**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

# Identificação de um novo conjunto de biomarcadores para predição do curso da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*

Felipe Teixeira Lima

Ribeirão Preto

2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

# Identificação de um novo conjunto de biomarcadores para predição do curso da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

**Orientado(a):** Felipe Teixeira Lima

**Orientador(a):** Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 20/09/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

| | | | |
|---|---|---|---|
| LIMA<br>FELIPE, T. | **Identificação de um novo conjunto de biomarcadores para predição do curso da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*** | | DOUTORADO<br>FCFRPUSP<br>2021 |

# FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lima, Felipe Teixeira

Identificação de um novo conjunto de biomarcadores para predição do curso da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, 2021.141 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.
Orientador: Frantz, Fabiani Gai.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. RNA-seq. 3. Epigenética.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Teixeira Lima

Identificação de um novo conjunto de biomarcadores para predição do curso da infecção pelo Mycobacterium tuberculosis

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador(a): Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr_____

Instituição:_____Assinatura:_____

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Silvano e Adeilda, e irmãs Camila e Karina, que sempre me incentivaram na busca pelo conhecimento tornando-se a minha base nessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS....

A quem devo tudo que sou, o que tenho e a força para percorrer o caminho em busca dos objetivos, obrigado;

A minha família....

A gratidão é um dos atos nobres do homem, e eu sou infinitamente grato a Deus pela família que tenho....

Ao meu pai, Silvano Teixeira Lima, pai imensamente orgulhoso e um exemplo de dedicação aos filhos, dedicação essa que por muitas vezes foi demonstrada, momentos antes da partida de um longo período de ausência, através da frase…"Filhos, eu não trabalho para mim, mas, sim para vocês, para que vocês tenham uma vida melhor do que a eu tive", obrigado.

A minha mãe, Adeilda Martins Lima, na terra, o maior exemplo de amor e carinho que eu já vi. Agradeço a cada benção diária antes de eu ir para o laboratório. Mãe de verdade como ela costuma de dizer a cada justificativa pelo cuidado e zelo aos filhos. Agradeço por cada afago nas madrugadas de estudo onde dizia que se sentia mal por não poder ajudar, mas na verdade mãe, a senhora estava fazendo o mais importante.

Á Camila e Karina Teixeira Lima, minhas irmãs, partes fundamentais da minha vida, e que tenho um amor infinito. Talvez vocês não tenham ideia, mas o sentimento de união, carinho e cuidado entre nós me ajudou muito ao longo dessa jornada. Estamos prestes a dar mais um passo à frente... juntos!;

Á Professora Doutora Fabiani Gai Frantz...

Minha orientadora e, com certeza, a profissional mais incrível com quem já trabalhei até hoje, é impressionante o fato de ela simplesmente saber tudo sobre tudo! Ao longo desses anos não teve uma única vez em que eu fizesse uma

pergunta e que ela respondesse “não sei”. Além disso, admiro a sua habilidade em manusear um grupo de pesquisa, e para mim a maior marca desse manuseio é fato da senhora ter acima de tudo a união entre os integrantes. E mesmo sendo um grupo tão heterogêneo, não só pelos diferentes projetos e assuntos abordados por cada aluno, por se tratar de pessoas diferentes você entende e sabe como lidar com cada um, sabendo extrair o melhor de cada aluno através da maneira mais adequada de ensinar, cobrar, corrigir, conversar, resumidamente a senhora é uma verdadeira orientadora. Por isso, levo um pouquinho da senhora comigo aonde quer que eu esteja, pois se um dia eu chegar a um lugar semelhante ao seu, quero ter de agir de maneira parecida. Diante disso, saiba que a senhora faz parte da conquista de cada aluno seu.

Aproveito a oportunidade de agradecer também ao Doutor Rogério Silva Rosada, parte essencial desse projeto e pelas conversas e dicas sobre como melhor conduzi-lo. Aaahh, agradeço a ambos por todos os churrascos feitos na casa de vocês, foram momentos que também entraram para história do grupo.

Ao Professor Luiz Gustavo Araújo Gardinassi...

Fundamental no desenvolvimento desse projeto, onde literalmente me ensinou sobre bioinformática. Passamos meses buscando a melhor maneira de aproveitar os dados e a cada reunião eu via o entusiasmo em ajudar a criar, acredito que também por esse motivo você hoje ocupe um cargo que corresponde a esse seu dom, obrigado meu amigo.

Ao Lime...

Á Caroline Fontanari, ou Carols, profissional exemplar além de uma pessoa incrível, não só pelo fato de ser são paulina e curtir um bom rock, mas também por todo o suporte que nos dá, seja pela amizade através de uma conversa, um conselho, um cálculo complexo de química, uma indicação de cerveja, aviso sobre um grande show de rock até ajuda diária com experimentos, obrigado;

Ao Ricardo e Fabiana, os primeiros a me receberem no grupo e acolherem de maneira tão afetuosa, saibam que me senti bem desde o primeiro dia por conta dos seus atos, obrigado;

Ao Patrick, a quem, pelo fato de trabalharmos com assuntos semelhantes, compartilhei horas e horas desenvolvendo experimentos, saiba que aprendi muito com você em cada um deles, obrigado;

Ao Humberto, Fabricia e Matias, apesar de serem recentes no grupo, saibam que já me ajudaram muito, seja por debates que agregam em nossas reuniões até a ajuda em diluir um primer ou escrever em tubos, obrigado;

Aos “parrsas”....

Ricardo Castro, Marcela Roverato, Luana Macedo e Jefferson Elias, saibam que vocês ajudaram a tornar essa jornada bem mais divertida e sorridente, levarei comigo cada encontro, desde os simples com pizza e cerveja até as grandes festas nos carnavais. Cada um de vocês tem um jeito único que faz com que as pessoas ao seu redor se sintam bem, obrigado;

A USP....

Tenho a honra de ser aluno da maior e melhor universidade do país e com certeza uma entre as melhores do mundo. A todos os professores, saibam que me ajudaram em cada uma das suas aulas em cada uma das suas explicações, vocês fazem jus ao título que a USP tem no mundo. A todos os funcionários, em especial a Wendy Martins Rios, Izaíra Tincani Brandão e Ana Flávia Gembre muito obrigado por toda a ajuda em cada entrada na P3. Quero incluir também o motorista do ônibus corintiano que depois que soube que eu sou são paulino todos os dias conversávamos sobre futebol a caminho do bandeijão. Um agradecimento a todos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em especial ao Henrique Theodoro e principalmente a Ana Lúcia Turatti, pessoa incrível, que tem um carinho gigante para com todos os alunos e tenho certeza que isso é recíproco por parte de todos, obrigado;

Ao Centro de Pesquisas René Rachou / Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brasil....

E a todos os envolvidos na parte técnica do desenvolvimento do RNAseq, elemento base do meu projeto, logo, a Fabiano Sviatopolk-Mirsky, obrigado;

As agências de fomento...

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

Á Fapesp, agência de fomento referência em ciência no país e no mundo, objetivo de grande parte dos pesquisadores no país, agradeço por todo o apoio e oportunidade que me foi concedido ao longo do desenvolvimento do meu trabalho, obrigado. Número do processo da bolsa de doutorado: 2018/14968-0.

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.

Albert Einstein.

# RESUMO

LIMA, F. T. **Identificação de um novo conjunto de biomarcadores para predição do curso da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis***. 2021. 141f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O desenvolvimento de alternativas para conter a tuberculose (TB) aliado à necessidade de ampla compreensão de mecanismos de ação da resposta imune à infecção impulsionam a investigação de novas vias intracelulares, as quais poderiam estar associadas com novos biomarcadores de prognóstico da doença. Estudos mostram que dentre os possíveis órgãos afetados na infecção experimental em camundongos, com *Mtb* (*Mtb*), o fígado apresenta uma resposta eficiente contra a infecção quando comparado ao pulmão e baço. Nossa hipótese é que no fígado, mecanismos efetores da resposta imune são eficazes para o controle da infecção e poderiam não ser ativados nos órgãos onde o bacilo subverte à resposta efetora. Nosso objetivo foi analisar *in silico* dados já obtidos do transcriptoma em busca de genes e enzimas epigenéticas diferencialmente expressas em células totais do fígado e do pulmão de camundongos com TB experimental, que estivessem associados à regulação da resposta imune em ambos os órgãos, de forma a permitir a disseminação do bacilo no pulmão, enquanto promovem o seu controle no fígado. Na análise *in silico*, foram identificados 7 genes, *Creb3l1, Trim17, Myo7b, Cyyr1, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* como diferencialmente expressos e relacionados ao controle ou suscetibilidade. O objetivo seguinte foi validar *in vitro* os alvos identificados, através da infecção de monócitos humanos com *Mtb*, para que novos biomarcadores sejam propostos. Por meio da utilização de RNA de interferência, observamos que o perfil transcricional pôde ser revertido, o que induziu inibição nas funções efetoras de monócitos. Demonstramos que a expressão de *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b* e *Hdac9*, e a repressão de *Cbs, Krt23* e *Cyp3A43*, induz produção de citocinas como IFN-γ, IL-2 e CCL5/Rantes, e como consequência a indução da apoptose e resistência à infecção. Entretanto, quando há redução na expressão dos genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b* com concomitante aumento da expressão de *Cbs, Krt23 e Cyp3A43*, há maior produção de IL-4 e morte celular por necrose, o que resulta na persistência da micobactéria e consequente

perfil de suscetibilidade. A expressão destes genes está sobre controle epigenético, podendo ser modulado *in vitro* por meio do tratamento com epidrogas. Assim, concluímos que o conjunto de genes aqui identificados pode integrar uma bioassinatura de predição do curso da infecção, e a modulação diferencial destes 7 genes pode favorecer um cenário de resistência ou suscetibilidade na tuberculose humana.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis,* RNAseq, epigenética, transcriptoma, biomarcadores, resistência, susceptibilidade.

## ABSTRACT

LIMA, F. T. Identification of a novel combination of biomarkers for predicting *Mtb* infection course. 2021. 141f. Thesis (Doctorate). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The development of alternatives to curb tuberculosis (TB), combined with the need for a broad understanding of the mechanisms of action of the immune response to the infection promotes the investigation of new intracellular pathways, which could be associated with potential prognostic biomarkers of the disease. Studies show that infection in experimental mice with *Mtb* (*Mtb*), among the possible organs affected, the liver presents an efficient response against infection when compared to the lung and spleen. Our hypothesis is that in the liver, some effector mechanism of the immune response is effective in eliminating the bacillus and consequently controls the disease, while it could not be activated in organs where the bacillus subverts the effector response. Our aim was to analyze in silico data already obtained from the transcriptome in search of genes and epigenetic enzymes differentially expressed in total liver and lung cells of mice experimentally infected with *Mtb*, which were associated with the regulation of the immune response in both organs, in order to allow the spread of the bacillus in the lung, while promoting its control in the liver. In the *in silico* analysis, 7 genes, *Creb3l1, Trim17, Myo7b, Cyyr1, Cbs, Krt23* and *Cyp3a43* were identified as differentially expressed and related to control or susceptibility. The next aim was to validate the identified targets were validated *in vitro* by infecting human monocytes with *Mtb*, to identify potential biomarkers. Through the knockdown of selected mRNA by RNA interference, we observed that the transcriptional profile could be reversed, which induced inhibition of the effector functions of monocytes. We demonstrate that the the expression of *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b* and *Hdac9* and repression of *Cbs, Krt23* and *Cyp3A43*, induces the production of cytokines such as IFN-γ, IL-2 and CCL5/Rantes, and as a consequence the induction of apoptosis and resistance to infection. However, when there is a reduction in the expression of genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b* with a concomitant increase in the expression of *Cbs, Krt23* and *Cyp3A43,* there is

greater production of IL-4 and cell death by necrosis, which results in the persistence of mycobacteria and consequent profile of susceptibility profile. The expression of these genes are under epigenetic control and can be modulated in vitro through treatment with epidrugs. Thus, we conclude that the set of genes identified here can integrate a biosignature to predict the course of infection in tuberculosis, and the differential modulation of these 7 genes can favor can favor a scenario of resistance or susceptibility in human tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, RNAseq, transcriptome, epigenetics, biomarkers, resistance, susceptibility.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de infecção comparando CFU de diferentes órgãos..... **15**

Figura 2. Organização esquemática do delineamento experimental..... **19**

Figura 3. Análise de dados transcriptômicos de células totais hepáticas e pulmonares de camundongos infectados com Mycobacterium tuberculosis..... **34**

Figura 4. Assinatura transcricional durante a infecção por *Mtb.* (Pulmão)..... **36**

Figura 5. Assinatura transcricional durante a infecção por *Mtb*. (Fígado)..... **39**

Figura 6. Comparação entre a assinatura transcricional do fígado e o pulmão (19d / 14d)..... **43**

Figura 7. Metanálise..... **66**

Figura 8. Perfil transcricional dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* em monócitos humanos infectados com Mycobaterium tuberculosis..... **55**

Figura 9. Perfil transcricional dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* em monócitos humanos infectados com *Mycobaterium tuberculosis* ou *Mycobacterium bovis* (BCG - Bacilo de Calmette-Guérin) ou *Mtb* H37Ra ou *Mycobacterium fortuitum* ou *Mycobacterium smegmatis* ou *Mycobacterium avium*..... **62**

Figura 10. Avaliação da atividade microbicida de monócitos humanos infectados com H37Rv, após knockdown utilizando siRNA para os genes

*Creb3l1, Cyyr1, Myo7b e Trim17*..... **65**

Figura 11. Avaliação da atividade microbicida de monócitos humanos infectados com H37Rv, após tratamento utilizando os seguintes compostos químicos: Azacitidina, Dexametasona e Triancinolona para indução dos genes *Krt23, CyP3a43 e Cbs* respectivamente..... **67**

Figura 12. Avaliação da indução de apoptose e necrose em monócitos humanos infectados com H37Rv, após knockdown utilizando siRNA para os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b e Trim17*. ..... **70**

Figura 13. Quantificação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura monócitos knockdown para os genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1 e Myo7b* frente a infecção por *Mtb*. ..... **75**

Figura 14. Quantificação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura monócitos tratados com triancinolona ou dexametasona frente a infecção por *Mtb*.. ..... **78**

Figura 15. Perfil transcricional de enzimas epigenéticas e dos genes em monócitos humanos infectados com *Mycobaterium tuberculosis* ou tratados com epidrogas.. ..... **82**

Figura 16. Avaliação da atividade fagocítica de monócitos humanos infectados com H37Rv, após tratamento com epidrogas... ..... **84**

Figura 17. Avaliação da atividade microbicida de monócitos humanos infectados com H37Rv, após tratamento com epidrogas.... ..... **87**

Figura 18. A fagocitose da *Mtb* pode induzir a expressão de um

conjunto de genes no monócito que favorecem a resistência ou a suscetibilidade à infecção. ..... **90**

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| ATP1/2 | Secretion ATPase1/2, secreted secA1/2 protein |
| Cbs | Cystathionine beta-synthase |
| cDNA | Complementary DNA (DNA complementar) |
| CFP-10 | Culture filtrate protein 10 |
| CFU | Colony forming unit (Unidade formadora de colônias) |
| CLRs | C-type lectin receptors (Receptores de lectina tipo C) |
| Creb3l1 | cAMP responsive element binding protein 3 like 1 |
| COVID-19 | Coronavirus Disease 2019 |
| CPM | Counts-per-million (Contagens por milhão) |
| Cyp3a43 | Cytochrome P3A |
| Cyyr1 | Cysteine and tyrosine-rich protein 1 |
| DEGs | Differential Gene Expression (Expressão Gênica Diferencial) |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico) |
| DNMT | DNA methyltransferases (Metiltransferases de DNA) |
| ESAT-6 | Early secretory antigen target 6 |
| FAPESP | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| GEO | Gene Expression Onmibus |
| Hdac | Histone deacetylase (Histona desacetilase) |
| HDM | Histone demethylase (Histona demetilase) |
| Hrs | Horas |
| H37Rv | *Mtb* subsp. *tuberculosis* (ATCC® 27294™) |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana) |

| | |
|---|---|
| HMT | Histone methyltransferase (Hitona metiltransferases) |
| IL-1α | Interleucina 1 alfa |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| IL-6 | Intrleucina 6 |
| IL-8 | Intrleucina 8 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| Krt23 | Keratin23 |
| MMPs | Matrix Metalloproteinases (Metaloproteínase matriz) |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| MOI | Multiplicity of infection (Multiplicidade de infecção) |
| *Mtb* | *Mycobacterium tuberculosis* |
| MTBC | *Mtb* complex (complexo *Mycobacterium tuberculosis*) |
| nM | Nanomolar |
| NLRs | NOD-like receptors (receptores do tipo NOD) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells (célula mononuclear do sangue periférico) |
| PCA | Principal Component Analysis (Análise do componente principal) |
| PknG | Proteina kinase G |
| RFU | Relative fluorescence units (Unidades de fluorescência relativa) |
| RNA | Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico) |
| RNAseq | RNA sequencing (Sequenciamento de RNA) |
| TB | Tuberculose |

| | |
|---|---|
| TBEP | Tuberculose extrapulmonar |
| TbL | Paciente com diagnóstico de tuberculose latente |
| TbP | Paciente com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa |
| THP1 | THP-1 (ATCC TIB-202). Linhagem celular imortalizada. |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor -. Alpha |
| Trim17 | Tripartite Motif Containing 17 |
| TLR | Toll-like receptors |

## Sumário

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 1

1.1 Tuberculose ..... 1

1.2 Tuberculose no Brasil ..... 3

1.3 Complexo Mtb(MTBC) ..... 5

1.3 Imunologia da tuberculose ..... 7

1.4 Tuberculose extrapulmonar (TBEP) ..... 12

1.5 O fígado como órgão linfoide ..... 13

1.6 Epigenética ..... 16

2. OBJETIVO ..... 19

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ..... 19

4. MATERIAL E MÉTODOS ..... 20

4.1 Processamento e análise diferencial da expressão gênica ..... 20

4.2 Análise de Pathways ..... 21

4.3 Metanálise de dados públicos ..... 22

4.4 Análise estatística ..... 23

4.5 Obtenção de monócitos ..... 23

4.6 Obtenção de cepas de micobactérias ..... 24

4.7 Estimulação de monócitos com cepas de micobactéria ..... 25

4.8 Inibição enzimática por epidrogas ..... 25

4.9 Avaliação da atividade microbicida ..... 26

4.10 Extração de RNA total ..... 26

4.11 Síntese de cDNA ..... 27

4.12 PCR em tempo real (RT-qPCR) ..... 27

4.13 Lista de Primers ..... 28

4.14 Avaliação da expressão gênica ..... 31

4.15 Detecção de citocinas ..... 31

4.16 siRNA knockdown ..... 31

4.17 Avaliação de apoptose e necrose ..... 32

5. RESULTADOS (parte 1) ..... 34

5.1 A abundância de transcritos em células totais de órgãos infectados com *Mtb* demonstra diferentes tipos de resposta à infecção ..... 34

5.2 Meta-assinatura de diferentes órgãos de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* ..... 36

5.3 A comparação entre as meta-assinaturas de órgãos de animais infectados revela vias alteradas que podem auxiliar na explicação da melhor eficiência hepática na infecção por Mtb ..... 41

5.4 A metanálise revela genes diferencialmente expressos relacionados com a resistência ao desenvolvimento da tuberculose ..... 43

6. DISCUSSÃO (parte 1) ..... 45

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO (parte 2) ..... 54

7.1 A infecção por Mtb modula a expressão dos genes Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43 em monócitos humanos ..... 54

7.2 Os genes Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43 estão envolvidos no controle de infecções por diferentes cepas de micobactérias ..... 61

7.3 Os genes Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43 estão envolvidos em funções efetoras no controle da infecção por Mtb ..... 63

7.4 A expressão dos genes Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17 está envolvida na indução de apoptose de monócitos infectados com Mtb ..... 71

7.5 A modulação dos genes Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs e Cyp3a43 interfere na produção de citocinas produzidas na infecção por Mtb ..... 75

7.6 Os genes Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43 atuam no controle da infecção por Mtb através de modulação epigenética..... 82

8. CONCLUSÃO..... 92

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 94

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## *1.1* Tuberculose

Até o ano de 2019, a tuberculose (TB) era a principal causa de morte por infecção endêmica do mundo. Em 2019, foram 1,4 milhões de pessoas levadas a óbito devido à doença, além de ter sido a principal causa de morte entre pacientes com HIV (WHO, 2020). Os altos números relacionados a mortes por tuberculose são em sua totalidade devido à forma ativa da doença. A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* pode levar a 3 desfechos clínicos: após o contato com o bacilo, 5% dos infectados não consegue desenvolver uma resposta imune eficiente em contê-lo e desenvolve a tuberculose primária. Outros 5% dos indivíduos desenvolvem a tuberculose pós-primária ou secundária, pois conseguem conter o bacilo na fase inicial da infecção, mas sofrem uma reativação endógena dos bacilos que resistiram ao sistema imune ou porque são expostos à nova fonte de infecção.

Cerca de 90% dos infectados, no entanto, tem uma resposta imune eficaz contra o bacilo e desenvolvem a tuberculose latente. Pacientes infectados pela forma latente, podem ser potenciais sintomáticos e transmissores se a doença for reativada ou até mesmo manterem-se assintomáticos e não diagnosticados por toda a vida (COLANGELI et al., 2020). De maneira preocupante, estima-se que 1/3 da população mundial está infectada com a forma latente da TB, tornando-a junto com AIDS e malária, doenças endêmicas mundiais (WHO, 2020). Com o surgimento da pandemia da COVID-19, causada pela infecção pelo novo Coronavírus em 2019, a TB deixou de ser a infecção mais prevalente no mundo, no entanto, a relação entre essas duas doenças tem sido relatada na literatura e, apesar dos poucos dados, existem motivos que justifiquem estudos sobre a relação entre ambas, uma vez que a mesma pode resultar em consequências drásticas (YANG; LU, ; CRISAN-DABIJA et al., 2020).

Existem alguns fatores de risco envolvidos na reativação da bactéria até então em estado latente, como principalmente a infecção pelo HIV, mas também ter o sistema imune comprometido, ser fumante, ter diabetes ou falha renal crônica, entre outros (LODDENKEMPER; LIPMAN; ZUMLA, 2016). A reativação do patógeno culmina naquilo que clinicamente é caracterizado como tuberculose ativa, que induz no paciente alguns sintomas clássicos, dentre eles, tosse crônica, produção de expectoração, as vezes com presença de sangue, falta de apetite e consequente perda de peso, febre em alguns casos, sudorese noturna e hemoptise (LODDENKEMPER; LIPMAN; ZUMLA, 2016).

