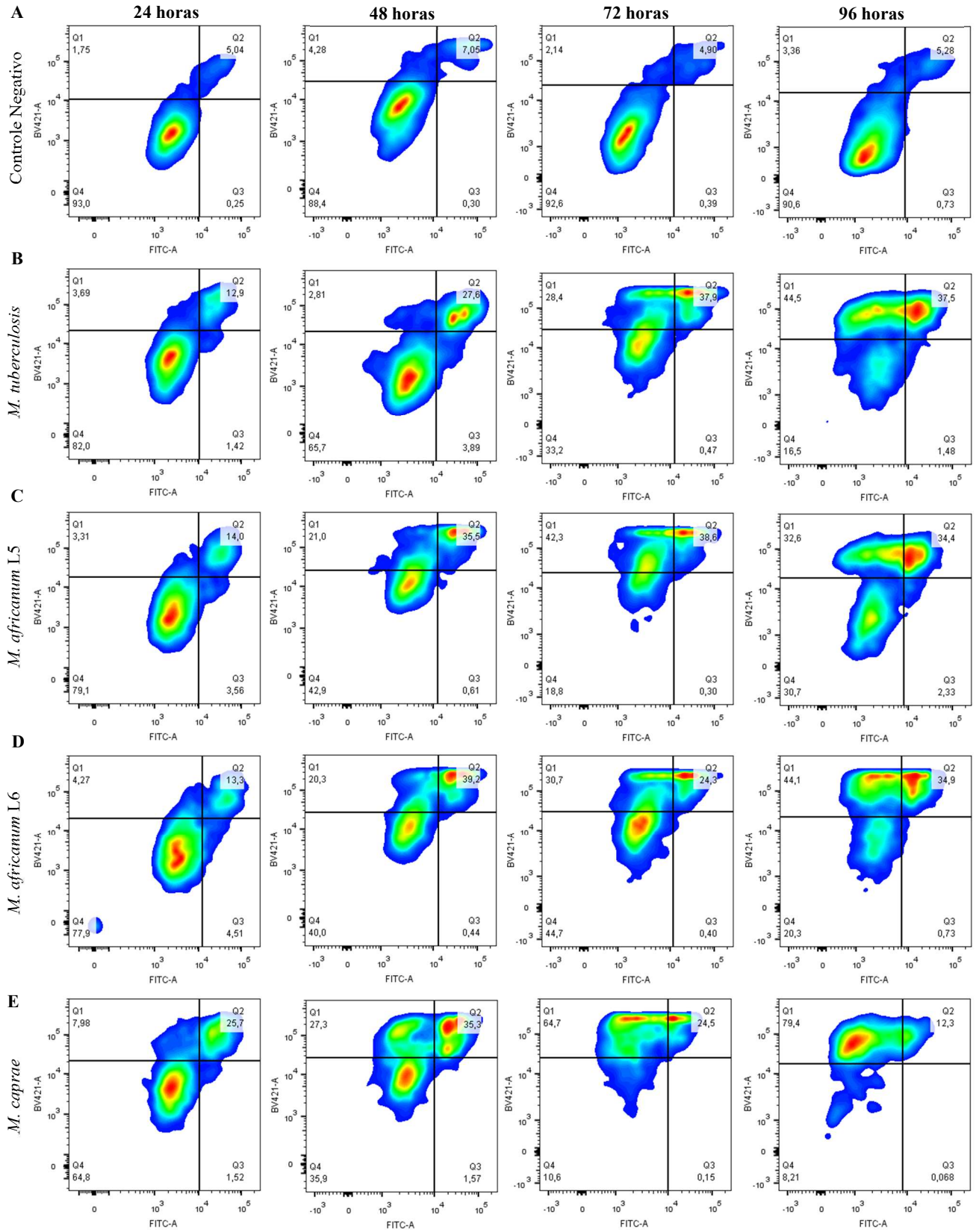


Figura S7. Estratégias de *gating* para avaliação da necrose e apoptose dos macrófagos THP-1 infectados com as espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* ao longo de 96 horas. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. (A-G) macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 acompanhados em 24h, 48h, 72h e 96h (A) Controle negativo: Células não infectadas. (B) *Mycobacterium tuberculosis*; (C) *Mycobacterium africanum* L5; (D) *Mycobacterium. africanum* L6; (E) *Mycobacterium caprae*; (F) *Mycobacterium bovis*; (G) *Mycobacterium canettii*. Células positivas para BV421-A: Live/Dead (necrose). Células positivas para FITC: caspase3/7 positivas (apoptose).