O diagnóstico é realizado associando-se a clínica aos exames laboratoriais e raio X de tórax. O diagnóstico da tuberculose e o consequente início do tratamento estão diretamente ligados à prevalência e também probabilidade de transmissão (CHENG et al., 2013; HARRIS; SULLIVAN MEISSNER; PROOPS, 2013). Os métodos convencionais de diagnósticos de tuberculose ativa são baseados em técnicas de esfregaço e cultura de escarro, um processo que pode levar semanas, necessita de técnicos especializadas e ainda assim é pouco sensível. A prova tuberculínica ou TST (Tuberculin skin test) também é utilizada em algumas situações, inclusive na pesquisa de TB latente, e se baseia num teste de hipersensibilidade tardia cutânea, no qual um derivado concentrado de proteínas derivadas de cultura de 7 cepas *Mtb* é injetado por via intradérmica e a sensibilidade é observada entre 48 e 72 horas.

O IGRA (Interferon-gamma Release Assay) é um teste que mensura a citocina INF-γ produzida por leucócitos do paciente quando colocados em contato com um concentrado de peptídeos exclusivos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A citocina é avaliada por ELISA no sobrenadante das células cultivadas na presença do antígeno-específico, e por isso esse método é considerado mais sensível que o TST, os resultados são quantitativos e objetivos e não dependem da interpretação do técnico. O resultado também não é afetado pela vacinação com BCG ou infecção por micobactérias ambientais.

Ainda há o GeneXpert MTB/RIF que é, até o momento, o único teste molecular indicado pela OMS para diagnóstico rápido da TB. Este teste tem a sua eficácia baseada na capacidade de detectar a presença de *Mtb* e

simultaneamente avaliar a resistência à rifampicina, principal fármaco utilizado no tratamento da tuberculose (MECHAL et al., 2019). De maneira a complementar os testes laboratoriais, a radiografia do tórax é usada para confirmação do diagnóstico, é fundamental na identificação da TB em sua fase aguda e também na forma latente dessa doença o que torna esse método mais sensível, porém menos especifico, pois pode não identificar casos de tuberculose extrapulmonar (SUDHA, 2016).

Apesar das diferentes formas de diagnóstico da tuberculose, deve-se dar atenção à transmissibilidade dessa doença, pois assim como CHURCHYARD et al., 2017 relatou em seu trabalho, há uma espécie de cascata de eventos que tornam possível a transmissão da TB. Os principais pontos nessa cascata têm por início um caso fonte de tuberculose, ao expelir aerossol pela fala, tosse ou espirro, são geradas partículas contendo o bacilo que sobrevivem no ar por até uma hora e, ao serem inaladas por um indivíduo suscetível, consequentemente pode infectá-lo e causar a tuberculose (CHURCHYARD et al., 2017; ID et al., 2021).

Há aspectos que contribuem diretamente para o sucesso da transmissão da tuberculose, dentre eles fatores ambientais, mais precisamente lugares que oferecerem pouca luminosidade, espaço fechado e consequentemente dificuldades de circulação do ar. Razões ligadas ao hospedeiro também estão diretamente ligadas ao desenvolvimento da forma ativa da doença, como má nutrição, fumo, diabetes, consumo excessivo de álcool, co-infecção pelo HIV, entre outros (IBRAHIM; ZAMBRUNI; MELBY, 2017; SILVA et al., 2018; IBRAHIM; MULAT, 2020). Ao associar-se às comorbidades, a tuberculose pode apresentar-se de uma forma bem mais grave da doença, tornando o paciente um potencial transmissor (MATHEMA et al., 2017).

### 1.2 Tuberculose no Brasil

Com o intuito de controlar a disseminação e melhorar os índices de cura da tuberculose, a OMS definiu o tratamento supervisionado ou tratamento diretamente observado (TDO) como a principal estratégia para tal. Essa

estratégia é caracterizada pelos seguintes componentes: compromisso político, tratamento padronizado, detecção de casos por baciloscopia, tratamento diretamente observado (DOTS), fornecimento regular e ininterrupto de medicamentos padronizados e sistema de notificação de casos. Diante disso, e do aumento no orçamento nacional, a TB tem sido citada em instrumentos de convênios entre governo federal, estados e municípios, proporcionando maior destaque à TB, envolvendo aspectos técnicos e políticos (OLIVEIRA et al., 2015).

A tuberculose é uma doença muitas vezes relacionada a questões comportamentais e também sociodemográficas, por isso, países considerados de média renda, como o Brasil são citados como exemplos dessa relação (HARLING; CASTRO, 2014). E estudos como o de REIS-SANTOS et al., 2019, mostram que no Brasil há relação direta entre renda advinda de programas sociais do governo federal e taxas de curas da TB.

Desde 2003 a tuberculose tem sido discutida como uma das principais pautas do Ministério da Saúde do Brasil, uma vez que o país apresenta em média 70.000 casos de tuberculose por ano, o que o caracteriza como um dos principais países relacionados a essa doença no mundo (REIS-SANTOS et al., 2019; BARROS; DONALISIO, 2020). Diversos estados, principalmente São Paulo, já tiveram estudos relacionados a tuberculose realizados relacionando índices econômicos, casos de HIV+ e as taxas de incidência de TB (ZILLE et al., 2019).

HIV é também um dos principais fatores envolvidos no índices de tuberculose extrapulmonar (GOMES et al., 2014). Em relação aos índices de tuberculose extrapulmonar no Brasil aumentaram de 6.8 por 100,000 pessoas em 1981 para 7.0 por 100,000 pessoas em 1991, e um estudo utilizando dados do município de Campinas no estado de São Paulo mostrou que entre 2001 e 2009 houve redução de aproximadamente de 23% em casos de tuberculose pulmonar, mas apenas 5,9% nos casos de tuberculose extrapulmonar (GOMES et al., 2014). Um outro fator envolvido na distribuição da TB no Brasil e no mundo, são as linhagens e diferentes genótipos da espécie do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da TB (VERZA et al., 2020).

### *1.3* Complexo *Mtb*(MTBC)

O complexo *Mtb*(MTBC) é integrado por espécies geneticamente próximas e que causam tuberculose em humanos e animais (FORRELLAD et al., 2013). Constituem o complexo: *Mtb*(*Mtb*) que é o agente etiológico da tuberculose em humanos; *M. bovis, M. pinnipedii e M. caprae* que causam tuberculose em mamíferos domésticos ou selvagens*; M. microti* causadora da tuberculose em ratos e por fim *M. africanum* e *M. canettii* responsáveis pela causa de tuberculose em humanos residentes em regiões específicas do continente africano (DELOGU; SALI; FADDA, 2013; MIGGIANO; RIZZI; FERRARIS, 2020).

As diferenças na patogenicidade causada por cada membro do MTBC são resultantes das mudanças no material genético adquiridas ao longo do processo de evolução de cada espécie (LAMICHHANE; MILIC, 2018). A *Mtb*contém 14 regiões em seu genoma, mais conhecidas como RD1–14, que codificam genes relacionados a sua capacidade de induzir a tuberculose em humanos, mais precisamente genes codificantes de fatores de virulência e antígenos imunogênicos como ESAT-6 e CFP-10 (ETNA et al., 2015).

O *Mycobacterium bovis* atenuado - *bacilo Calmette-Guerin* (BCG) – é, atualmente, a única vacina disponível relacionada à imunização contra a TB (WHITLOW; MUSTAFA; HANIF, 2020). O BCG não possui a RD1-14 e esse fato está ligado à eficácia limitada e variável dessa vacina contra a forma pulmonar da doença. Além disso, não é bem compreendido a eficiência da BCG na proteção de indivíduos infectados pela forma latente (SHERMAN et al., 2004; ETNA et al., 2015). A importância da RD1 fica evidenciada em trabalhos como os de PYM et al., 2002 e SHERMAN et al., 2004 que mostram que a resposta imune é desenvolvida de formas diferentes frente a bactérias que expressam genes inseridos nessa região. Por esse motivo, a cepa de *Mtb(MTB)* identificada como H37Rv é o modelo mais apropriado para mimetizar infecções que causam TB em humanos. Essa cepa laboratorial contém inserido em seu genoma as 14 regiões ligadas a patogenicidade, o que faz da H37Rv um elemento fundamental para estudos voltados à compreensão do desenvolvimento da infecção, pois mimetiza a tuberculose nos aspectos imunológicos, genéticos, bioquímicos e fisiológicos (COLE, 1999; GEORGE SEBASTIAN, V.K CHALLU, 2015).

Apesar dos estudos voltados à compreensão da TB terem sido iniciados há mais de 100 anos, com trabalhos que se destacam como o publicado por R. Koch descrevendo inicialmente o bacilo, (KOCH, 1982), e milhares de outros trabalhos descrevendo aspectos moleculares do bacilo ou do hospedeiro e da fisiopatologia da doença, ainda há questões a serem respondidas acerca da patogênese da *Mtb*. Atualmente, dentre os assuntos mais discutidos está o surgimento e disseminação de cepas resistentes a multidrogas (MDR), caracterizadas pela resistência a pelo menos a isoniazida e rifampicina, dois dos principais medicamentos utilizados no tratamento da TB, e das cepas extensivamente resiste a drogas (XDR), essas caracterizadas por serem resistentes a fluoroquinolona (FQ) e medicamentos de segunda linha como canamicina (KM), amicacina (AM), capreomicina (CM), (PRASANNA; NIRANJAN, 2019).

A antibioticoterapia é feita em esquema complexo, algumas vezes com combinação de medicamentos por 6 meses. Por este motivo, a adesão terapêutica pode ser prejudicada e a interrupção precoce do tratamento de pacientes diagnosticados com tuberculose é a principal causa do surgimento de cepas MDR e XDR. Porém, há alguns fatores intrínsecos às bactérias envolvidos com a resistência, como a impermeabilidade da parede celular aos antibióticos (MAITRA et al., 2019), além de desenvolvimento de mecanismos como “bombas de efluxo”, no qual o antibiótico pode ser expelido pela bactéria e mutações que induzam o aumento da expressão de proteínas envolvidas nesse sistema, que auxiliam a sobrevivência da *Mtb* (NGUYEN, 2017). O metabolismo lento também é um fator que auxilia a sobrevivência de *Mtb*, já que bactérias que se multiplicam rapidamente são alvos fáceis para a ação de antibióticos (PANDEY; SASSETTI, 2008).

O controle do metabolismo central e da replicação por parte dos microrganismos faz com que a bactéria não só sobreviva à ação de antibióticos, mas também à ação da resposta imune do hospedeiro. Resposta essa que tem como um dos principais destaques a formação do granuloma, que em alguns casos permite a convivência entre patógeno e hospedeiro. Nessa condição é caracterizado o principal ponto que relaciona a *Mtb* com o hospedeiro humano, que é a reprogramação de macrófagos alveolares após o primeiro contato com o

bacilo, influenciando na montagem da resposta imune e tendo como consequência a sobrevivência do patógeno e o desenvolvimento da tuberculose (MIGGIANO; RIZZI; FERRARIS, 2020).

### *1.3* Imunologia da tuberculose

Um indivíduo que, quando exposto, inala *Mycobacterium tuberculosis,* tem nas respostas iniciais que ocorrem no pulmão um fator decisivo para o decorrer da infecção. O encontro entre a *Mtb* e o hospedeiro tem como consequência a resposta imune complexa e multivariada, que pode resultar em eliminação total da bactéria, infecção latente ou doença tubercular.

De maneira resumida o curso para o estabelecimento da infecção por *Mtb* é: após inalação e superação das barreiras naturais do corpo (ex, muco, cílios, epitélio), a micobactéria chega ao pulmão pelas vias aéreas e encontra os macrófagos residentes do tecido, os macrófagos alveolares; a bactéria pode ser eliminada já nesse momento, mas caso isso não ocorra, devido a seus mecanismos de escape da fagocitose, elas se proliferam no interior dos macrófagos e podem ser disseminadas ao tecido intersticial pulmonar. À partir do reconhecimento dos PAMP (padrão molecular associado à patógenos) pelos receptores de padrão molecular (PRR) das células residentes, a resposta inflamatória é iniciada e outros leucócitos são atraídos para o sítio da infecção. Assim, macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos e também os neutrófilos amplificam a resposta inflamatória fagocitando os bacilos. Células dendríticas que fagocitaram a micobactéria migram para os linfonodos para apresentação de antígenos e ativação da imunidade adaptativa; as células T CD4 e CD8 ativadas são então recrutadas ao pulmão. As células T juntam-se então aos neutrófilos e macrófagos constantemente recrutados ao sitio inflamatório, e ao redor dos macrófagos alveolares infectados, forma-se o granuloma (PAI et al., 2016). Essa estrutura composta por diversos tipos de células imunes produzindo mediadores inflamatórios e microbicidas tem como principal função impedir que a bactéria se dissemine e eliminar o foco de bactérias do centro do granuloma (PAI et al., 2016).

Os monócitos são uma das principais células imunes que compõem o granuloma, e migram ao sitio de infecção em resposta às citocinas e quimiocinas liberadas pelas células residentes que reconhecem as bactérias (FLYNN; CHAN; LIN, 2011; ORME; BASARABA, 2014). Os monócitos são elementos fundamentais da resposta imune inata primária, e sua importância é relatada em estudos relacionados ao câncer (CAMPBELL; KUO, 2020), ao HIV (DE PABLO-BERNAL et al., 2020), infarto agudo do miocárdio (CHEN et al., 2021), Covid-19 (JAFARZADEH et al., 2020), infecções helmínticas (BEWKET et al., 2021), dentre outros.

Na tuberculose, os monócitos são descritos como tendo papel antagônico. Sua principal função é a defesa antimicrobiana por meio de ativação dos mecanismos microbicidas inatos e a indução da imunidade adquirida contra o *Mtb* (PAHARI et al., 2018). Mas, por outro lado, podem contribuir para a disseminação do patógeno através da indução do dano tecidual por meio da liberação de MMP (metaloproteinases), mais precisamente MMP1 e MMP9 (ELKINGTON; UGARTE-GIL; FRIEDLAND, 2011), e também o excesso de IL-1β, TNF- α, óxido nítrico e reativos do oxigênio, que destroem células saudáveis do interstício pulmonar (KOLB et al., 2001; ROSANNA; SALVATORE, 2012).

Em experimentos *in vitro* que utilizam PBMCs, os monócitos são as primeiras células a serem infectadas pela *Mtb,* e de maneira semelhante, ao se tratar de estudos *in vivo* ou em pacientes, monócitos e macrófagos são os primeiros alvos da micobactéria, além disso, há um aumento no número de monócitos no sangue periférico quando a infecção está estabelecida e esse fato está diretamente ligado à resistência ou suscetibilidade à doença (IQBAL et al., 2014; LIANA; BRESTILOVA; RAHADIYANTO, 2019).

O aumento de monócitos no sangue periférico está relacionado à assinatura transcricional baseada em interferon do tipo I (NARANBHAI et al., 2015). Outras citocinas como, IL-1β, IL-1α, IL-6, IL-8 e TNF-α, são essenciais ao controle da infecção por *Mtb,* no entanto, há a necessidade de equilíbrio na produção das mesmas afim de evitar inflamação exagerada (CREVEL; OTTENHOFF; MEER, 2002; MARTINEZ; MEHRA; KAUSHAL, 2013; KRUPA et al., 2015; THOBAKGALE et al., 2018). Por isso, na infecção por *Mtb*, são

produzidas não apenas citocinas de caráter inflamatório, mas também citocinas com perfil anti-inflamatório como IL-10, que equilibram o excesso de inflamação (LASTRUCCI et al., 2015; DUPONT et al., 2019). Os monócitos podem ser classificados de acordo com o tipo de citocinas que produzem e tipo de resposta aos patógenos, em subgrupos, a saber, clássicos (CD14++, CD16−), intermediário (CD14+, CD16+) e não-classicos (CD14+, CD16++), e a proporção destes subgrupos pode definir o curso da infecção (BALBOA et al., 2015).

Pelo fato de serem 3 populações bem definidas (CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011), os subgrupos de monócitos apresentam diferenças fenotípicas e funcionais que podem induzir a diferenciação em variados tipos de macrófagos, nos quais podem apresentar subgrupos relacionados a um perfil pró e anti-inflamatório baseados na polilarização (OREKHOV et al., 2019). Os macrófagos apresentam um papel importante no curso da tuberculose, pois são a primeira linha de defesa contra o patógeno podendo, inclusive, eliminá-lo rapidamente, no entanto, em alguns casos isso não ocorre, o que se deve aos vários meios de evasão da resposta imune característicos à *Mtb*.

A evasão da resposta imune pela *Mtb* tem seu início já na etapa de reconhecimento da bactéria pelas células do sistema imune através dos receptores de reconhecimento padrão (PRR). Entre os principais receptores envolvidos destacam-se os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo Nod (NLRs) e receptores de Lectina tipo C (CLRs), todos são responsáveis pela ativação de várias funções celulares relacionadas à defesa do hospedeiro, incluindo vias relacionadas à fagocitose, apoptose e piroptose (VAN CREVEL et al., 2011).

Sobre os receptores do tipo Toll, os membros TLR4 e o TLR9 possuem vias de transdução de sinais que dependem do fator de diferenciação mielóide da molécula adaptadora-88 (MyD88), e a literatura mostra que a baixa expressão desse fator está diretamente relacionada à maior suscetibilidade à infecção por micobactéria (SCANGA et al., 2004). TLR2, outro importante membro da classe, que tem a lipoarabinomannan (LAM) como seu agonista, é descrito na literatura sob diferentes óticas na tuberculose, seu papel está envolvido desde a comprometida ativação de células T CD4+ devido a indução da expressão de IL-

10, até ativação de macrófagos e formação de granulomas. Ainda, polimorfismos do gene do TLR2 estão associados ao aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento da forma ativa da tuberculose. Portanto, baseados nessas informações sugere-se que o reconhecimento da *Mtb* pelo TLR2 pode ter dois diferentes desfechos, favorecendo ou prejudicando a resposta (PRADOS-ROSALES et al., 2011; SHAH et al., 2012).

Os receptores de lectina tipo C, assim como os receptores tipo Toll, também estão envolvidos na formação de granulomas. Uma vez reconhecida a trealose 6,6-dimicolato (TDM) da *Mtb* pelos receptores, ocorre a produção de citocinas como (TNF)-a, IL-6, IL-1b, IL-12, IL-10 e IL-17 induzindo respostas inatas de macrófagos / células dendríticas resultando no desenvolvimento da resposta adaptativa das células T. (DONNACHIE; FEDOTOVA; HWANG, 2016). Apesar da indução de inflamação e formação do granuloma a *Mtb* consegue persistir (DAVIS; RAMAKRISHNAN, 2009).

Mais um importante exemplo de PRR relacionados à TB, são os receptores tipo NOD (NLR), que tratam-se de uma família com mais de 20 membros que compartilham uma estrutura conservada e são capazes de reconhecer peptidoglicano de bactérias gram positivo e negativo (FERWERDA et al., 2007). A ausência desse tipo receptor em células imunes tornam o hospedeiro mais suscetível à infecção por *Mtb* (DIVANGAHI et al., 2008). Essa interdependência é justificada pelo fato de NLR estar envolvido na ativação de vias de sinalização do inflamassoma, além de fazerem parte da indução da autofagia por meio do NOD2 (DIVANGAHI et al., 2008).

A autofagia é uma função celular relacionada à homeostase, que atua degradando elementos citoplasmáticos não funcionais via lisossomos (LAMB; YOSHIMORI; TOOZE, 2013). Além disso, a autofagia também auxilia a resposta imune inata e adaptativa, inclusive durante a infecção por *Mtb* (GUTIERREZ et al., 2004). Uma das mais notórias características da patogenicidade da *Mtb*é a sua capacidade de sobreviver mesmo após fagocitada por macrófagos do hospedeiro, e isso se deve principalmente à sua interferência nas vias de maturação de fagossomo (GUTIERREZ et al., 2004). A *Mtb* conta com algumas estratégias para impedir a maturação dos fagossomos, dentre elas a inibição da

acidificação através da interrupção do acúmulo de enzimas vacuolares, ATP e GTP, que ocorre devido à interação de proteínas bacterianas como ESAT-6 e ATP1/2 (ROHDE et al., 2007). Uma outra estratégia já relatada na literatura é a indução da expressão da proteína coronina 1 na membrana do fagócito do hospedeiro (NEEFJES; THOLE; YOUNG, 2001). O desequilíbrio na produção de citocinas também está envolvido na persistência do patógeno fagocitado, como por exemplo a indução da produção de IL-10 inibe a maturação de fagossomos por meio da ativação do fator de transcrição STAT3 e MAPKp38 e ERK1/2 (LEARY; SULLIVAN; KEANE, ).

Um dos mais importantes mecanismos de inibição da maturação de fagossomos por parte da *Mtb* é a inibição da fusão dos fagossomos com lisossomos. Essa inibição pode ocorrer através de interferência na sinalização celular causada pela proteína secretada pela micobactéria, PknG (PRADHAN; SHRIVASTVA; ALERTS, 2021). A inibição farmacológica do fator de transcrição NF-κB demonstra a importância desse fator de transcrição para a resposta imune, uma vez que a ausência das suas funções impede a ativação da resposta pró inflamatória para controle da infecção por *Mtb*, o que justifica o fato da micobacteria, através da através de interação proteica, impedir a ativação de vias relacionadas a apoptose (BAI et al., 2013).

A *Mtb*é um dos mais bem-sucedidos patógenos existentes e a sua adaptação ao sistema imune humano é a prova disso. Parte desse sucesso se deve ao sistema de secreção ESX-1, que está diretamente envolvida na indução de danos a membrana fagossomica resultando em liberação e consequente interação entre proteínas da *Mtb* e do hospedeiro resultando em alteração funcional. Além disso, o sistema ESX-1 está envolvido em diversos outros mecanismos de escape da micobactéria como interrupção da maturação do fagossomo, reprogramação da morte celular e inibição da autofagia (CHAI; WANG; LIU, 2020). Diante de todas essas possibilidades de evasão da resposta imune, caso a *Mtb* tenha sucesso o resultado será a sua disseminação linfática e/ou hematogênica podendo chegar a outros órgãos.

### *1.4* Tuberculose extrapulmonar (TBEP)

Segundo a OMS, a tuberculose extrapulmonar é caracterizada como uma infecção de tecidos e órgãos fora do parênquima pulmonar causada por *Mycobaterium tuberculosis* (WHO, 2020). Esse tipo de infecção ocorre em aproximadamente 20 – 25% dos casos de TB e pode chegar a 50% em situações que envolvem pacientes vivendo com HIV (ONIX J CANTRES-FONSECA, WILLIAM RODRIGUEZ-CINTRÓN, 2013). O diagnóstico da tuberculose extrapulmonar é mais complexo, pois nem sempre é considerada uma possibilidade diagnóstica devido ao conjunto de sinais e sintomas diversificados, que podem variar de acordo com cada organismo e com os órgãos afetados (SANCHES; CARVALHO; DUARTE, 2015).

A TB extrapulmonar afeta aproximadamente 20% dos pacientes infectados, podendo chegar a 50% em pacientes com co-infecção pelo HIV (RAJ et al., 2016). Esses números mostram que os métodos atuais que envolvem o diagnóstico das formas clínicas da tuberculose podem ser aprimorados, o que também justifica a necessidade de aumentar o conhecimento sobre essa doença (KUMAR; KON, 2017). A tuberculose pode afetar praticamente todos os órgãos do corpo humano (GUPTA; KUMAR, 2011; VERMA; PATIL; LALLA, 2012; POLLARD; KITCHEN, 2017; ARSHAD et al., 2020; ESPOSITO et al., 2020), sendo o fígado, um dos possíveis órgão afetados (PARSAK et al., 2008; MANOJ; SRIGRISHNA; RAGUNATHAN, 2012; MEENA et al., 2015). John Bristowe relatou o primeiro caso de tuberculose hepática em meados de 1858, na Inglaterra (HICKEY et al., 2015), e desde então, com os avanços da medicina e a consequente melhoria em autopsias, tem se observado o aumento do número de casos ao longo dos anos, principalmente após a epidemia da AIDS (MCMULLAN; LEWIS, 2017).

O envolvimento do fígado em casos de tuberculose disseminada é observado em aproximadamente 50-80% dos pacientes (WU et al., 2013). As características clinicas da tuberculose hepática são inespecíficas, e os sintomas mais comuns são febre alta, hepatomegalia e dores abdominais, assim, o diagnóstico é baseado demonstração de granuloma epitelial ou análises de biópsia (VINCENT R. TATCO, 2015). Pacientes recém transplantados de fígado

possuem alta suscetibilidade de desenvolvimento de tuberculose, além disso a tuberculose hepática em si impede que o fígado realize suas funções vitais tornando assim o hospedeiro mais suscetível a infecções (LIU et al., 2014a; GOUNDER et al., 2017).

Há formação de granulomas hepáticos na grande maioria de pacientes diagnosticados com tuberculose hepática, além disso, é observado também que quanto maior e mais caseosos esses granulomas maiores eram as anormalidades bioquímicas e, consequentemente, as disfunções do órgão (MCMULLAN; LEWIS, 2017).

### *1.5* O fígado como órgão linfoide

O fígado é um órgão vital, devido às funções relacionadas ao metabolismo de nutrientes e excreção de metabólitos residuais. Sua principal atividade está relacionada ao controle do fluxo de substâncias originadas de processos digestivos antes das mesmas serem distribuídas ao sistema circulatório (WAKIM, 2017). Além disso, o fígado possui papel fundamental frente a infecções devido a dois importantes elementos, sendo eles, determinadas populações de células sinusoidais e hepatócitos que modulam ativamente as respostas imunes localmente e, assim, determinam o resultado das respostas imunes hepáticas, e o microambiente hepático, que pelo fato estrutural e de receber considerável quantidade do sangue circulante, é algo único (MINEMURA; TAJIRI; SHIMIZU, 2014).

O sangue da circulação sistêmica e do intestino passa pelo fígado (30% do sangue total/minuto), o que faz com que esse órgão esteja sujeito à exposição de antígenos e produtos microbianos derivados de bactérias intestinais, que tem como consequência um microambiente distinto (GERSHWIN; VIERLING; MANNS, 2014). A alta eficiência do fígado diante de infecções bacterianas é explicada principalmente pela ação de macrófagos hepáticos residentes, ou células de Kupffer (KC). No decorrer de uma infecção essas células atuam na primeira linha de defesa produzindo um conjunto de citocinas que desencadeiam várias funções imunes, como o recrutamento e atividade antimicrobicida dos

neutrófilos por meio da produção de citocinas como IL-1β, IL-6, TNF-α e leucotrienos, além de ativar células NK, através da produção de IL-12 e IL-18.

Células NK são um dos mais abundantes leucócitos no fígado, representando cerca de 50% da população linfocitária local e atuam, principalmente, na resposta imune inicial produzindo citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ, e lisando as células infectadas através de perforinas e granzimas, no entanto essas células podem ser polarizadas a um perfil anti-inflamatório dependendo do microambiente (MIKULAK et al., 2019). Células NKT também são encontradas em grande quantidade no fígado, inclusive, é nesse órgão o local com maior número desse tipo de célula. Quando ativadas por IL-12, as NKT começam a produzir IFN-γ, TNF-α e também induzem o mecanismo de lise celular mediada por Faz/FazL. A depender do estimulo, as células NKT também podem ser induzidas a produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13 (BEHAR et al., 1999; BANDYOPADHYAY; MARRERO; KUMAR, 2016).

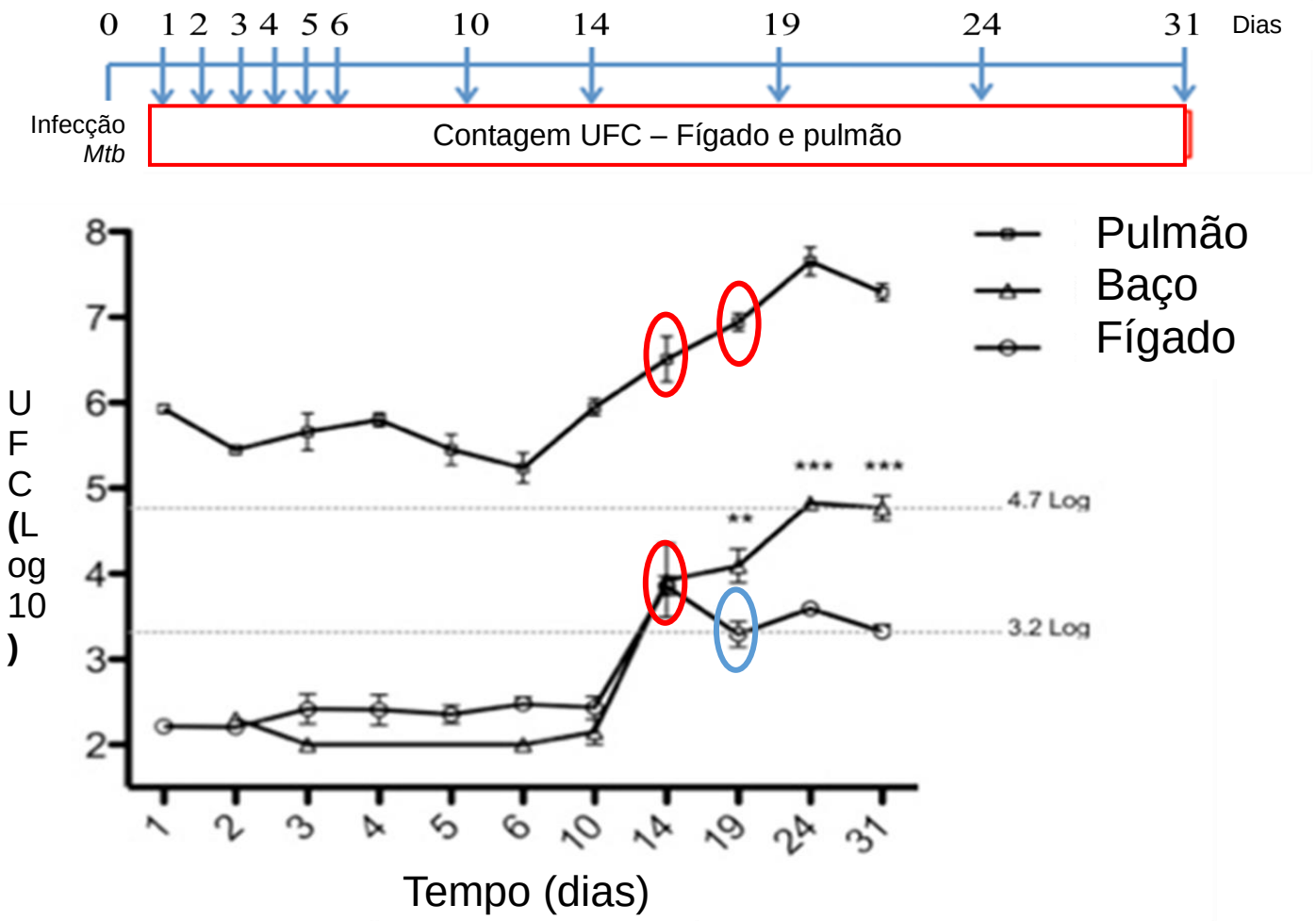
Os linfócitos não convencionais Tγδ, principais produtores de IL-17, são mais um dos subtipos celulares presentes no fígado e compreendem cerca de 25% do total de linfócitos T intra-hepáticos (HUNTER et al., 2018). Diante disso, é possível notar que no fígado é encontrado uma frequência maior de células que participam na resposta imune já no início da infecção, o que o torna diferente quando comparado a outros órgãos linfóides, caracterizando assim a sua capacidade de conter diversas infecções (RACANELLI; REHERMANN, 2006). Portanto, o fígado é uma fonte promissora de biomarcadores imunes que estão ligados à suscetibilidade e ou resistência a infecções como a que caracteriza a tuberculose, e a bioinformática tem se mostrado uma ferramenta útil na identificação dos mesmos.

A prospecção biomarcadores que podem auxiliar no diagnóstico e / ou tratamento parece ser um método bastante promissor para aperfeiçoar conhecimentos sobre diagnóstico e prognóstico (GOLETTI et al., 2016; SIGAL et al., 2017; CORREIA-NEVES et al., 2019; MACLEAN et al., 2019; AHMED et al., 2020). O fígado pode ser considerado uma fonte promissora na busca de biomarcadores para o prognóstico, pois sua eficiência no controle da infecção por *Mtb* já foi observada (MUSTAFA et al., 1999; SEILER et al., 2001). Além de sua

já conhecida importância nos casos de tuberculose extrapulmonar (RAJAGOPALA et al., 2011; BARRIOS-PAYÁN et al., 2012; SHARMA; KC; JAISI, 2018).

Em trabalho realizado anteriormente em nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), com modelo experimental de tuberculose, utilizando camundongos suscetíveis (BALB/c) infectados com a cepa H37Rv de *Mtb*observamos que o crescimento da bactéria no fígado dos animais era mais controlado do que no baço e pulmão. Outros trabalhos tem mostrado esta mesma evidência (MILLS et al., 2001; SEILER et al., 2001; KORF et al., 2009; FATTORINI et al., 2015). Isto indicava que existiam fatores neste tecido, envolvidos no controle da infecção. Para definir quais eram estes fatores e em qual momento estes fatores eram definidores do controle bacteriano, foi realizada uma cinética de infecção. Nessa cinética foram extraídos pulmão, baço e o fígado em diferentes tempos conforme indica a figura 1.

Foi observado que no 14° dia após a infecção, os 3 órgãos avaliados apresentaram aumento de CFU, no entanto no 19° dia o fígado, diferente dos outros dois órgãos, apresentou controle da infecção atingindo um platô de crescimento bacteriano. Baseado nesses resultados, levantamos a hipótese de que genes relacionados à susceptibilidade e à resistência poderiam ser diferencialmente identificados entre os dois órgãos nestes períodos. Estes marcadores poderiam ser utilizados na determinação de uma bioassinatura para prognóstico da apresentação clínica da tuberculose. Para avaliarmos estas diferenças, o perfil transcriptômico de células do pulmão, principal órgão afetado pela tuberculose, e fígado, órgão que apresentou resposta mais eficiente, em animais infectados entre os dias 14 e 19 pós-infecção, foi obtido pela tecnologia de sequenciamento de RNA (resultados não publicados).




Pulmão, Baço e Fígado. O gráfico representa a média ± SEM da contagem de CFU. **p<0.01 e ***p<0.001 (dados não publicados).

### *1.6* Epigenética

O termo epignética significa "além da genética", e isso se deve ao o que se aplica esse termo, no caso se trata de mudanças hereditárias na expressão gênica que não alteram a estrutura primária do DNA (PERRI et al., 2017). A epigenética é caracterizada principalmente por 3 mecanismos, sendo eles: metilação do DNA, que se trata da reação que catalisa a transferência covalente de um grupo metil de S-andenosil metionina (SAM) para o quinto carbono das citosinas. A citosina metilada, em sua grande maioria, encontra-se em regiões especificas do DNA, conhecidas como regiões de CpG, essa transferência do grupo metil para citosinas é realizada através da ação de um grupo especifico de enzimas epigenéticas identificadas como DNA-metil transferase (DNMT). A família de enzimas envolvidas na metilação do DNA é dividida em 3 classes,

sendo elas DNMT1, DNMT2, e as DNMT3A/3B/3L. A metilação do DNA está presente na regulação de expressão gênica em diversos mecanismos e processos biológicos como por exemplo desenvolvimento embrionário, inativação do cromossomo X, origem do câncer etc. (HERVOUET et al., 2018).

Um outro mecanismo de regulação epigenética são as modificações covalentes da histona. Essas modificações são a metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação. A adição ou remoção desses grupos químicos induzem a modificação conformacional da cromatina, no qual o “relaxamento” da mesma está relacionada à indução da expressão gênica, enquanto que a compactação está envolvida à repressão transcricional (RAJAN et al., 2020).

Enzimas também estão envolvidas na adição dos grupamentos químicos nas caldas N-terminais das histonas, destacam-se a histona acetil-transferase (HAT) e hitona desacetilase (HDAC) envolvidas na adição ou remoção de grupos acetil respectivamente. Histonas metil-transferase (HMT) e histonas demetilases (HDM) são responsáveis pela adição ou remoção de grupos metil (LU, 2013; QIN et al., 2020).

Por fim, a regulação da expressão gênica através da ação de microRNAs (miRNAs) é mais um importante mecanismo epigenético. Micro RNAs são moléculas não codificantes constituído por cerca de até 20 nucleotídeos. Seu mecanismo efetor é, resumidamente, se ligar diretamente à molécula de RNA mensageiro (mRNA) induzindo a degradação do mesmo e assim caracterizando o silenciamento gênico pós-transcricional. Esse mecanismo epigenético está envolvido em processos biológicos como ciclo celular, apoptose entre outros (PERRI et al., 2017).

A epigenética está envolvida em diversos aspectos de uma grande variedade de doenças como o câncer (GARCIA-MARTINEZ et al., 2021), arteriosclerose (KHYZHA et al., 2017), inflamação e imunometabolismo (RAGHURAMAN et al., 2016), hipertensão (LIU; LIANG, 2019), infecções viral (LI et al., 2010), tuberculose (KAHARI et al., 2019) inclusive como potenciais alvos terapêuticos (COLE et al., 2016).

As funções imunes efetoras são em sua grande maioria controladas por mecanismos epigenéticos (WIECZOREK et al., 2009). Importantes citocinas produzidas durante a infecção bacteriana como IFN-γ, IL-1β, TNF-α e IL-6, polarização de células T entre outros mecanismos imunes também são modulados epigeneticamente (ESTERHUYSE; LINHART; KAUFMANN, 2012).

Algumas proteínas virulentas da *Mtb* atuam interferindo em mecanismos epigenéticos do hospedeiro, como o fator antigênico 6 secretado precocemente (ESAT-6), proteína de sobrevivência intracelular (Eis) e a lipoproteína micobacteriana de 19 kDa, todas possuem capacidade de agir direta ou indiretamente com componentes envolvidos com a maquinaria de transcrição do hospedeiro, tendo como consequência regulação da resposta imune, buscando inibir a resposta do hospedeiro e consequentemente persistir. Desta forma, entender se genes relacionados à susceptibilidade ou resistência estão sob controle epigenético pode ser uma ferramenta importante na identificação de bioassinaturas associadas ao prognóstico da doença.

## 2. OBJETIVO

Utilizar dados de transcriptômica obtidos a partir de sequenciamento de RNA de amostras de fígado e pulmão de camundongos infectados com *Mtb*para:

- Identificar *in silico* genes envolvidos com a resistência ou suscetibilidade à tuberculose

- Identificar mecanismos epigenéticos relacionados à organização dos diferentes perfis obtidos

- Validar *in vitro* os alvos identificados, por meio da infecção de células mononucleares humanas e inibição das vias referidas como importantes nos perfis de susceptibilidade e resistência.

## 3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os resultados e discussão estão apresentados em duas partes, de acordo com o seguinte delineamento experimental.

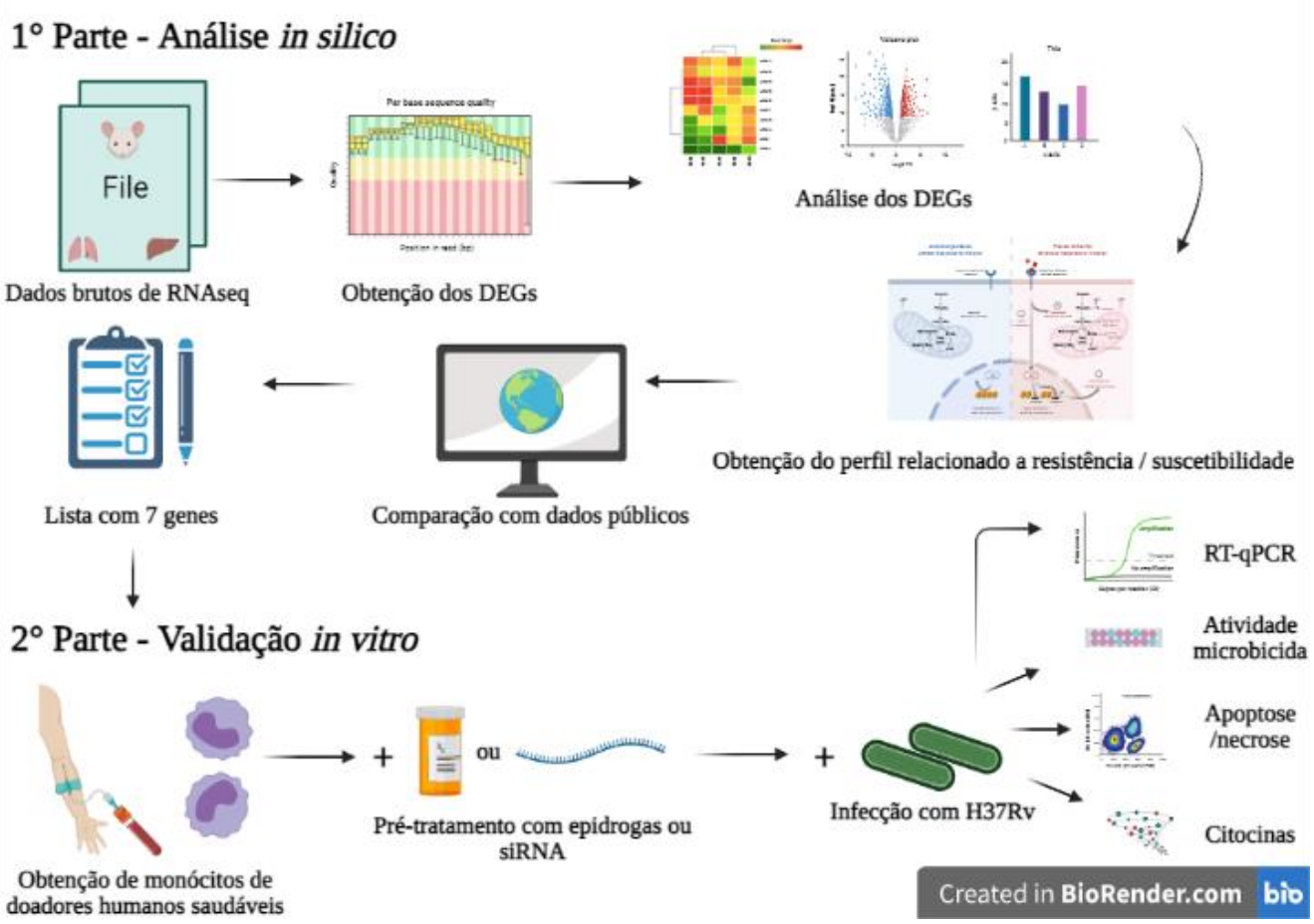


**Figura 2. Organização esquemática do delineamento experimental.** 1° Etapa constituída de análises *in silico* de dados anteriormente obtidos por nosso grupo de pesquisa. 2 ° Etapa constituída de validação *in vitro* dos achados *in silico*.

Parte 1: A partir de dados disponíveis no laboratório de sequenciamento de RNA das amostras de fígado e pulmão de camundongos infectados com a cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, bem como dados disponíveis na literatura de sequenciamento de genes em amostras de pacientes infectados com a forma ativa ou latente da tuberculose, foram obtidos os genes diferencialmente expressos e relacionados com o prognóstico da doença.

Parte 2: Para validação destes genes como potenciais alvos na construção de uma bioassinatura para predição de resposta à bactéria, monócitos obtidos a partir de sangue periférico de doadores humanos saudáveis foram pré-tratados com epidrogas, inibidores farmacológicos de vias ou siRNA e infectados *in vitro* com a cepa de *Mtb*H37Rv e foram analisadas funções efetoras e modulação epigenética. A partir deste delineamento, foi possível identificar se os genes e enzimas identificados eram essenciais ao controle da infecção.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Processamento e análise diferencial da expressão gênica

O seqüenciamento e análise dos dados foi realizada em colaboração com o pesquisador Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira, que no momento era Coordenador do Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio) da FIOCRUZ em Belo Horizonte, Presidente da Associação Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional, e Diretor da International Society for Computational Biology.

A análise do transcriptoma foi realizada por sequenciamento massivo dos cDNAs obtidos a partir do mRNA. Cada uma das amostras de RNA total foi submetida ao processo de depleção de RNA ribossomal e enriquecimento de mRNA, usando os kits RiboMinus Eukaryote kit for RNA-Seq (Invitrogen). Em seguida, o RNA resultante foi fragmentado, seguido de purificação e síntese de

cDNA, usando o kit SOLiD Total RNAseq kit (Applied Biosystems). Este material foi então utilizado para a construção das bibliotecas do tipo fragmento, para posterior sequenciamento utilizando os kits e protocolos recomendados pela Plataforma SOLID™. O mapeamento revelou que a cobertura alcançada pelo sequenciamento foi de 4,5 vezes o transcriptoma total do camundongo, com média de aproximadamente 7 milhões de reads.

Os dados obtidos através da plataforma SOLID foram inicialmente filtrados por uma estrutura projetada para identificação eficiente de erros dentro do sequenciamento da plataforma. Para isso, são utilizados os valores de qualidade (QV) informados pela análise primária do SOLID, o parâmetro usado em nossa filtragem foi QV ≥20, o objetivo dessa filtragem é obter dados com um alto índice de confiabilidade para aplicações funcionais.

Os dados brutos foram processados usando a linguagem R e o ambiente para computação estatística (R) 3.5 e o biocondutor 3.9 (GENTLEMAN et al., 2004; GENTLEMAN, 2015). A plataforma de sequenciamento do SOLID gera reads relativamente curtas (ONDOV et al., 2008; LIU et al., 2014b) e, como indicado na literatura (ANDERS et al., 2013; LIAO; SMYTH; SHI, 2013) ), o pacote de programas estatísticos Rsubread é recomendado para trabalhar com esse tipo de dados, o mesmo também foi utilizado para alinhar ao genoma de referência, GRMc38_p6 e para gerar uma tabela de contagem de reads. Foram aproximadamente 27.000 reads mapeadas, enquanto as reads com contagens muito baixas em todas as bibliotecas foram removidas do conjunto de dados com a função filterByExpr do pacote edgeR. Os 18.394 reads restantes do genoma foram normalizados para registrar contagens por milhão (logCPM) com a função calcNormFactors do pacote edgeR.