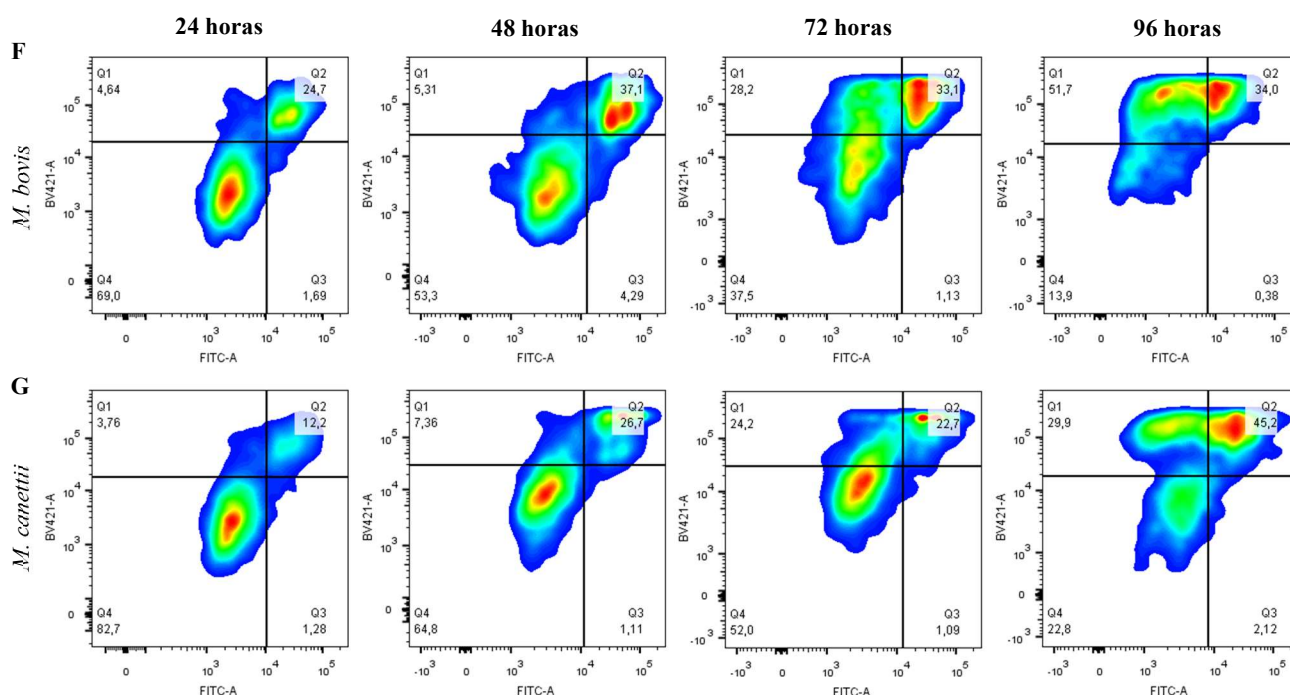


Figura S7. (Continuação) Estratégias de *gating* para avaliação da necrose e apoptose dos macrófagos THP-1 infectados com as espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium canettii* ao longo de 96 horas. Micobactérias estavam transformadas com pMSP12::dsRed2. (A-G) macrófagos infectados com as bactérias-dsRed2 acompanhados em 24h, 48h, 72h e 96h (A) Controle negativo: Células não infectadas. (B) *Mycobacterium tuberculosis*; (C) *Mycobacterium africanum* L5; (D) *Mycobacterium. africanum* L6; (E) *Mycobacterium caprae*; (F) *Mycobacterium bovis*; (G) *Mycobacterium canettii*. Células positivas para BV421-A: Live/Dead (necrose). Células positivas para FITC: caspase3/7 positivas (apoptose).