### 4.2 Análise de Pathways

Para realizar a análise funcional, obtivemos os Ensembl IDs para os genome features correspondentes usando o banco de dados internacional MGI (http://www.informatics.jax.org/). As análises de vias foram feitas com o banco de dados online ToppGene (CHEN et al., 2007; CHEN; ARONOW; JEGGA, 2009)

(https://toppgene.cchmc.org/). Determinamos vias significativamente enriquecidas por um valor de P <0,05 e FDR <0,01. Os valores de P foram transformados em -Log10 para facilitar a visualização; portanto, quanto maior o valor de -log10 (valor de P), maior a importância do enriquecimento.

### 4.3 Metanálise de dados públicos

Para realizar a metanálise, foram utilizados dados públicos de microarrays adquiridos em 11 estudos publicados anteriormente e depositados no repositório público de dados Gene Expression Onmibus (GEO - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). A metanálise foi realizada a partir de estudos utilizando amostras de sangue total de humanos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Os identificadores do estudo são: (identificadores GSE19435, GSE19439, GSE19491, GSE19444, GSE28623, GSE41055, GSE42825, GSE42826, GSE42830, GSE42834 e GSE83456). A metanálise foi realizada usando o OMiCC Compendia Commons (OMiCC; https://omicc.niaid.nih.gov/) (SHAH et al., 2016). que é uma plataforma on-line capaz de analisar dados de expressão gênica. No OMiCC, organizamos os 11 conjuntos de dados em três grupos: Ctrl (controle saudável), TbP (Paciente com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa) e TbL (Paciente com diagnóstico de tuberculose latente). Vale ressaltar que consideramos um número mínimo de replicados biológicos nos trabalhos utilizados nesta análise, em que cada grupo de amostras deve conter pelo menos três repetições de cada grupo.

A metanálise resultou em assinatura transicional para TbP ou TbL, cujos DEGs foram filtrados por um valor de P ajustado <0,01. Para comparar os genes diferencialmente expressos obtidos via OMiCC com nossos dados de camundongo, identificamos genes humanos ortólogos com Ensembl / Biomart. (https://www.ensembl.org/). Após a obtenção dos genes ortólogos, as listas foram cruzadas usando o InteractiVenn (http://www.interactivenn.net/), permitindo identificar DEGs que se sobrepunham aos conjuntos de dados humanos e ao conjunto de dados de camundongos.

### 4.4 Análise estatística

Os genes expressos diferencialmente (DEGs) foram obtidos por meio do método de teste t moderado com o pacote limma para R, que é citado na literatura como um bom método para obtê-los (FRANCK et al., 2013; SONESON; DELORENZI, 2013; RITCHIE et al., 2015). Os DEGs foram selecionados com base no valor de P ajustado <0,05 pelo método de descoberta falsa (FDR), e o Fold Change foi de ≤ -1,3 ou ≥1,3. Os heat map foram gerados com logCPM a partir de DEGs selecionados, enquanto o agrupamento foi conduzido com a distância de correlação de Pearson para cálculos métricos e o método de ligação de Ward, com os pacotes gplots (WARNES et al., 2005). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com R e visualizada com o pacote ggbiplot. Gráficos de barras para genes únicos representam média ± DP e foram gerados com o GraphPad Prism versão 6.0. Para comparação das médias obtidas entre os diversos grupos nos experimentos, utilizamos o teste estatístico apropriado ao experimento em questão, com significância estabelecida em *p<0,05; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001.

### 4.5 Obtenção de monócitos

Voluntários hígidos, foram convidados a participar da pesquisa, registrando a sua autorização através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com a aprovação pelo Comitê de ética em Pesquisa (Anexo 1). De cada doador foram coletados 30 mL de sangue total através de uma única punção venosa em tubos BD Vacutainer® CPT™ com heparina. O material foi centrifugado a 400 × g por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, o plasma foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido em PBS 1 ×, pH 7,4 (Gibco-BRL). As células foram aplicadas na coluna de gradiente Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Biosciences AB®). Em seguida, estes foram centrifugados a 640 × g por 30 min em temperatura ambiente para obtenção da fração mononuclear purificada, que foi cuidadosamente coletada e transferida para um novo tubo.

Para os experimentos de infecção in vitro, os PBMCs foram quantificados, e os monócitos (células CD14 +) foram purificados usando seleção positiva com

nanopartículas magnéticas (BD Biosciences®). Resumidamente, PBMCs foram marcados com BD IMag Antihuman CD14 Magnetic Particles - DM. As células foram transferidas para uma placa de cultura de 48 poços e colocadas sobre um campo magnético de separação celular. As células marcadas migraram em direção ao ímã (fração positiva), enquanto as células não marcadas foram retiradas (fração negativa). A placa foi então removida do campo magnético para ressuspensão da fração positiva. A separação foi repetida duas vezes para aumentar a pureza da fração positiva, e os monócitos CD14 + foram usados para experimentos de infecção.

### 4.6 Obtenção de cepas de micobactérias

Todos os procedimentos envolvendo as cepas de micobactéria tuberculosa, *Mtb*H37Rv (ATCC® 27294TM, Rockville, MD), e não-tuberculosa, *Mycobacterium bovis* (BCG - Bacilo de Calmette-Guérin), *Mtb*H37Ra, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium avium* foram realizados na sala de segurança biológica nível 3 da FMRP-USP. Os experimentos envolvendo amostras de sangue humano, desde que não infectados in vitro com as bactérias, foram todos realizados em cabine de biossegurança nível 2, presente no laboratório de Imunologia e Epigenética da FCFRP. Todos os procedimentos seguiram as regras de biossegurança estabelecidas no país para manipulação de amostras biológicas, com devido treinamento e utilização de EPI e EPCs. As cepas de micobactéria foram gentilmente cedidas à pesquisa pelo Prof Dr Célio Lopes Silva. Foi utilizada cepas de 3ª geração que haviam sido armazenadas a -70ºC, repicadas em meio líquido 7H9 enriquecido com TM Middlebrook ADC (BD Biosciences, Sparks, USA) e incubadas a 37ºC por 11 dias até o crescimento bacteriano atingir a densidade óptica correspondente a $1x10^7$ micobactérias/mL. A suspensão micobacteriana foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos e o sedimento ressuspendido em 2 mL de PBS estéril.

### 4.7 Estimulação de monócitos com cepas de micobactéria

A suspensão de monócitos foi ajustada de acordo com experimento, sendo: para experimentos de qPCR: $2x10^6$ p/poço; para experimentos de siRNA: fagocitose e killing $7,5x10^3$ p/poço; para experimentos de apoptose: $3,5x10^4$ p/poço; para experimentos de fagocitose e killing tratados com epidrogas antes da infecção $7,5x10^3$ p/poço. Em todos os experimentos realizados foi utilizado Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) thermofisher@ complementado com 10% de soro fetal bovino (GibcoBRL). As células foram distribuídas em placas de 96 (200 µL/poço), ou 24 poços (500 µL/poço). Após o período previamente estabelecido para aderência das células, 4 horas, tratamento com epidrogas ou knockout com siRNA, foi realizada a infecção das células com micobactéria, com o MOI de 1:0,5; ou 1:1; ou 1:5; ou 1:10, por 2, 24, 48 ou 72 horas.

### 4.8 Inibição enzimática por epidrogas

Posteriormente ao plaqueamento das células, foi realizado o tratamento das células com epidrogas, que são compostos farmacológicos sintéticos bloqueadores de enzimas epigenéticas, por 24 horas em diferentes concentrações (1,25µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM e 20 µM). Para o controle negativo (solvente) foi utilizado o DMSO 0,2%.

As epidrogas que foram utilizadas e suas enzimas alvo estão apresentadas na tabela a seguir:

| EPIDROGAS | ENZIMA ALVO |
|---|---|
| 5-Azacytidine (Sigma-Aldrich®) | **DNMT** |
| Trichostatin A (TSA) (Sigma-Aldrich®) | **HDAC** |
| Pargyline (Sigma-Aldrich®) | **HDMT** |
| Anacardic acid (Sigma-Aldrich®) | **HAT** |
| 5’ -methylthioadenosine (Sigma-Aldrich®) | **HMT** |

| | |
|---|---|
| Saha (Sigma-Aldrich®) | **HDAC** |

Todos os compostos utilizados nesse estudo tem a sua eficácia frente aos seus alvos específicos relatadas previamente (BOSSCHE et al., 2014; DEKKER; VAN DEN BOSCH; MARTIN, 2014; HEERBOTH et al., 2014). Testes de viabilidade foram realizados em monócitos e cepa H37Rv.

### 4.9 Avaliação da atividade microbicida

Os monócitos foram infectados com *Mtb* e foram incubados por 2 horas (fagocitose) ou 24 horas (killing) em estufa de $CO_2$ a 37ºC, tanto para a placa de fagocitose quanto de killing o sobrenadante foi retirado e armazenado para experimentos de quantificação de citocinas, além disso, foram adicionados 200 µL de uma solução de saponina a 0,05% para lise das células. Dez microlitros de uma solução de resazurina (0,5mg/ml) foram adicionados as placas e as mesma incubadas por 24 horas no escuro. A leitura da atividade da resazurina foi feita em espectrofluorímetro (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices) com excitação a 560 nm e emissão em 590 nm. Como controles foram utilizados poços somente com monócitos em meio de cultura DMEM e saponina, e também poços somente com monócitos em meio de cultura DMEM e saponina e resazurina.

### 4.10 Extração de RNA total

Para avaliação da expressão gênica, primeiramente foi realizada a extração do RNA total através da metodologia empregando o reagente Trizol (ThermoFísher Scientific, Waltham, EUA). De acordo com o protocolo, após o período de infecção das células, as mesmas foram ressuspendidas em 500µl de Trizol, transferidas para tubos de 1,5 ml. As amostras foram agitadas em vórtex, e em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio à temperatura ambiente e 10 µL de glicogênio gelado (5 mg/mL) (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As amostras foram agitadas em vórtex, seguido de um intervalo de 5 min à

temperatura ambiente, para que fosse realizada centrifugação à 14000 rpm por 15 min à 4 ºC. Após centrifugação, foram formadas três camadas, sendo o sobrenadante incolor do topo do tubo eppendorf (cerca de 400 µL) recuperado para um novo tubo para dar continuidade à extração do RNA. No novo tubo, foram adicionados 400 µL de isopropanol 100%, gelado, e as amostras foram homogeneizadas por inversão. Em seguida, as amostras foram armazenadas overnight em freezer -80 ºC.

No dia seguinte, as amostras foram descongeladas no gelo e centrifugadas à 14000 rpm por 15 min à 4 ºC. Após centrifugação, todo o isopropanol foi retirado e ao pellet foi adicionado 1 mL de álcool etílico 70% gelado. Novamente, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 15 min à 4 ºC e em seguida todo o álcool foi retirado dos tubos, permitindo que os pellets secassem. Aos pellets secos, foram adicionados 15 µL de água livre de nucleases e as amostras foram incubadas em banho seco por 10 min à 55 ºC, para facilitar a diluição do RNA. Após incubação, as amostras foram homogeneizadas, colocadas no gelo e quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop®2000, com razão 260/280 próximas de 1,80 e então, as amostras foram armazenadas em freezer -80 ºC.

### 4.11 Síntese de cDNA

Para realização da PCR em tempo real, as amostras de RNA foram convertidas em cDNA utilizando-se o “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As amostras foram incubadas com 2 µL de tampão RT 10X, 0,8 µL de dNTPs mix, 2 µL de random primers e 1 µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), fornecidos pelo fabricante e acrescidos de água livre de nucleases para o volume final da reação (20 µL). A reação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

### 4.12 PCR em tempo real (RT-qPCR)

Após a síntese de cDNA, a expressão dos genes alvos das amostras foi analisada por PCR em tempo real através do mRNA para os seguintes genes:

Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Hdac4, Hdac8 e Hdac9. Foi utilizado 50 ng de cDNA e o mix “2x qPCRBIO SyGreen Mix Hi ROX” (PCR BIOSYSTEMS, Wayne, Pennsylvania, USA), seguindo instruções do fabricante para configuração dos ciclos no termociclador. Os primers para os genes alvos foram desenhados baseados na literatura, sendo: Creb3l1 (LIU et al., 2018b), Cyyr1 (VITALE et al., 2002), Trim17 (MANDELL et al., 2017), Hdac4 (ZHANG et al., 2019), Hdac8 (SURGERY, 2019), Hdac9 (CARDENAS et al., 2018), Hdacs1,6 e11(BO et al., 2020) e para o gene Myo7b utilizamos o software de desing de primer, Primer3 (KORESSAAR; REMM, 2007), cuja a fonte para o desenho foi NCBI Reference Sequences (RefSeq), NM_001080527.1.

### 4.13 Lista de Primers

| Gene | Ref. Seq. | Espécie |
|---|---|---|
| *CREB3L1* | NM_052854 | Humana |
| forward primer 5’-CCACGAGACCACCAAGTACC-3’ | | |
| reverse primer 5’-GTACCAGGGGTCCGTCCTAT-3 | | |
| *CYYR1* | NM_052954 | Humana |
| forward primer 5’-GCTGCTCTCTCCATCTGATCGC-3’ | | |
| reverse primer 5’-ATTCCAGGCAAGATCGCCCATTG-3’ | | |
| *MYO7B* | NM_001080527 | Humana |
| forward primer 5’-GCTCAGCATCCAGAAAGTCC-3’ | | |
| reverse primer 5’-CCTGTTGCAGTAGCCTCTCC-3’ | | |
| *TRIM17* | NM_001134855 | Humana |
| forward primer 5′-CTTCTCAAACTCCAGCACAATG-3′ | | |

reverse primer 5′-AGTACCTTCGGGAGCAGAT-3

*CBS* NM_000071.3 Humana

forward primer 5′- CCGACTCAGTGCGGAACTACAT-3′

reverse primer 5′- GTTCCCAAGCGTCACCATTCC-3

*CYP3A43* NM_001278921.2 Humana

forward primer 5′- ACAGAGCTGAAAAAGAAAAC-3′

reverse primer 5′- TAGAACAAAATAGTTCCCAG-3

*KRT23* NM_001282433.2 Humana

forward primer 5′- AATACCCGCCTGATGTCGTG-3′

reverse primer 5′- TGAAGCTGTGTCCGGAGTTC-3

*HDAC1* NM_004964.3 Humana

forward primer 5′- GACGGACCGACTGACGGTAG 3′

reverse primer 5′- ATTTCCAACATCCCCGTCGT 3’

*HDAC4* NM_006037 Humana

forward primer 5'-CTCATCAGTTGCCACTTCCACATA-3'

reverse primer 5'-AGCAATTCATCTGTGCTTTCATGTC-3'

*HDAC6* NM_001321225.2 Humana

forward primer 5'-TGGCGGAGTGGAAGAACC-3'

reverse primer 5'- GTTCTGCCTACTTCTTCGCTG -3'

*HDAC8* NM_001166418 Humana

forward primer 5’- ATCTCAATGATGCTGTCCTGG-3’

reverse primer 5’- CATGATCTGGGATCTCAGAGG-3’

*HDAC9* NM_001204144 Humana

forward primer 5’- AGTAGAGAGGCATCGCAGAGA-3’

reverse primer 5’-GGAGTGTCTTTCGTTGCTGAT-3’

*HDAC11* NM_001204144 Humana

forward primer 5’-CGGCCAGCTTTGGGAGG-3’

reverse primer 5’-GGCCCATGAAGGTGATGTTG-3’

HIST1H2AB NM_003513 Humana

forward primer 5’-AACGACGAGGAGCTCAACAAGCTG-3’

reverse primer 5’-CTTGTGGTGGCTCTCGGTCTTCTT-3’

*ACTB* NM_001101 Humana

forward primer CCAGCCTTCCTTCCTGGGCAT

reverse primer AGGAGCAATGATCTTGATCTTCATT

### 4.14 Avaliação da expressão gênica

Para cálculo da expressão gênica, foi empregado o gene constitutivo: β-actina. A partir dos resultados de Ct (cycle treshold) obtidos, foram calculados os níveis de expressão relativa utilizando-se o método 2-ΔΔCt e os valores resultantes foram transformados em log2 para facilitar a visualização.

### 4.15 Detecção de citocinas

A quantificação de citocinas e quimiocinas (IFN-γ, TNF-α, IL17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, RANTES e IP - 10) foi realizada em amostras de sobrenadante de cultura de monócitos knockout ou tratados com compostos quimpicos e infectados in vitro com *Mtb*. Os ensaios de detecção foram realizados na plataforma multiplex usando o kit Magnetic Luminex Assay (R&D Systems a biotechne brand, Minneapolis, USA) analisado em um leitor de placas (Luminex Multiplexing Instrument - EMD Millipore, Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) de acordo com o manual instruções do fabricante. Todos os resultados foram calculados pelo software Milliplex Analyst 5.1® usando uma curva padrão individual para cada citocina / quimiocina.

### 4.16 siRNA knockdown

O knockdown por siRNA foi realizada com MISSION®siRNA Transfection Reagent (S1452, Sigma Aldrich) usando o Controle negativo universal MISSION® siRNA nº 1 (SIC001-10NMOL, Sigma Aldrich), além dos siRNAs para os genes alvos em específicos, sendo: Creb3l1 (NM_052854, Sigma Aldrich), Trim17 (NM_001024940, Sigma Aldrich), Cyyr1 (NM_052954, Sigma Aldrich) e Myo7b (NM_001080527, Sigma Aldrich) todos a 50nM. O protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante sem alterações, que resumidamente é: Os monócitos foram plaqueados em placas de 96 ($7,5x10^3$ células por poço) ou 24 ($3,5x10^4$ células por poço) poços com meio de cultura Dmem suplementado com 10% de soro fetal bovino, e após o tempo determinado para aderência foi adicionado o siRNA diluído anteriormente em meio de cultura puro e adicionado 3 ou 4 µl de reagente de transfecção a depender da placa a ser aplicado, onde 96

poços 3µl e 24 poços 4µl. O tempo de transfecção foi de 96 horas e durante esse período a placa foi incubada na estufa a 37°C e 5%$CO_2$. O silenciamento dos genes foi confirmado por RT-qPCR.

Para a linhagem THP-1 o mesmo procedimento foi usado mas os siRNAs foram utilizados a 5nM e o plaqueamento feito em placas de 96 poços foi de $1x10^4$ células por poço e $1x10^5$ células por poço em placas de 24 poços.

### 4.17 Avaliação de apoptose e necrose

Após o período de cultura, as células foram recuperadas utilizando PBS gelado, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e incubadas com FVS (BD Bioscience®) por 15 minutos no escuro e temperatura ambiente. Foram lavadas com 1 mL de tampão para marcação de anexina (BD Bioscience®) e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. As células foram então incubadas com Anexina V (BD Bioscience®) por 15 minutos a 4°C e depois lavadas com 1 mL de tampão de anexina. A aquisição das amostras foi realizada no FACS Melody (BD Bioscience®) alocado dentro do laboratório de biossegurança nível 3 (Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP, USP) e analisadas no software FlowJo V10 (BD Bioscience®).

Para análise, foram selecionadas células por tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) e células únicas (FSC-H vs FSC-A), separadas em células vivas (FVS-AnexinaV-), em necrose (FVS+AnexinaV-) e em apoptose (FVS-/+AnexinaV+). A seleção da população positiva foi realizada utilizando a estratégia de FMO (fluorescence minus one).

# Parte 1

Para identificar os fatores relacionados ao aumento da resistência do fígado em relação ao pulmão à infecção por *Mtb* observado no modelo experimental de tuberculose, o objetivo desta etapa do nosso estudo foi analisar *in silico* os dados gerados pela técnica de RNAseq. Visando a identificação de genes que podem estar envolvidos na resistência ou suscetibilidade, o perfil de ativação de células totais do fígado e de pulmão na progressão da infecção por *Mtb*(entre 14 e 19 dias) foram comparados.

Além disso, questionamos se os mecanismos epigenéticos estão relacionados à organização dos diferentes perfis relacionados à resposta à TB, uma vez que a epigenética define o perfil de expressão gênica (WEAVER et al., 2004; WEAVER, 2011; VINCI, 2014).

## 5. RESULTADOS (parte 1)

### 5.1 A abundância de transcritos em células totais de órgãos infectados com *Mtb*demonstra diferentes tipos de resposta à infecção

Buscando elucidar como o fígado respondeu mais eficientemente ao processo de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, trabalhamos os dados gerados pela técnica de RNAseq de células totais do fígado e pulmão. Por se tratar de amostras de órgãos distintos evidenciamos essa diferença através das nossas análises iniciais, na qual foi usado a PCA (Análise dos componentes principais) (Figura 3A). A PCA dos 18394 genes anotados resultou em grupos bem distintos ao considerarmos cada órgão na comparação, no qual observamos essa diferença ao avaliar 83,7% dos dados disponíveis. Destaca-se ainda, a nítida diferença entre as amostras de 14 e 19 dias do pulmão, indicando que esse órgão sofre mudanças bem mais radicais do que o fígado, e que podem estar relacionadas com a maior suscetibilidade desse órgão (Figura 3A).

Além disso, também utilizamos o heatmap para observar visualmente os clusters formados pelo padrão de expressão gênica do fígado e do pulmão. A Figura 3B mostra que há diferença na expressão gênica interórgãos em diferentes tempos, o que nos permite observar a formação de clusters compostos

por genes que exibem diferentes perfis de expressão gênica entre os órgãos, mostrando que realmente há uma resposta diferente entre eles ao processo de infecção. Baseados nessa análise inicial, caracterizamos a diferença de cada órgão através de vias enriquecidas com genes expressos especificamente em cada órgão, conforme mostram as figuras 3C e 3D.

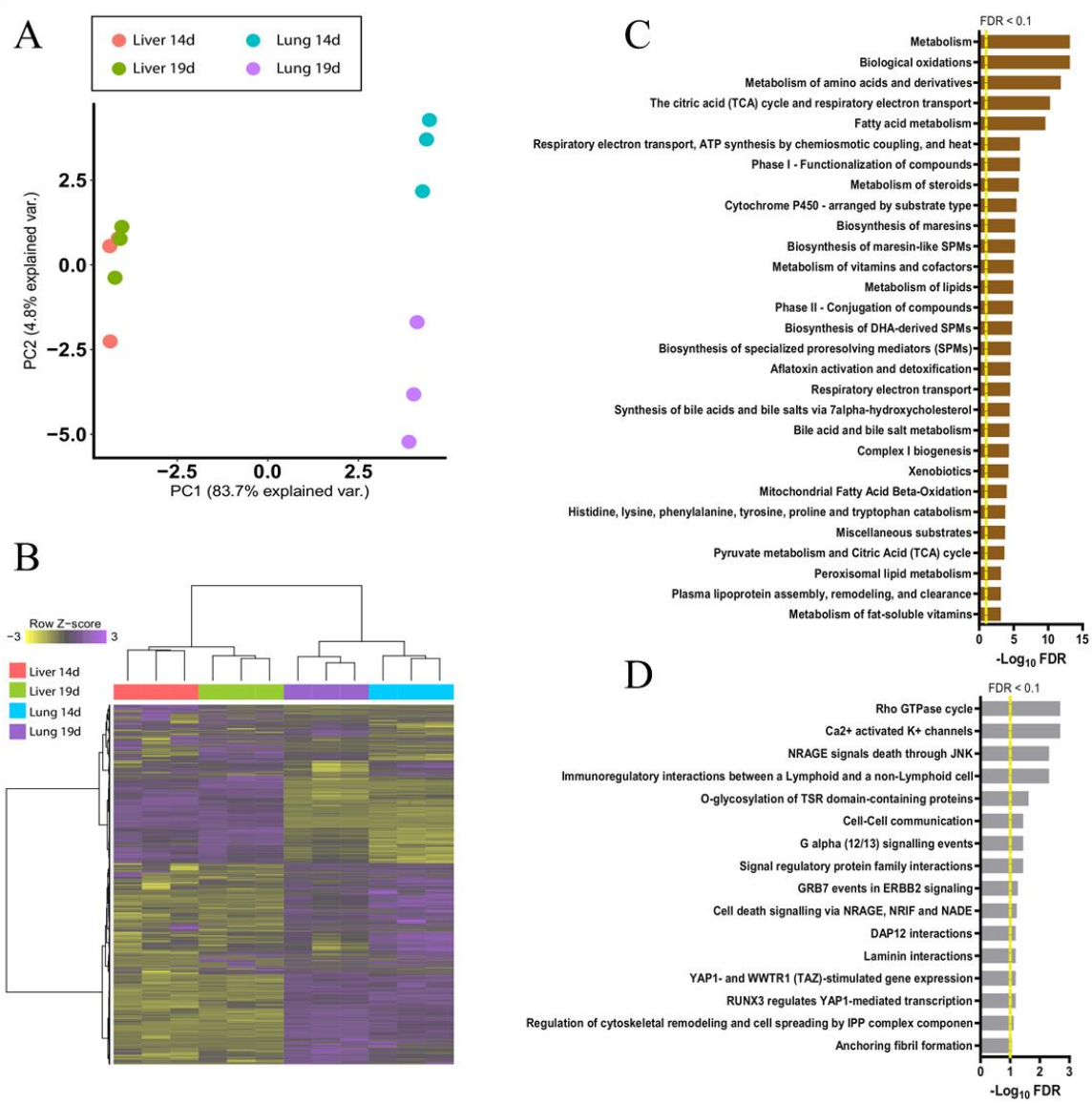



**Figura 3. Análise de dados transcriptômicos de células totais hepáticas e pulmonares de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. (A)** Análise de componentes principais (PCA). Os dados de expressão de todos os 18.394 dos genes anotados foram utilizados para esta análise. Fígado 14d - genes expressos no dia 14° após a infecção por *Mtb.* (vermelho), fígado 19d - genes expressos no dia 19° após a infecção por *Mtb*. (verde), pulmão 14d - genes expressos no dia 14° após a infecção por *Mtb*. (azul) e pulmão 19d - genes

expressos no dia 19° após a infecção por *Mtb*. (roxa). **(B)** Heatmap dos genes anotados para cada órgão nos dois dias avaliados (14d-19d) infectados com *Mtb*. **(C)** Vias e mecanismos enriquecidos no banco de dados online do ToppGene usando genes anotados da análise inicial do fígado. **(D)** Vias e mecanismos enriquecidos no banco de dados online do ToppGene usando genes anotados da análise inicial do pulmão.

### 5.2 Meta-assinatura de diferentes órgãos de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis*

Com o intuito de identificar a assinatura transcricional do pulmão, principal órgão afetado pela tuberculose, e do fígado, órgão que mostrou responder melhor à infecção por *Mtb*, analisamos o perfil de expressão gênica de células totais de cada órgão. Com análise estatística baseada em modelo linear com um FDR <0,05 alcançamos os genes diferencialmente expressos (DEGs).

Comparamos o perfil de expressão gênica do 19° dia ao 14° dia após infecção de cada órgão separadamente através das listas de genes diferencialmente expressos obtidas, as quais filtramos quanto ao Fold change ≥1,3 ou ≤ -1,3 além do P value adj. <0,05. Com isso, tivemos 737 genes diferencialmente expressos no pulmão (Figura 4A) e 631 no fígado (Figura 5A), o que comprovou que o tempo pós-infecção influencia de maneira diferente o perfil de expressão gênica nos dois órgãos avaliados.

Com o intuito de caracterizar as assinaturas transcricionais baseadas em análises de expressão diferencial, avaliamos se os padrões de genes expressos no fígado ou no pulmão nos dias 14 e 19 poderiam segregar diferentes grupos. Para tal, aplicamos um agrupamento hierárquico não supervisionado em dados de expressão de DEGs altamente significativos entre todos os grupos. A análise resultou em dois grupos distintos em cada órgão, os quais apresentaram um set de genes expressos de maneira tempo dependente como mostrado nas Figuras 4B e 5B.

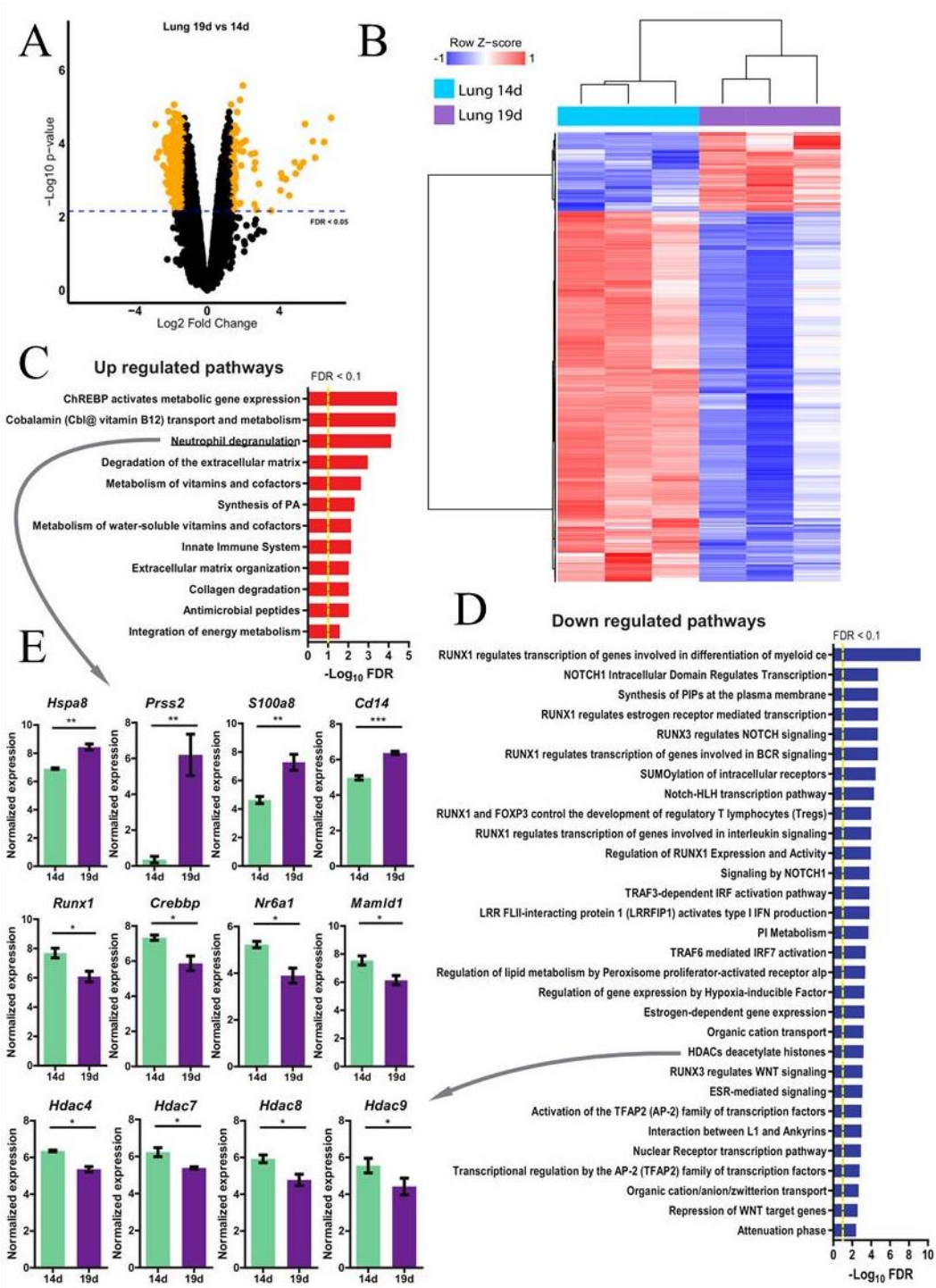



**Figura 4. Assinatura transcricional durante a infecção por *Mtb.* (Pulmão). (A)** Análise de expressão diferencial entre estados de infecção por Mtb. (19d-14d). O número de genes diferencialmente expressos (DEGs) é mostrado, pelo que os pontos laranja nas parcelas do vulcão representam DEGs usando um FDR <0,05. **(B)** Heatmap de genes expressos diferencialmente (DEGs) resultantes da análise de amostras de pulmão comparando 19d-14d após a infecção por *Mtb*. Onde azul significa repressão e expressão vermelha. **(C)** Vias e mecanismos enriquecidos no banco de dados on-line da ToppGene usando genes diferencialmente expressos, regulamentados, a partir de análises de amostras de pulmão. FDR

<0,1 **(D)** Vias mecanismos enriquecidos no banco de dados on-line da ToppGene usando genes diferencialmente expressos, regulados para baixo, a partir de análises de amostras de pulmão. FDR <0,1. **(E)** Genes individuais que compõem as vias enriquecidas (comparados nos dias 19d e 14d após a infecção por *Mtb*.). Com base na contagem normalizada de dados brutos. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 6.0. O teste t foi utilizado para avaliar diferenças entre genes independentes.

Para compreender como as diferenças na assinatura gênica de cada órgão interferem na resposta à infecção, realizamos o enriquecimento das vias moleculares utilizando os DEGs do pulmão ou do fígado com o auxílio de bancos de dados online. Observamos vias distintas relacionadas à resposta imunológica que podem auxiliar a explicação da eficiência das diferentes respostas à infecção por *Mtb*. No pulmão vimos que no 19° dia após a infecção, há uma upregulação de genes que caracterizam perfil inflamatório, uma vez que as vias enriquecidas são características de resposta imune relacionada à eliminação do patógeno.

Desta forma, ressaltamos mecanismos como a degranulação de neutrófilos, que além de serem as primeiras células recrutadas no processo inflamatório, possuem diferentes tipos de grânulos, dentre eles, há os que estão envolvidos na reorganização da matriz extracelular (MEC). A reorganização da MEC também foi destacada em outras vias nas nossas análises, conforme mostrado na Figura 4C. O perfil de expressão, produção e secreção de grânulos de neutrófilos é controlado a nível transcricional, por isso evidenciamos significativas modulações de genes como o PRSS2 na Figura 4E (ARNLJOTS et al., 1998; TURNER et al., 2014).

Ainda, em relação ao pulmão, foi observado que as vias downreguladas são quase por completo relacionadas a mecanismos de sinalização e ativação de expressão gênica (Figura 4D). Vias como as do Notch, Traf e WNT são caracterizadas por apresentar cascata de ativação e desativação de diversas proteínas (KOPAN; ILAGAN, 2009; XIE, 2013; NUSSE; CLEVERS, 2017). Em grande parte os mecanismos de sinalização têm como objetivo 3 funções: degradação ou mudança estruturais em proteínas já sintetizadas e modificações genicas, assim podemos observar que no pulmão no 19° dia após a infecção, devido repressão da expressão de elementos que compõem cascatas de

sinalizações, a expressão de genes da resposta imune pode estar comprometida (Figura 4D).

E em relação a repressão da expressão gênica, destacamos o enriquecimento de vias relacionadas a modificações epigenéticas nitidamente alteradas. Como demonstrado na Figura 4D, houve regulação na expressão de genes que codificam as seguintes enzimas epigenéticas: Hdac 4, 7, 8 e 9, que estão diretamente ligadas ao controle da expressão gênica (Figura 4E) (GREWAL; MOAZED, 2003; GIBNEY; NOLAN, 2010; PARK et al., 2019).

Em relação ao enriquecimento de vias feito com os DEGs encontrado nas análises do fígado (Figuras 5C, 5D), podemos observar que há uma espécie de controle metabólico. Em relação as vias upreguladas no fígado, mostradas na Figura 5C, foi destacado a expressão de genes relacionados a biossíntese de Sulfato de Dermatan, degradação lisossomal de glicoproteínas, controle de insulina, modificações pós traducionais, etc.

Já em relação às vias downreguladas mostrados na Figura 5D, foi encontrado mecanismos relacionados ao citocromo P450 que está envolvido na oxidação de diversos outros elementos como xenobióticos, oxidações biológicas, biossíntese de maresinas, ácidos graxos etc (GUENGERICH, 2006). Inclusive, na figura 5E, onde mostra a modulação de alguns dos genes que compõem as vias enriquecidas, destacamos aqui membros da família cytochrome P450 (CYP) que tiveram sua expressão reprimida no 19° dia após infecção, quando comparado ao 14° dia, são eles: Cyp3a11, Cyp3a25, Cyp3a59 (P.B. DANIELSON, 2005).

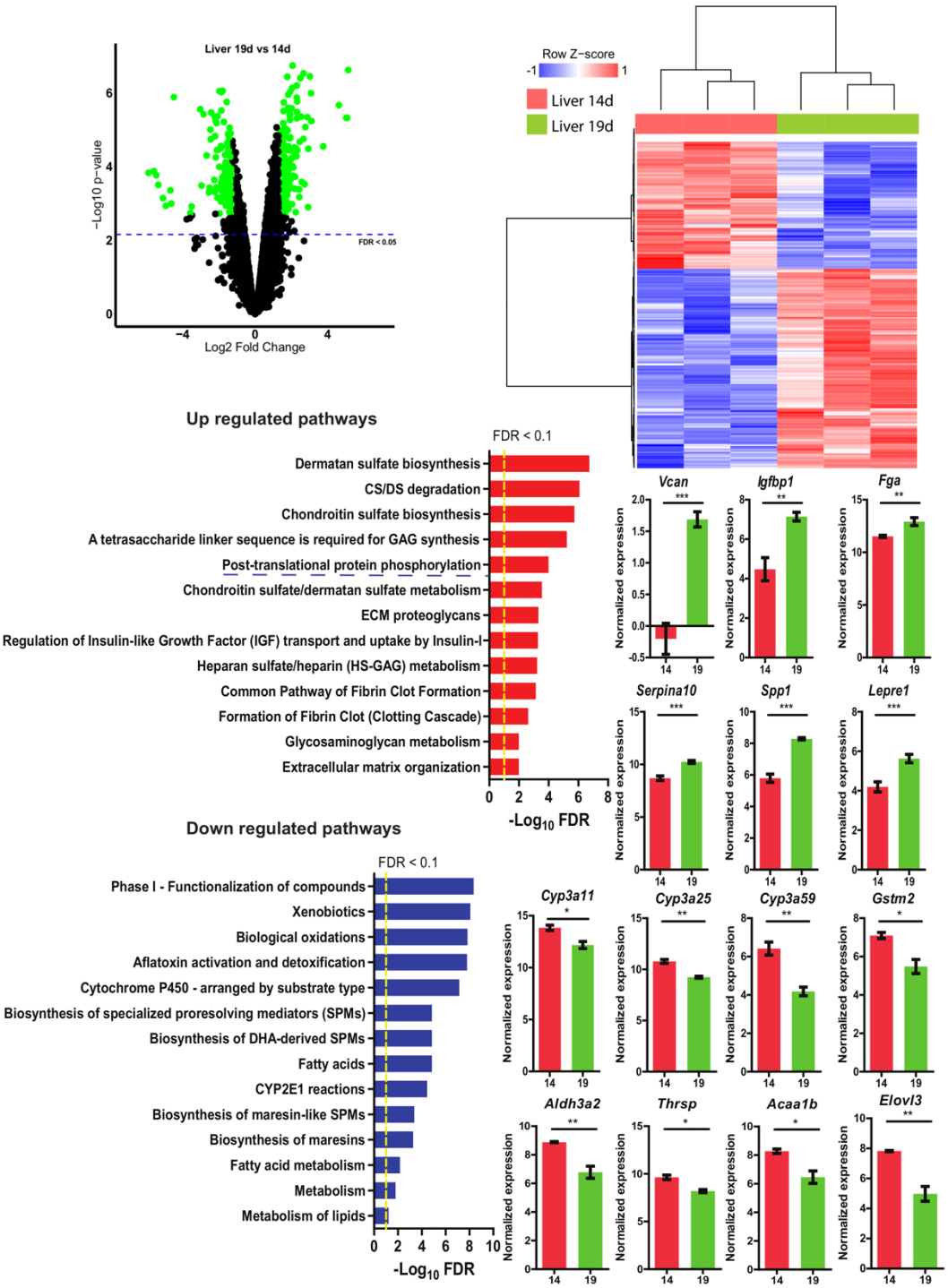



**Figura 5. Assinatura transcricional durante a infecção por *Mtb*. (Fígado).** (A) Análise de expressão diferencial entre estados de infecção por *Mtb*. (19d-14d). O número de genes diferencialmente expressos (DEGs) é representado, pelos pontos verdes no Volcano plot usando um FDR <0,05. (B) Heatmap de genes expressos diferencialmente (DEGs) resultantes da análise de amostras de fígado comparando 19d-14d após a infecção por *Mtb*. Onde azul significa repressão e vermelho significa expressão. (C) Vias e mecanismos enriquecidos no banco de dados on-line da ToppGene usando genes diferencialmente expressos, upregulados, a partir de análises de amostras de fígado. FDR <0,1 (D) Vias e mecanismos enriquecidos no banco de

dados on-line da ToppGene usando genes diferencialmente expressos, downregulados, a partir de análises de amostras de fígado. FDR <0,1. (E) Genes individuais que compõem as vias enriquecidas (comparados nos dias 19d e 14d após a infecção por *Mtb*.). Com base na contagem normalizada de dados brutos. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 6.0. O teste t foi utilizado para avaliar diferenças entre genes independentes.

### 5.3 A comparação entre as meta-assinaturas de órgãos de animais infectados revela vias alteradas que podem auxiliar na explicação da melhor eficiência hepática na infecção por *Mtb*

O conhecimento de como o fígado responde mais eficazmente, quando comparado ao pulmão, diante do processo de infecção por *Mtb*, pode auxiliar a identificação de biomarcadores, assim também comparamos os dados de maneira interórgãos, no qual usamos os dados do 19° dia do fígado em relação aos dados do pulmão, onde subtraímos o 14° dia do pulmão (19d/14d), a intenção dessa maneira de comparação é absorver ao máximo os efeitos causados apenas pela infecção, já que os órgãos possuem diferenças fisiológicas e metabólicas naturais.

A comparação entre os órgãos nos permitiu identificar 2190 genes diferencialmente expressos, a figura 6A representa esses DEGs com os seguintes parâmetros: P<0,05, Log2 Fold Change. O heatmap da figura 6B mostra o quão é evidente a diferença entre as respostas do fígado e do pulmão baseado na expressão de genes que foram expressos ou reprimidos o que nos permite agrupa-los hierarquicamente.

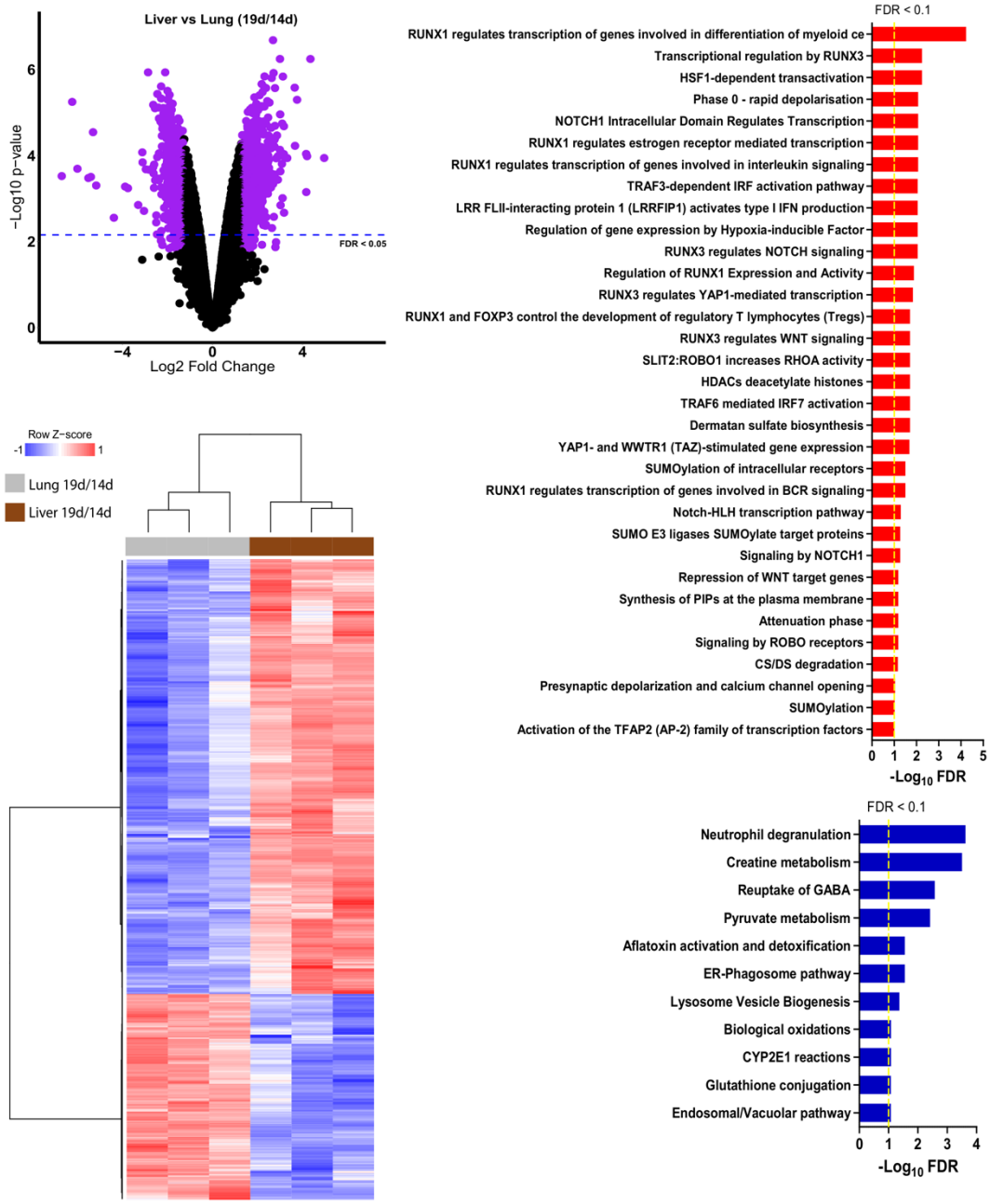



**Figura 6. Comparação entre a assinatura transcricional do fígado e o pulmão (19d / 14d). (A)** Análise de expressão diferencial entre estados de infecção com *Mtb.* Pulmão vs fígado (19d / 14d). O número de genes diferencialmente expressos (DEGs) é representado, pelos pontos roxos no Volcano plot usando um FDR <0,05. **(B)** Heatmap de genes diferencialmente expressos (DEGs) resultantes da análise de amostras de fígado vs pulmão comparando 19d / 14d após a infecção por *Mtb*. Onde azul significa repressão e vermelho expressão. **(C)** Vias e mecanismos enriquecidos no banco de dados on-line da ToppGene usando genes diferencialmente expressos, upregulados, a partir da análise da amostra hepática versus pulmonar. FDR <0,1 **(D)** Vias e mecanismos enriquecidos no banco de dados on-line do ToppGene usando genes

diferencialmente expressos, downregulados, da análise de amostras de fígado versus pulmão. FDR <0,1.

Com os genes Up e downregulados que caracterizam a resposta imune de cada órgão fizemos mais uma vez o enriquecimento de vias no intuito de conhecer quais mecanismos moleculares foram alterados, e conforme mostram as figuras 6C e 6D importantes vias foram identificadas, como as vias de sinalização NOTCH e TRAF, vimos também o fator de transcrição RUNX envolvido em diversos mecanismos.

Além disso, foram destacados mais uma vez, mecanismos epigenéticos upregulados (Figura 6C), no entanto dessa vez observamos que a diferença no perfil epigenético também ocorre entre diferentes órgãos, o que nos mostra que enzimas epigenéticas estão envolvidas nos processos de resistência e suscetibilidade.

### 5.4 A metanálise revela genes diferencialmente expressos relacionados com a resistência ao desenvolvimento da tuberculose

Baseado nos resultados da análise entre fígado e o pulmão comparamos nossa lista obtida de genes diferencialmente expressos com os DEGs de trabalhos que compõem a literatura com o intuito de verificar o que há em comum entre os resultados obtidos por ambos. Utilizando a plataforma OMICC confrontamos nossos dados com os dados de trabalhos que utilizaram amostras de sangue total de humanos diagnosticados como pacientes com tuberculose pulmonar ativa ou pacientes com tuberculose latente.

Demonstramos o que há em comum entre nossos resultados e a literatura através de gráficos de Venn (Figura 7A e 7B). Relacionamos os seguintes grupos: Mouse/Orthologue, que se trata de genes humanos ortólogos aos de camundongos obtidos em nossa análise fígado/pulmão, Tb. P (Human) que são genes diferencialmente expressos em amostras de paciente com tuberculose pulmonar ativa) e Tb. L (Human) que é composto por genes diferencialmente expressos em amostras de paciente com tuberculose latente).

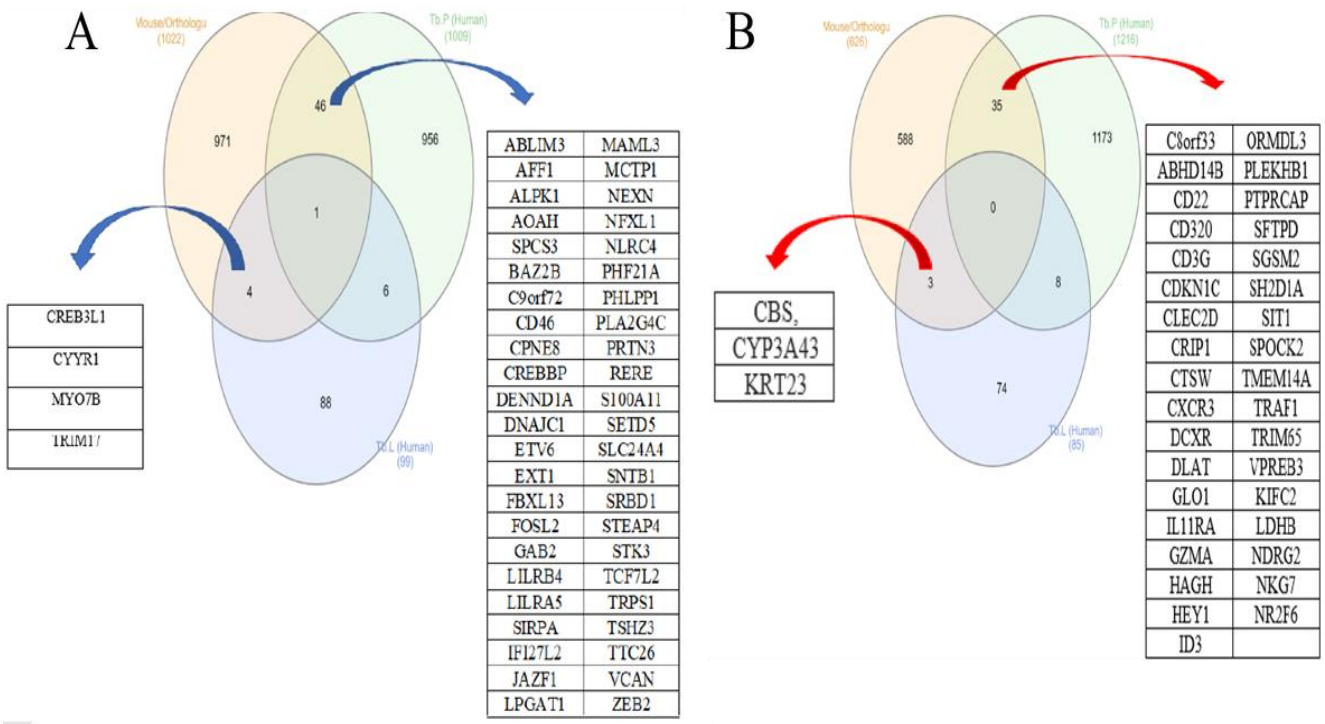



**Figura 7. Metanálise.** Diagrama de Venn mostrando os genes comuns detectados entre nossas análises, fígado vs pulmão (19d / 14d), e dados públicos derivados de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar ativa ou tuberculose latente. (A) Intersecção entre genes upregulados. (B) Interseção entre genes downregulados.

A intersecção entre os grupos nos revelou genes que podem estar relacionados à resistência na tuberculose, como visto na figura 6a onde observamos genes upregulados no fígado que também foram upregulados em amostras de sangue total de pacientes latentes, sendo eles: *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17*. Além disso também observamos uma lista de 46 genes que foram diferencialmente expressos nas nossas amostras e nas amostras de pacientes com tuberculose pulmonar ativa demonstradas em dados públicos (Figura 7A). Também, observamos genes que foram downregulados entre os grupos, e conforme mostra figura 7B os genes *Cbs, Cyp3a43, Krt23* compõe a intersecção entre os genes do fígado nos camundongos e os pacientes latentes, o que pode nos indicar que a supressão desses genes possivelmente está envolvida no controle do desenvolvimento da tuberculose. Na figura 7B também mostramos uma lista de 35 genes que foram downregulados nas nossas amostras do fígado e na tuberculose pulmonar ativa, indicando um papel na infecção por *Mtb*.

## 6. DISCUSSÃO (parte 1)

Apresentamos dados relativos à abordagem experimental na qual o conceito utilizado é o chamado pesquisa por “data-driven”. Este conceito é caracterizado em extrair dados de um experimento sem filtrar ou determinar categorias/classes do que será analisado, deixando que esses dados guiem as decisões a serem tomadas (GIL et al., 2016).

O grande volume de dados maciços gerados por tecnologias “ômicas” tem servindo de base para a pesquisa com o tradicional foco na hipótese, por isso, é contundente afirmar que os modos de pesquisa “data-driven” e o “hypothesis-drive” aliados podem criar caminhos e, mais que isso, oferecer estratégias para percorrê-los (CARROLL; GOODSTEIN, 2009). Dessa maneira, escolhemos o sequenciamento de RNA (RNAseq) como instrumento de “data-driven” para trabalhar os dados obtidos de transcriptoma e a partir daí selecionar os caminhos para nossas hipóteses.

A técnica de RNAseq tem auxiliado no desenvolvimento de um conhecimento mais aprofundado sobre a tuberculose, e podemos ver isso na literatura em trabalhos como o que mostra a resposta a nível transcricional de cepas de *Mtb* resistentes e multirresistentes a antibióticos (BRIFFOTAUX; LIU; GICQUEL, 2019); em trabalhos em que essa técnica ajuda a compreender a interação *Mtb* e o hospedeiro (LEISCHING et al., 2017); ou até mesmo para identificação de mecanismos imunológicos na tentativa de otimizar diagnósticos (BUREL et al., 2019). Assim, acreditamos que o sequenciamento de RNA pode nos auxiliar a explicar nosso experimento prévio, em modelo animal, no qual a infecção por *Mtb*desenvolveu-se de forma diferente no fígado, quando comparado ao pulmão e ao baço, conforme mostra a figura 1.

O fígado e o pulmão têm as suas funções fisiológicas bem conhecidas, e a consequente importância para o organismo é evidente. No entanto, devido ao fato de realizarem diferentes atividades meltabólicas e fisiológicas, é de se esperar que respondam de maneira diferente a um processo infeccioso, e conseguimos observar essa diferença a nível transcricional. Nossa análise dos componentes principais (PCA) mostra estatisticamente que, baseado nos genes expressos, há uma nítida diferença entre os órgãos. Também, há diferença de

entre as amostras de um mesmo órgão quando os tempos pós infecção, 14 e 19 dias, são comparados, evidenciando que o tempo influencia no padrão de expressão gênica (Figura 3A).

A expressão gênica que caracteriza essa diferença entre as respostas do fígado e do pulmão fica também evidente quando trabalhamos os dados de maneira a apresentá-los em um heatmap, conforme apresentado na Figura 3B. Nossos dados refletem o que a literatura mostra quando comparamos o perfil de expressão gênica de dois órgãos diferentes seja eles em humanos (SON et al., 2005; UHLEN et al., 2016) ou também em organismo modelo (SCHAUM et al., 2018).

Baseado no enriquecimento de vias, utilizando apenas os genes que foram anotados pelas análises baseadas em amostras do fígado e pelo pulmão, é possível notar as funções básicas de cada órgão, onde na figura 3C, referente ao fígado, vimos em sua grande maioria vias relacionadas a metabolismo enquanto que na figura 3D, referente ao pulmão, o que observamos são vias de regulação, ativação e comunicação entre as células, o que de fato pode já ser um efeito da presença de micobactéria.

No intuito de aprofundar o conhecimento nos efeitos causados pela infecção em cada órgão avaliado, caracterizamos a resposta de cada um à infecção, baseados em seus genes diferencialmente expressos (DEGs) no intervalo entre o 14° e o 19° dia. Estes dias foram escolhidos por ser exatamente o ponto em que a resposta à micobactéria se diferencia entre os 2 órgãos. Comparamos o perfil de expressão gênica do 19° dia ao 14° dia de cada órgão.

Em relação ao pulmão foram obtidos 737 genes diferencialmente expressos (Figura 4A), o que mostra que há também uma diferença no perfil transcricional intraórgão causada pelo tempo de infecção. O agrupamento hierárquico da figura 4B mostra a formação de dois perfis diferentes, e vale ressaltar que no 19° dia a infecção no pulmão continua em ascensão (Figura 1), assim é válido buscar entender quais vias e mecanismos estão sendo alterados (GHIGNA et al., 2012; BADLEY et al., 2013; REAMON-BUETTNER et al., 2019).

No pulmão, o perfil inflamatório foi evidente, pois há upregulação de vias relacionadas à degranulação de neutrófilos e consequente alteração da organização da matriz extracelular (Figura 4C). Além disso, houve aumento da expressão de alguns genes que compõem essas vias (Figura 4E).

De maneira complementar, na figura 4D observamos diversas vias de sinalização downreguladas que podem estar contribuindo para esse perfil inflamatório. Como por exemplo, a via de sinalização NOTCH, que já foi vista tendo ligação direta com a indução da expressão da citocina antinflamatória IL-10 em macrófagos (WONGCHANA et al., 2018); assim como a via WNT, cujo principal componente, a β-catenin, quando ativada desencadeia o funcionamento da PI3K/Akt, tendo como consequência a inibição da inflamação mediada pelo reconhecimento de PAMP via TLR4 presente em células dendríticas (KE et al., 2013).

Dentre as vias down reguladas (Figura 4D) também se destacam fatores de transcrição da família de RUNX, que tem o papel ativador da transcrição de genes relacionados à proliferação celular, diferenciação, memoria epigenética, reparo de DNA, inflamação e apoptose (ASHE et al., 2021). Na literatura não há muita informação do papel desse fator de transcrição na tuberculose, no entanto há trabalhos que mostram sua atividade em outras doenças, tais como: mieloma (ZHOU et al., 2019), doenças hematológicas (SOOD; KAMIKUBO; LIU, 2017), câncer de mama (LINGALA et al., 2010), neurofibromatose (HALL et al., 2019) etc. O que faz dessa família de fatores de transcrição um promissor alvo para investigações futuras na TB.

Em contrapartida ao pulmão, observamos no fígado um perfil menos inflamatório e mais homeostático. Foram obtidos 631 DEGs (Figura 5A) quando compramos o 19° dia ao 14° dia de infecção no fígado, essa diferença no perfil de expressão gênica foi demonstrada no heatmap da Figura 5B, e fica claro que no fígado o tempo de infecção também modulou o perfil transcricional. Esse perfil anti-inflamatório provavelmente se deve ao balanço entre rotas energéticas, metabolismo, degradações etc que vemos nas vias up (Figura 5C) e downreguladas (Figura 5D) e nos genes que as compõem (Figura 5E). Esse perfil menos inflamado pode ser caracterizado pela upregulação de vias como

“Biossíntese de dermatan sulfato” (Figura 5C), que se trata de um glicosaminoglicano com atividade anti-inflamatória (TROWBRIDGE; GALLO, 2002), já vista também em modelo animal para estudos de colite (BELMIRO et al., 2009). Vias como “CS/DS degradation” que fazem parte da homeostase celular como parte de um processo maior de degradação lisossomal de glicoproteínas também foi upregulada, indicando fazer parte do perfil menos inflamado característico do fígado (WINCHESTER, 2005).

Genes relacionados ao metabolismo de glicose e ácidos graxos foram downregulados no fígado conforme mostra Figura 5D. Interessantemente, a *Mtb*. possui a capacidade de utilizar glicose e ácidos graxos para seu crescimento (EHRT; SCHNAPPINGER; RHEE, 2018), portanto, se houver menos disponibilidade destes metabólitos no tecido, esta poderia ser uma via de controle de crescimento bacteriano. Além disso, genes relacionados ao mecanismo do metabolismo de lipídeos, que possuem importância relacionada à resposta imune do hospedeiro (QUEIROZ; RILEY, 2017), também foram reprimidos, mostrando que no fígado, a *Mtb*não encontra um ambiente favorável ao seu crescimento. Portanto os DEGs que compõem esse balanço de rotas e vias no fígado (Figura 5E) se mostram promissores para futuras investigações.

Compreendendo melhor os motivos que levam o fígado a controlar melhor a infecção por *Mtb*, acreditamos que esse órgão possa servir como base para identificação de novos biomarcadores relacionados à proteção ou suscetibilidade à tuberculose, assim como fez KORF et al., 2009, que utilizando modelo animal identificaram os “Liver X receptors” (LXRs) como modulares da inflamação e que tem estreita relação com células pulmonares no que eles acreditam ser uma função até então desconhecida para esses receptores nucleares em um mecanismo de resistência à infecção por *Mtb*.

Assim, acreditamos ser válida a comparação interórgãos, e resolvemos trabalhar nossos dados de transcriptoma comparando o fígado com o pulmão justamente para poder visualizar a diferença entre esses órgãos que respondem de maneira tão distinta a mesma infecção. Eliminando ao máximo a diferença natural entre os órgãos buscamos observar apenas os efeitos causados pela infecção, e diante disso obtivemos 2190 genes diferencialmente expressos

(Figura 6A). Agrupando os genes que formam o perfil transcricional de cada órgão de maneira hierárquica conseguimos observar perfis diferentes entre os órgãos (Figura 6B).

Baseado nas vias enriquecidas podemos observar que a inflamação influencia a resposta biológica de um órgão a um agente infeccioso, provavelmente, através da ativação de vias de sinalização (FANG et al., 2017). Em nosso trabalho temos essa diferença de vias de sinalização como a principal diferença entre os órgãos. A figura 6C mostra vias como NOTCH, TRAF e WNT sendo moduladas de maneira upreguladas, além de diversos mecanismos tendo membros da família RUNX como o fator de transcrição responsável pela ativação da transcrição. A figura 6D mostra vias que foram downreguladas no fígado quando comparado ao pulmão indicando estarem envolvidas no controle de infecção.

Ainda sobre as vias upreguladas (Figura 6D), destacamos também o fato da epigenética se mostrar atuando como parte da assinatura transcricional através de vias enriquecidas como “HDACs deacetylate histones”. Vale ressaltar que no pulmão também observamos o enriquecimento de vias relacionadas a mecanismos epigenéticos, porém de maneira downreguladas (Figura 3D). Assim, acreditamos que a epigenética está ligada diretamente na modulação das diferentes respostas e consequentemente influenciando na eficiência da mesma.

Nossos resultados ainda corroboram a literatura onde há resultados que mostram o papel da epigenética na tuberculose, tais como: modulando a resposta imune através da regulação da expressão das Metalloproteinase-1 e -3, influenciando na resposta antibacteriana através da metilação (VERMA et al., 2017), ou como demonstrado por SENGUPTA et al., 2017, no qual mostraram a capacidade da proteína mycobacteriana esxL de inibir a expressão de moléculas de MHC II, em macrófagos, através da indução da hipermetilação da região promotora do gene que o codifica. CHANDRAN et al., 2015 demonstraram em seu trabalho a capacidade da *Mtb*em atenuar a resposta imune do hospedeiro através da supressão da expressão do gene IL-12B através da modulação da HDAC1.

Realizamos uma metanálise utilizando OMiCC Compendia Commons (OMiCC; https://omicc.niaid.nih.gov/) (SHAH et al., 2016), comparando nossos dados de expressão genica em camundongos, do fígado comparado ao pulmão, com os dados públicos de expressão gênica de humanos diagnosticados com tuberculose ativa ou latente, no intuito de identificar genes comumente expressos entre diferentes organismos infectados com o mesmo patógeno. A comparação entre meta-assinaturas é uma estratégia já vista na literatura (BLANKLEY et al., 2014, 2016), inclusive confrontando dados de humano e camundongos (ROWLEY et al., 2011; XU et al., 2017), com o mesmo intuito que o nosso de buscar novos biomarcadores na resposta a infecção a *Mtb*(WANG et al., 2018).

Diante disso, a intersecção entre nossos DEGs e os públicos em banco de dados apresentou uma lista de 46 genes upregulados (Figura 7A) e uma lista de 35 genes downregulados (Figura 7B) quando comparado com dados de Tb pulmonar, isso nos mostra que esses genes possuem papel importante no processo de infecção, uma vez que os mesmos foram modulados tanto em condições onde a infecção foi melhor controlada, no caso no fígado do camundongo, como também em amostras de sangue de pacientes com tuberculose ativa, o que nos indica que há uma tentativa de controle da proliferação do patógeno, o que os torna genes passíveis de investigação mais aprofundada.

Confrontamos também nossas análises com dados de amostras de pacientes diagnosticados com tuberculose latente, a ideia dessa comparação é observar se há genes expressos comumente em amostras de pacientes considerados resistentes à infecção, e assim identificar possíveis biomarcadores relacionados à resistência (ILIEVSKA-POPOSKA et al., 2018; MÖLLER et al., 2018; LU et al., 2019). A intersecção nos mostrou que há 4 genes upregulados (Figura 7A) e 3 genes downregulados (Figura 7B).

Temos assim uma lista de 7 genes no total, no qual todos já foram descritos na literatura, onde: o *Creb3l1*, cAMP responsive element binding protein 3like 1, é descrito como um supressor de metástase tendo sua expressão alterada entre diferentes tipos de câncer (LIU et al., 2018b). O gene *Cyyr1*, cysteine and tyrosine-rich protein 1, é normalmente expresso em células que

pertencem ao sistema de captação e descarboxilação do precursor de amina, que são células que possuem ligação com o desenvolvimento de tumores neuroendócrinos, esse é um gene pouco estudado o que nos limita o acesso a informações funcionais (TUMORS, 2018). Em relação ao *Myo7b*, trata-se de uma miosina com funções envolvidas na comunicação célula-célula e trocas de solutos (LI et al., 2017). O *Trim17* é membro de uma família de receptores que tem atividade ligada a processos de autofagia seletiva (MANDELL et al., 2017). Sobre a intersecção entre os genes downregulados (Figura 7B), temos o *Cbs*, cystathionine beta-synthase, um gene cuja repressão foi vista como necessária para homeostase através do balanço de citocinas moduladas epigeneticamente (BEHERA et al., 2018).

O *Cyp3a43*, membro da subfamília cytochrome P3A (CYP3A), tem sido descrito na literatura como integrante no processo de metabolização de drogas, além de também servir como marcador em hepatocarcinoma e estar ligado ao desenvolvimento de câncer de próstata (HAN et al., 2015; WANG, 2018). Por fim temos o gene *Krt23*, Keratin23, que segundo a literatura possui importante ligação com o carcinoma de cólon, uma vez que está altamente expresso nesse tipo de câncer, enquanto em células normais do mesmo tecido sua expressão é ausente (HAHN et al., 2013; BROUSSARD et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

Importante ressaltar que nesta lista de 7 genes, todos eles possuem pouca ou nenhuma função/atividade relacionada a tuberculose descrita. Sendo assim, com este trabalho identificamos 7 potencias marcadores que serão explorados nos próximos resultados apresentados. Concluímos, nesta parte do trabalho, que as diferenças na resposta do fígado e do pulmão, quanto a resposta à tuberculose, é um indicador que elementos da resposta imune ou fisiológica dos dois órgãos atuam na resolução da infecção de forma relacionada à resistência, no caso do fígado, e susceptibilidade, no caso do pulmão. Se estes elementos indicados mostrarem-se, nos passos de validação, como alvos relacionados à resistência ou susceptibilidade, poderemos sugerir alvos para terapia ou prognóstico da doença.

Buscando entender mais sobre a relação entre o hospedeiro e a bactéria causadora da tuberculose, alguns modelos animais de estudo foram utilizados

(SUBBIAN et al., 2012; SCANGA; FLYNN, 2014; LEEUWEN; SAR; BITTER, 2015; GAO et al., 2018) e o camundongo é o modelo mais proeminente devido à grande variedade de ferramentas e informações disponíveis (CRUZ et al., 2010; DHAR; MCKINNEY, 2010; LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2010; GANDOTRA et al., 2011; DRIVER et al., 2012; GOODSMITH et al., 2015).

Dentre os diversos tipos de estudos realizados destacam-se aqueles que demonstram maneiras de escape do *Mtb* do sistema imune (QUEVAL et al., 2017; WANG et al., 2019; DOLASIA; NAZAR; MUKHOPADHYAY, 2021). A modulação transcricional é uma das vias de escape usada pela *Mtb*para evadir da resposta imune do hospedeiro, inclusive por meio da modulação de elementos epigenéticos, mostrando que há a possibilidade de reprogramação na expressão gênica nas células imunes causada pela micobacteria, que culminaria em sua sobrevivência no meio intracelular (KINCAID; ERNST, 2003; SENGUPTA et al., 2017).

A observação do perfil transcricional de células imunes quando em contato com a *Mtb* em diferentes cenários pode se tornar uma peça fundamental nesse quebra cabeça que é a tuberculose. A análise do transcriptoma vem se mostrando uma importante aliada na compreensão de sistemas biológicos uma vez que é usada para predizer alterações em níveis e funções proteicas, já que é possível identificar todos os tipos de RNA transcritos e quantificar os seus níveis em diferentes situações, inclusive no percurso do desenvolvimento de doenças (KARAHALIL, 2016).

Portanto, por meio da técnica de RNAseq, foi identificado que os genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b, Cbs, Krt23 e Cyp3A43* estão diferencialmente expressos em fígado e pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, o que sugere seu possível papel no controle da infecção. Desta forma, estes genes foram avaliados na Parte 2 deste trabalho, de forma a comporem uma bioassinatura com valor preditivo na tuberculose humana.

# Parte 2

# 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO (parte 2)

## 7.1 A infecção por *Mtb* modula a expressão dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* em monócitos humanos

Para entender se os genes identificados *in silico* estão envolvidos no controle da tuberculose, prosseguimos com a validação *in vitro*. Conforme indicado na etapa anterior deste projeto, identificamos 7 genes envolvidos no processo de desenvolvimento da tuberculose, *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Cyp3a43 e Krt23*. Ressaltamos que todos estes genes, apesar de já descritos na literatura com funcionalidades relacionadas à patogênese de diferentes doenças, principalmente o câncer, possuem pouca ou nenhuma atividade descrita relacionada à tuberculose.

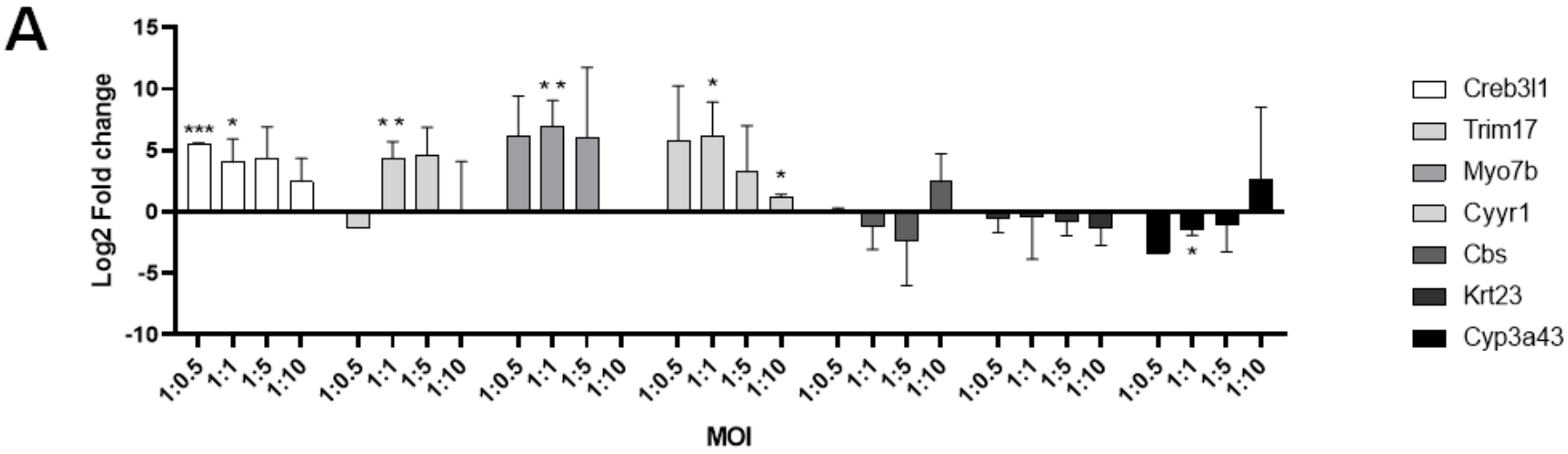
Inicialmente, foi avaliado se os genes identificados *in silico* eram expressos por monócitos humanos quando infectados por *Mycobacterium tuberculosis.* Por meio de RT-qPCR, observamos o perfil transcricional dos genes anteriormente listados. Inicialmente, infectamos as células com diferentes MOI (Multiplicity of Infection), como mostra a Figura 8A, por um período de incubação de 24 horas com *Mtb*. É possível notar uma relação MOI dependente em alguns genes (Figura 8A).

A comparação deu-se em relação à expressão gênica dos monócitos não infectados. Os genes *Creb3l1 e Trim17* são upregulados independentemente do número de bactérias, mas especialmente nos MOI de 1:1. O gene *Myo7b* teve sua expressão aumentada no MOI 1:1, mas no MOI 1:10 teve sua expressão em níveis muito baixos, quase que indetectáveis. De forma nitidamente concentração-dependente, o gene *Cyyr1* tem sua expressão reduzida conforme o número de bactérias aumenta. Os genes *Cbs e Cyp3a43* parecem ser diretamente modulados na presença do número de bactérias avaliados, uma vez que diante do aumento da quantidade de bactérias o perfil de expressão tendeu a inverter, como mostra figura 8A. Já o gene *Krt23* foi downregulado independente do MOI.

Como a intenção é identificar biomarcadores para a tuberculose, nossas análises computacionais tiveram como base situações em que envolviam o controle da infecção, e de maneira geral é possível notar que o perfil transcricional dos genes *in vitro* foi fidedigno ao encontrado anteriormente, pois as expressões gênicas dos genes em validação refletem os dados, mais precisamente, frente a situações em que se é mais fácil de controlar infecção, ou seja onde há menor quantidade de bactérias, MOI 1:0,5 e 1:1 (Figura 8A). É possível notar também que o perfil de expressão foi mantido, pois os genes que foram upregulados na análise *in silico* foram upregulados *in vitro*, e o mesmo ocorreu para os genes downregulados.

Analisando os resultados notamos que o perfil transcricional apresentado frente a infecção de MOI 1:1 (Figura 8A) foi o mais representativo, pois, assim como nas análises *in silico,* os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b* e *Trim17* devem estar expressos, upregulados, em situações de controle da infecção, assim como os genes *Cbs, Krt23 e Cyp3a43* tendem a estar downregulados na mesma condição. Por esse motivo definimos o MOI de 1:1 como padrão para o experimento seguinte.

Na figura 8B, avaliamos se a modulação dos genes era tempo dependente. Notamos que o perfil apresentado nas análises *in silico* é representado apenas nos primeiros momentos pós infecção, mais precisamente nas primeiras 24 horas, depois desse período o perfil tende a se tornar oposto, ou seja, os genes que tem a sua expressão relacionada a controle da infecção, *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17,* tendem a diminuir enquanto os genes que são downregulados em situação de controle, *Cbs, Krt23 e Cyp3a43,* tendem a se tornar upregulados.


A
Log2 Fold change
15
10
5
0
-5
-10
1:0.5
1:1
1:5
1:10
MOI
Creb3l1
Trim17
Myo7b
Cyyr1
Cbs
Krt23
Cyp3a43

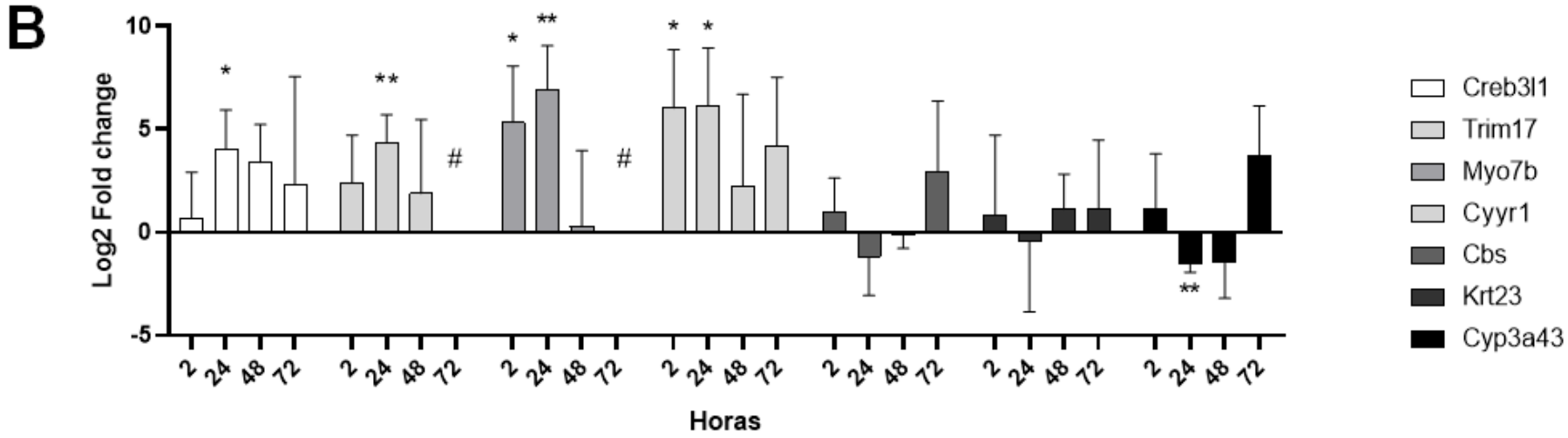

B
Log2 Fold change
10
5
0
-5
2
24
48
72
Horas
Creb3l1
Trim17
Myo7b
Cyyr1
Cbs
Krt23
Cyp3a43

**Figura 8. Perfil transcricional dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* em monócitos humanos infectados com *Mycobaterium tuberculosis***. (A) Resultados de experimentos utilizando a técnica de RT-qPCR, para quantificação dos genes: *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* em monócitos humanos infectados com *Mycobaterium tuberculosis*. N=3.Tempo de infecção: 24 horas. MOI 1:0,5 ou 1:1 ou 1:5 ou 1:10. Comparado ao controle constituído apenas de monócitos e meio de cultura, pelo mesmo período. (B) Resultados de experimentos utilizando a técnica de RT-qPCR, para quantificação dos genes: *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* em monócitos humanos infectados com *Mycobaterium tuberculosis*. N=3. Tempo de infecção: 2 ou 24 ou 48 ou 72 horas. MOI 1:1. Comparado ao controle constituído apenas de monócitos não infectados e meio de cultura, pelo mesmo período. # = não detectado sob as condições especificas. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. O teste *t* foi utilizado para avaliar diferenças entre genes independentes onde *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

O gene *Creb3l1* (cAMP responsive element binding protein 3 like 1) é descrito na literatura como um supressor de metástase tendo sua expressão alterada entre diferentes tipos de câncer (LIU et al., 2018). Dentre as funções atribuídas à expressão desse gene, destaca-se sua participação na via de indução de apoptose através da indução de stress ao reticulo endoplasmático, atuando, através da seu domínio N-terminal como um fator de transcrição citoplasmático (VELLANKI; ZHANG; VOLCHUK, 2013).

E essa função relacionada a indução de apoptose induzida por stress provavelmente explique o fato de termos observado que o gene *Creb3l1* foi up regulado independente da condição observada, seja em diferentes MOI e também diferentes tempos de infecção, indicando que o contato com a bactéria induz stress no monócito e que o mesmo, na tentativa de eliminar o patógeno, provavelmente por apoptose, induz a expressão do *Creb3l1*.

Há exemplos na literatura que contribuem para nossa hipótese, como o trabalho de DENARD et al., 2011, em que relatam a expressão de *Creb3l1,* um fator de transcrição ativado por estresse, como um fator do hospedeiro que inibe a proliferação de células infectadas por vírus da hepatite C (HCV), através da sua clivagem proteoliticamente, permitindo que seu terminal $NH_2$ entre no núcleo e induza a expressão de vários genes que codificam inibidores do ciclo celular.

O *Trim17* é membro de uma família de receptores que tem atividade ligada a processos de autofagia seletiva (MANDELL et al., 2017). A literatura indica que o papel funcional do *Trim17* na iniciação da apoptose passa por sua contribuição da ubiquitinação de proteínas antiapoptóticas e inibição de outros membros da família TRIM como Trim41(LASSOT et al., 2018). Notamos que nas condições utilizadas, com alta quantidade de bactéria e longo tempo de infecção, esse gene foi downregulado, inclusive, chegando ao ponto de não ser detectado (Figura8).

A literatura indica que o *Trim17* apresenta baixos níveis de expressão em vários tecidos, e infecções virais ou bacterianas podem induzir a ativação da expressão do mesmo através da hipometilação da sua região promotora, o que induz o pensamento a imaginar que o *Trim17* atua como um sensor para desencadear respostas de estresse celular, como visto no trabalho publicado de PIERRE et al., 2020, no qual mostram a indução da expressão de *Trim17*, por meio de hipometilação, em filhotes de ratos após injeção de lipopolissacarídeo (LPS). Baseando-se em relatos como os citados, sugerimos que o *Trim17* está envolvido no controle da infecção uma vez que sua expressão foi observada apenas em condições favoráveis ao controle da infecção.

O gene *Cyyr1*, cysteine and tyrosine-rich protein 1, é normalmente expresso em células que pertencem ao sistema de captação e descarboxilação do precursor de amina, que são células ligadas ao desenvolvimento de tumores neuroendócrinos, esse é um gene pouco estudado o que nos limita o acesso a informações funcionais (PATHAK, 2015). Apesar das poucas informações na literatura, é sabido de interações envolvendo o gene *Cyyr1*. Destacamos as ligações diretas como a que ocorre com o fator de transcrição Lmo2, esse que está envolvido na via de sinalização Wnt (LIU et al., 2016), e o mecanismo regido por essa via está presente em praticamente todos os estágios do desenvolvimento da tuberculose (VILLASEÑOR et al., 2017). Um outro caso de ligação direta conhecida, ocorre entre o *Cyyr1* e o miRNA miR-214-3p essa interação que está ligado a via de sinalização TRAF que tem papel já descrito na tuberculose (ANDRADE; AMARAL, 2017; LIU et al., 2017).

Assim como nós, PANIGRAHI, 2007 identificou, por meio da técnica de microarray, a expressão diferencial do gene *Cyyr1* frente a infecção com cepas

de *Escherichia coli* e bactérias probióticas comensais, assim acreditamos que *Cyyr1* esteja envolvido na resposta imune por meio da participação na ativação de vias de sinalização como a Wnt e TRAF, através da interação direta com elementos essenciais para ativação desses mecanismos. Hipótese essa reforçada pelo fato de termos observado, nas análises *in silico* sobre o pulmão, figura 4D, que essas vias foram downreguladas diante de uma condição de persistência da infecção.

A família da queratina (KRT) possui 50 membros e possuem a sua expressão variável de acordo com o tecido, além disso, são caracterizadas como proteínas estruturais que possuem lamentos intermediários das células epiteliais. As queratinas elas atuam em mecanismos relacionados a vias de sinalização, indução de stress e na progressão de alguns tipos de canceres, através da interação entre elementos da família, inclusive controlados epigeneticamente. O *krt23*, uma queratina ácida, foi descrita inicialmente em células de câncer pancreático, inclusive tendo up regulação induzida por hiperacetilação. O *krt23* já foi descrito como marcador de indução de estresse e correlacionado com gravidade de doenças hepáticas (GUO et al., 2020).

KINAST et al., 2019, também observaram altos níveis de expressão de *Krt23* em dados de biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica (CHC), em hepatócitos humanos primários experimentalmente infectados com HCV e células de hepatoma inclusive de maneira dependente, além disso foi notado também que os níveis plasmáticos de proteína Krt23 decresceu de maneira dependente quando houve depuração viral, indicando seu papel no controle da infecção, assim como nós também observamos a sua modulação, dowregulado, relacionado ao controle da infecção por *Mtb.*

Ainda temos o gene *Myo7b* que é descrito na literatura como uma miosina com funções envolvidas na comunicação célula-célula e trocas de solutos (LI et al., 2017). Há relatos na literatura no qual podemos ver o *Myo7b* interagindo de maneira direta com um dos membros da família dos fatores de transcrição GATA. Integrantes dessa família de fatores de transcrição possuem atividade descrita na literatura relacionada a tuberculose, no entanto, detalhes sobre a interação do

*Myo7b* com os mesmos diante da infecção por *Mtb*não é definido, tornando-o mais um alvo promissor (AMELIO et al., 2018).

O gene *Cbs,* que codifica a enzima cistationina beta-sintase, tem como principal função converter homocisteína e serina em cistationina, a deficiência nessa enzima está diretamente ligada a desordens metabólicas caracterizadas por altas concentrações de homocisteína no sangue ou urina, caracterizando a Hiperhomocisteinemia (EL-SAID et al., 2006; DA SILVA et al., 2017).

Há também relatos na literatura da participação desses genes em relação a tuberculose, como publicado por SAINI et al., 2020, no qual mostram a importância de gene *Cbs* no processo de infecção por *Mtb.* Foram utilizados camundongos deficientes na enzima produtora de $H_2S$, a cistationina β-sintase (*Cbs*) e foi observado que esses animais sobrevivem mais tempo com carga bacilar de órgão reduzida, além disso, no mesmo trabalho, foi notado também que a inibição farmacológica da expressão do gene *Cbs* reduz a carga bacilar de *Mtb* em camundongos.

Enzimas da família do citocromo (CYP) p450 dentre as principais funções desempenham um papel fundamental no metabolismo. *Cyp3a43* é um membro da família CYP3A e está localizado em um grupo de genes do citocromo (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43). Em relação a função, o *Cyp3a43* não tem atividade bem descrita, no entanto, sabe-se que possui atividade de testosterona 6β-hidroxilase, indicando um impacto no metabolismo de esteroides (BRANDL et al., 2015).

Baseados em nossos resultados (Figura 8), podemos sugerir que os 7 genes avaliados (*Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43*), estão envolvidos no controle da infecção, mais precisamente nos primeiros contatos entre monócitos e *Mtb,* e esse perfil de expressão é invertido quando a infecção se torna persistente, ou seja, mais tempo ou maior quantidade de bactéria. O perfil transcricional obtido via metanálise no qual apresentavam condições de controle da infecção pela *Mtb*, foi observado *in vitro* também, principalmente nas primeiras 24 horas pós infecção de monócitos humanos com *Mycobacterium tuberculosis*. Portanto, mantivemos as condições de infecção para os experimentos posteriores, composto por MOI 1:1 durante 24 horas.

### 7.2 Os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* estão envolvidos no controle de infecções por diferentes cepas de micobactérias

Outros trabalhos identificaram que componentes da resposta imune são expressos diferentemente de acordo com a virulência do microrganismo, especialmente contra cepas de *Mycobacterium sp* (YASEEN et al., 2018, CHANDRAN et al., 2015b; SENGUPTA et al., 2017; AGARWAL et al., 2020).Para avaliar se a expressão destes 7 genes identificados em nosso trabalho está relacionada à virulência da micobactéria, monócitos humanos foram infectados com diferentes cepas de micobactérias não-tuberculosas, sendo elas: *Mycobacterium bovis* (BCG - Bacilo de Calmette-Guérin), *Mtb*H37Ra, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium avium* e comparamos o perfil de expressão gênica dos 7 genes.

Observa-se na Figura 9 diferente modulação gênica diante das diferentes cepas, onde o gene *Creb3l1* foi upregulado em monócitos infectados com *M. avium, M smegmatis* e *BCG*. O gene *Trim17* foi upregulado frente a infecção de todas as cepas avaliadas, no entanto, devemos mencionar o quanto esse gene foi expresso diante da infecção por *M. avium,* e sabendo do seu papel relacionado a fagocitose, esse resultado indica que monócitos humanos controlam bem a infecção por esse patógeno.

A *Myo7b* foi mantida upregulada frente as cepas testadas, com exceção da H37Ra e *M. smegmatis,* inclusive contra essa última, esse gene foi destacadamente downregulado. Frente a *M. smegamtis* o gene *Cyyr1* também foi downregulado, assim como foi downregulado frente a infecção por *M. fortuitum* mostrando perfil contrário quando comparado a H37Rv. O gene *Cbs* foi mantido downregulado apenas frente a infecção por *M. smegmatis* e *BCG*, enquanto que as demais cepas induziram a expressão desse gene. Krt23 foi, basicamente, downregulado frente todas as cepas, indicando um papel menos variado no controle da infecção de acordo com a virulência.

E por fim, o gene *Cyp3a43* que foi significativamente upregulado em monócitos infectados com *M. smegmatis* ou com H37Ra, perfil oposto ao

apresentado por monócitos infectados com H37Rv, enquanto que em relação as demais cepas esse gene foi downregulado assim como observado na condição de controle da infecção por *Mtb*.

De maneira geral observamos que os 7 genes têm a sua expressão modulada diante da infecção por cepas não-tuberculosas de maneira semelhante ao *Mtb*, indicando que estes genes têm controle sob a resposta imune durante a infecção e que não é dependente dos fatores de virulência diferencialmente expressos entre as cepas avaliadas. Provavelmente, as cepas são reconhecidas por diferentes receptores e consequentemente ativam diferentes vias e mecanismos imunes, no entanto, mesmo diante das diferenças que caracterizam cada cepa de micobacteria, notamos a modulação dos 7 genes, reforçando sua importância na resposta imune frente à infecção.

KOH et al., 2018, por meio da técnica de RNAseq, identificaram a expressão de CD82 / KAI1, um membro da família da tetraspanina já descrito como supressor de metástase, como um gene diferencialmente expresso em pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com MTB H37Rv, e para constatar seu papel na tuberculose, os autores comparam a resposta frente à infecção por outras cepas de micobactérias, mais precisamente MTB H37Ra, *M. bovis* BCG e *M. smegmatis*. Os autores observaram que a virulência de cada cepa influenciou na modulação da expressão do CD82, de maneira em que apenas a cepa H37Rv induziu a upregulação desse gene, e através de experimentos mecanisticos observaram que a relação entre CD82 e Rab5/22 interfere na maturação dos fagossomos resultando na persistência do *Mtb*. Nesse elegante trabalho os autores identificaram um gene que tem a sua modulação dependente da virulência do patógeno, diferentemente de nós que notamos, diferentes níveis de modulação, independente da virulência do patógeno, e isso indica que possivelmente os 7 genes atuam em mecanismos mais amplos de controle de infecção geral.

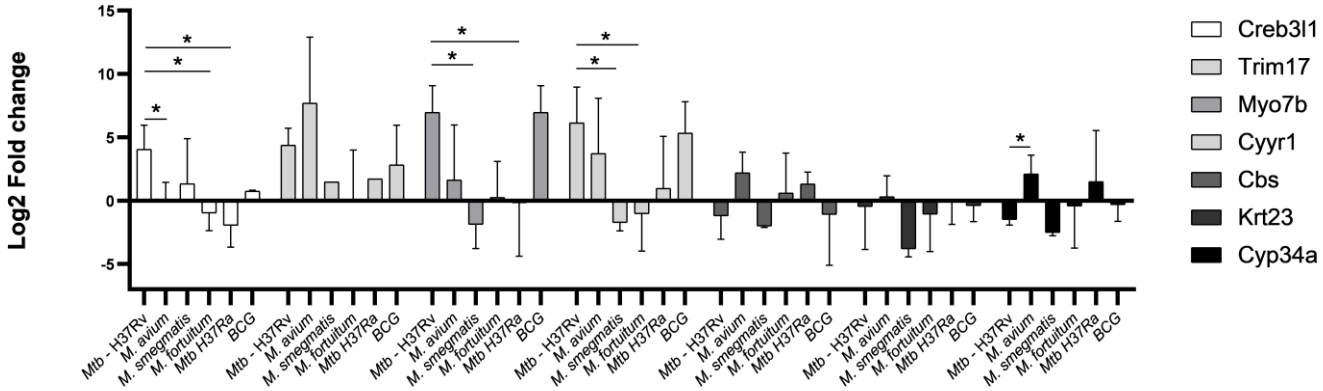



**Figura 9. Expressão diferencial do genes na presença das diferentes cepas de micobactérias.** Tempo de infecção: 24 horas. MOI 1:1. N=3. Comparado ao controle constituído apenas de monócitos e meio de cultura, pelo mesmo período, e após obtido os valores em Log2, os mesmos foram comparados com os valores de Log2 obtidos pela infecção por *Mtb*H37Rv. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. O teste *t* foi utilizado para avaliar diferenças entre genes independentes onde *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

Baseado nos resultados apresentados na Figura 9, os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* estão envolvidos na resposta imune, com funções relacionadas ao controle de infecção. A cepa de *M. bovis* BCG foi a bactéria que induziu o perfil transcricional mais próximo a aquele observado quando os monócitos foram infectados com *Mtb*, ou seja, as diferentes cepas induziram a up e down regulação dos mesmos genes em questão.

As diferenças pontuais entre os níveis de expressão gênica induzidas pelas demais cepas possivelmente são explicadas por características estruturais e genéticas de cada espécie, mas que evidenciam a influência dos genes alvos na infecção por *Mycobacterium tuberculosis.*

### 7.3 Os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* estão envolvidos em funções efetoras no controle da infecção por *Mtb*

Para determinarmos se os genes identificados como diferencialmente expressos têm papel no controle da infecção com a cepa virulenta de

*Mycobacterium tuberculosis*, avaliamos a atividade microbicida dos monócitos, porém, silenciando cada um dos genes alvo upregulados ou induzindo a expressão dos genes downregulados. Para bloquear os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b* e *Trim17,* utilizamos o sistema de knockdown de siRNA. Para induzir a expressão dos genes *Cbs, Krt23 e Cyp3a43* foi utilizada modulação farmacológica.

Para padronizarmos e validarmos o silenciamento, na figura 10A está apresentada a expressão do RNAm do gene *Creb3l1* na ausência e na presença do siRNA (Sigma-Aldrich®). Como se observa, após 48 horas o silenciamento gênico já foi eficaz, se mantendo pelo menos até 96 horas. Na figura 10B, apresentamos o silenciamento dos demais genes, apenas no tempo de 96 horas, e todos os genes foram devidamente silenciados em nosso protocolo experimental.

Ao induzirmos a supressão dos genes observados, funções efetoras dos monócitos frente à *Mtb* foram comprometidas, como demonstram as figuras 10C e 10D. Houve diminuição da capacidade fagocítica dos monócitos após o silenciamento dos 4 genes, e como esperado, em diferentes níveis (Figura 10C). Uma das principais funções dos monócitos é a fagocitose, e a desregulação dessa função pode influenciar a eliminação de patógenos.

O que observamos na Figura 10D é o quanto os monócitos foram eficazes em eliminar a bactéria 24 horas após serem fagocitadas, e diante disso, observamos que as células que não tiveram os genes silenciados foram capazes de eliminar cerca de 50% das bactérias fagocitadas (partindo de em média $2x10^7$ bactérias para em média $1x10^7$ bactérias). Enquanto que as células que tiveram os genes bloqueados não mantiveram a atividade microbicida, sendo que a quantidade de bactérias fagocitadas manteve-se muito próxima à quantidade de bactérias após o período de killing (mantendo-se próximo à $1x10^7$) e algumas vezes até permitindo que as bactérias se replicassem no interior dos monócitos, caso do fator de transcrição *Creb3l1.*

Estes resultados em conjunto sugerem que os genes avaliados estão influenciando tanto no uptake de bactérias, pois a atividade fagocítica foi menor na ausência dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b* e *Trim17*, mas também na

atividade microbicida, pois os monócitos não foram capazes de eliminar as bactérias fagocitadas.

Com o intuito de aprofundar o nosso conhecimento sobre os genes listados e sabendo da dificuldade em realizar o knockdown células de mamíferos, assim como GRESCH; ALTROGGE, 2012 escreveu em seu trabalho, nós também induzimos o knockdown em células da linhagem de monócito humano THP1, e depois disso observamos resultados mais contundentes, nos quais, a diminuição da expressão de todos os genes observados nesse experimento resultou em um decréscimo significativo na atividade fagocítica dessas células (Figura 10F).

A capacidade de eliminar as bactérias também foi avaliada e mais uma vez na ausência da expressão do fator de transcrição Creb3l1 notamos a ineficiência dessas células em eliminar o patógeno (figura 10G).

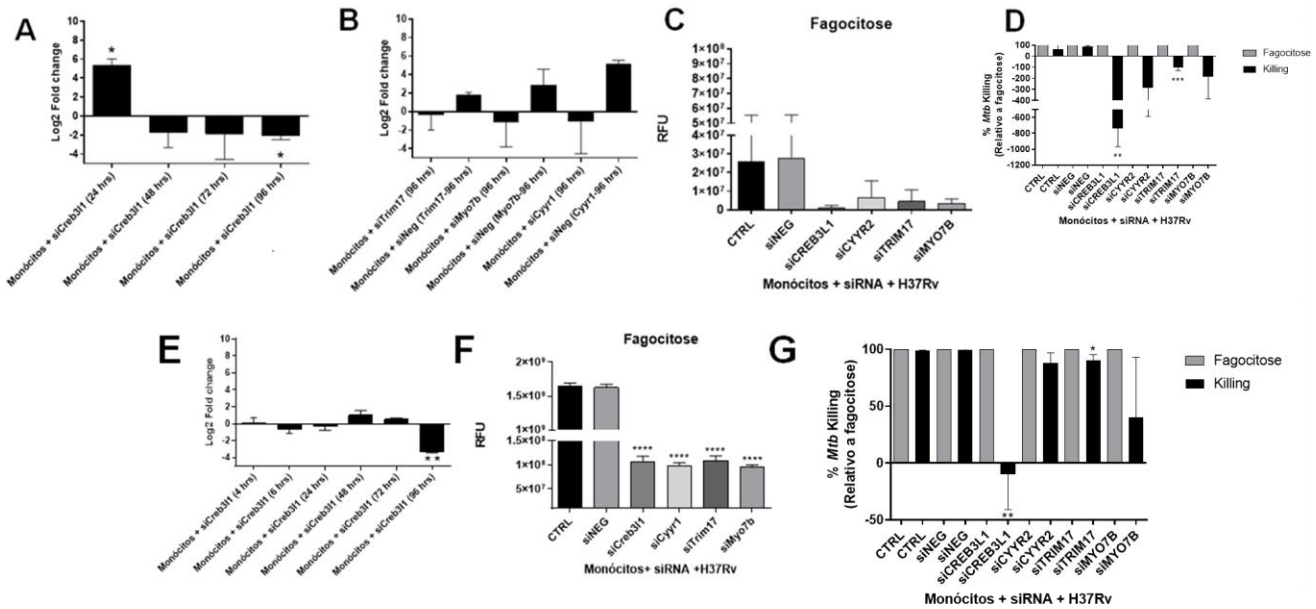



**Figura 10**. **Avaliação da atividade microbicida de monócitos humanos e monócitos da linhagem celular THP1 infectados com H37Rv, após knockdown utilizando siRNA para os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b e Trim17*.** (A e E) RT-qPCR utilizado para avaliar a curva de eficiência do protocolo de knockdown de siRNA ao longo de diferentes períodos em monócitos humanos (A) e monócitos humanos de linhagem THP1 (E). O siRNA para o gene *Creb3l1* foi utilizado na concentração de 50nM em todos os pontos da curva para monócitos humanos e 5nM em todos os pontos da curva para células da linhagem THP1. (B) RT-qPCR utilizado para demonstrar o efeito do knockdown realizada por 96 horas, a 50nM, para os genes *Cyyr1, Myo7b e Trim17* em monócitos humanos de doadores hígidos. (C, D, F e G) Monócitos humanos de doadores hígidos (C e D) e monócitos humanos de linhagem THP1 (F e G) plaqueados na concentração de $7{,}5x10^3$ (C e D) e $1x10^4$ (F e G), knockouts por 96 horas com diferentes siRNAs com a concentração de 50nM (C e D) e 5nM (F e G). Após o knockdown, a infecção foi realizada utilizando a cepa de *Mycobaterium tuberculosis* H37Rv, MOI 1:1. Atividade microbicida foi avaliada por 2 horas para fagocitose e 24 horas para o killing. Para o killing relativo a fagocitose, figuras 10D e G, monócitos humanos tiveram sua eficiência microbicida avaliada tendo os valores de fagocitose como 100% e os valores de killing é a porcentagem do quanto restou de bactérias 24 após a infecção. Os valores do teste de redução de resazurina em unidades de fluorescência relativa (RFU) foram obtidos com base na concentração de bactérias por poço avaliado. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. As comparações foram feitas ao controle constituído apenas de monócitos e meio de cultura (A, B e E) e monócitos infectados com H37Rv (C, D, F e G), pelo mesmo período. O teste t foi utilizado para avaliar diferenças entre genes independentes onde *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 (A, B e E). Análise de Variância simples (One way ANOVA) foi utilizado para realizar múltiplas comparações e avaliar diferenças entre controle (CTRL = monócitos + H37Rv) e tratamentos (Monócitos + siRNA + H37Rv) independentes onde *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 e ****p<0.0001.

Para induzir o aumento de expressão de genes downregulados, *Cbs, Krt23 e Cyp3a43* foram utilizados compostos farmacológicos com comprovada ação moduladora. A escolha dos compostos foi baseada na literatura, sendo que para induzir a expressão do gene *Cbs* foi utilizado a Triancinolona (RATNAM et al., 2002). Para induzir a expressão do gene *CyP3a43* foi utilizada a Dexametasona (KRUSEKOPF; ROOTS; KLEEBERG, 2003). Para a indução do gene *Krt23* foi utilizado a epidroga Azacitidina (HAHN et al., 2013).

O tratamento de monócitos com a menor concentração testada das 3 drogas, 1,25µM, foi suficiente para induzir a expressão dos genes, como mostra a figura 11A. É possível notar que a indução da expressão dos genes observados gera dificuldade em controlar a infecção por *Mtb* pelos monócitos, assim como observamos anteriormente ao silenciarmos os demais genes em discussão. Um decréscimo na função fagocítica é notado após a indução da expressão dos três genes, *Krt23, Cbs* e *CyP3a43,* como mostram as figuras 11B, C e D respectivamente. Foi possível constatar também diferenças significativas na capacidade dos monócitos tratados com diferentes concentrações de cada droga em eliminar as bactérias fagocitadas como mostram as figuras 11E-G.

Os menores níveis de indução da expressão dos 3 genes observados nesses experimentos foram o suficiente para causar dificuldades em eliminar o patógeno pelo monócito, inclusive, nota-se que o fato de não eliminar a bactéria provavelmente tenha tornado o interior do monócito um microambiente adequado para replicação da bactéria, já que os números, em porcentagem, baseados na eficiência do killing em relação ao que foi fagocitado foram bem diferentes daqueles apresentados pelo controle não tratado, indicando assim que a repressão dos genes *Krt23, Cbs* e *CyP3a43* está envolvida no controle da disseminação da *Mtb* (Figuras 11E, F e G).

Uma limitação do nosso estudo foi a ferramenta utilizada para induzir a expressão gênica. Uma vez que os compostos não atuam especificamente na indução da expressão, é provável que os tratamentos com os compostos induziram outras mudanças nas células. Porém diante dos níveis de expressão dos genes, dos resultados observados e dados da literatura que suportam o uso destes fármacos, sugerimos seu efeito indireto.

A triancinolona é um corticosteroide sintético de formula empírica $C_{24}H_{31}FO_6$, que apresenta atividade antiinflamatória 7,5 vezes maior do que a cortisona (MANSOOR; KUPPERMANN; KENNEY, 2009). Os corticosteróides atuam na indução da síntese de lipocortina, essa que age inibindo a fosfolipase A2 que está envolvida na liberação de precurssores inflamatórios como o ácido araquidônico (MANSOOR; KUPPERMANN; KENNEY, 2009). Os mecanismos de envolvidos na ação da triancinolona na resposta anti-inflamatória passam por dilatação dos capilares, proliferação de fibroblastos e migração de leucócitos reduzindo a quimiotaxia, além de induzir a inibição da expressão de citocina próinflamtórias como TNF-α, IL-1β e induzir a expressão de fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) (SARAO; VERITTI; LANZETTA, 2012).

Esses relatos da literatura auxiliam a interpretação dos resultados encontrados e nos orientam quanto as consequências do tratamento com esse composto, pois, observamos menor eficácia na fagocitose e eliminação do patógeno após tratamento (Figuras 11C e F). De maneira semelhante SANTOS, 2015, observou em seu trabalho que o tratamento com triancinolona em cicatrizes queloides intralesional não induz a apoptose, portanto, diante disso é possível que o tratamento com esse composto tenha inibido a indução apoptótica dos monócitos e consequentemente na eliminação do patógeno.

Dexametasona é mais um corticoide sintético que apresenta atividade anti-inflamatória com ação podendo chegar a 30 vezes maior que a hidrocortisona. Essa atividade também é relatada na literatura como publicado por GILES et al., 2018, que demonstra a ação desse composto através da indução da expressão CTLA-4 resultando na inibição da via coestimulatória CD28 impedindo a ativação e diferenciação de células T. KIM et al., 2017, apresentou em seu trabalho os efeitos da dexametasona em monócitos humanos da linhagem THP1, no qual resultou em inativação dessas células através de alguns mecanismos como a supressão da produção de CCL2, ou MCP1, citocina envolvida migração de monócitos, induzir o decréscimo da expressão da molécula de superfície CD14 e bloquear a forma solúvel dessa molécula, além disso também foi demonstrado que esse corticoide inibe a expressão e fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição NF-κB.

Assim, diante disso, possivelmente os compostos utilizados em nossos experimentos tenham induzido efeitos além da expressão dos genes alvos, porém, ao relacionarmos nossos resultados e compará-los aos da literatura, sugerimos que os alvos aqui testados estejam relacionados à resposta imune, que no caso da TB ativa, foi bloqueada, caracterizando a ineficácia na eliminação da *Mtb*.

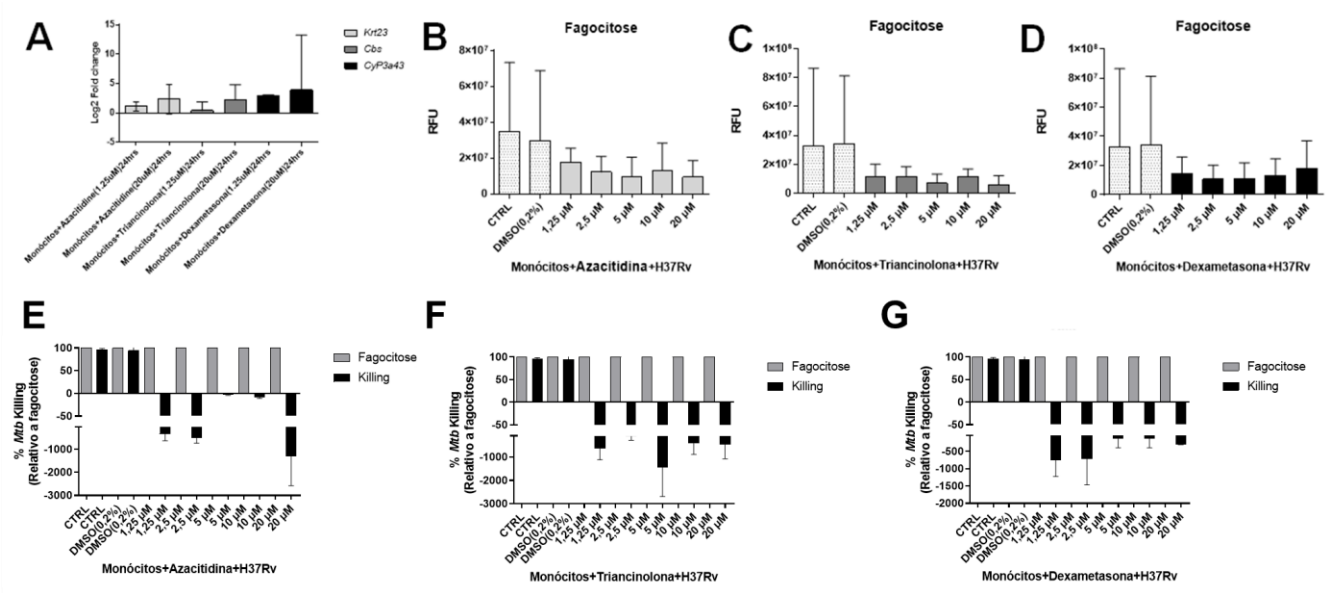



**Figura 11**. **Avaliação da atividade microbicida de monócitos humanos infectados com H37Rv, após tratamento utilizando os seguintes compostos químicos: Azacitidina, Dexametasona e Triancinolona para indução dos genes *Krt23, CyP3a43 e Cbs respectivamente.*** (A) RT-qPCR utilizado para avaliar a indução da expressão dos genes, *Krt23, CyP3a43 e Cbs*, após tratamento com diferentes compostos químicos em concentrações extremas, 1,25µM e 20µM, em monócitos humanos (N=3). (B - G) Monócitos de doadores hígidos plaqueados na concentração de $7{,}5x10^3$, tratados por 24 horas com diferentes compostos químicos em diferentes concentrações. Após o tratamento, a infecção foi realizada utilizando a cepa de *Mycobaterium tuberculosis* H37Rv, MOI 1:1, N=3. Atividade microbicida foi avaliada por 2 horas para fagocitose e 24 horas para o killing. Para o killing relativo a fagocitose, figuras 11E-G, monócitos humanos tiveram sua eficiência microbicida avaliada tendo os valores de fagocitose como 100% e os valores de killing é a porcentagem do quanto restou de bactérias 24 após a infecção. Os valores do teste de redução de resazurina em unidades de fluorescência relativa (RFU) foram obtidos com base na concentração de bactérias por poço avaliado. A análise dos

dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. As comparações foram feitas ao controle constituído apenas de monócitos e meio de cultura (A) e monócitos infectados com H37Rv (B - G), pelo mesmo período. O teste t foi utilizado para avaliar diferenças entre genes independentes onde *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 (A). Análise de Variância simples (One way ANOVA) foi utilizado para avaliar diferenças entre controle (CTRL = monócitos + H37Rv) e tratamentos (Monócitos + compostos químicos + H37Rv) independentes onde *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 e ****p<0.0001.

A *Mtb*é um patógeno intracelular que após invadir consegue persistir dentro de fagócitos mononucleares, e diante disso a fagocitose é à primeira ação desse tipo de célula. A fagocitose ocorre quando há interação entre os receptores da célula do hospedeiro com ligantes da superfície dos patógenos que tem como consequência a internalização do mesmo em vacúolos membranosos conhecidos como fagossomos, essa estrutura se funde com endossomos e lisossomos gerando um microambiente microbicida.

Portanto, assim como escreveu MAERTZDORF et al., 2018, o contato inicial entre a célula imune do hospedeiro e o patógeno tem consequências que resultam na eliminação ou persistência do mesmo. Diante disso, justifica-se observar se os genes em validação estão envolvidos nessa etapa inicial. E conforme observamos, a repressão dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b e Trim17* e a indução de *Krt23, CyP3a43 e Cbs* resulta em uma menor capacidade de fagocitar e eliminar a *Mycobaterium tuberculosis* (figuras 10 e 11).

Jingzhu LV et al., 2017, em seu trabalho, para demonstrar a importância do receptor do tipo Toll 4, como uma molécula anti-TB através do reconhecimento e ativação da resposta imune, e do NADPH oxidase (NOX), que está envolvido na produção de ROS, bloqueou quimicamente suas funções e observou inibição nas funções efetoras, assim como nós.

TAMGUE et al., 2019, induziu a repressão dos microRNA-143 e microRNA-365, que são associados como reguladores imunes, devido a ações como modulação da expressão do receptor do tipo Toll 2 em células de carcinoma de colo retal e indução de apoptose em trofoblastos respectivamente, e isso promoveu a sobrevivência da micobacteria mesmo diante de macrófagos ativados.

Em relação aos genes observados, o fator de transcrição Creb3l1 também já foi descrito na literatura tendo papel direto no bloqueio de infecções patogênicas, como o vírus da hepatite C (HCV), através da modulação de genes envolvidos em vias e mecanismos de proliferação celular como descreve DENARD et al., 2011 em seu trabalho. A repressão desse fator de transcrição induziu os mais alterados resultados tanto na fagocitose quanto no killing, indicando que o mesmo pode ser um elemento importante no processo de infecção por *Mtb* através da modulação de genes envolvidos em vias e mecanismos relacionados ao controle da infecção por *Mtb*.

O gene Krt23 é mais um elemento envolvido no controle de infecções virais como vírus da hepatite C (HCV), conforme mostra o trabalho publicado KINAST et al., 2019 no qual demonstra que a expressão de Krt23 facilita a progressão do ciclo do vírus, e de maneira semelhante observamos que a indução da expressão desse gene diminuiu a fagocitose e killing e consequentemente facilitou a persistência da bactéria.

Miosinas estão diretamente envolvidas no processo de fagocitose através da sua função em aplicar força nos filamentos de actina gerando contratilidade que permite a internalização apropriada e também a translocação de fagossomos para locais celulares apropriados, isso pode auxiliar na explicação da menor eficiência efetora de monócitos ao induzirmos a repressão do gene *Myo7b* (BARGER; GAUTHIER; KRENDEL, 2020).

Diante disso, o perfil transcricional dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* obtido via análises *in silíco* estão relacionados ao controle da infecção e, portanto, a modulação da expressão destes genes, seria indicativo de aumento no controle da doença, uma vez que ao induzirmos o perfil contrário de expressão de cada gene *in vitro*, observamos resultados que indicam maior sobrevivência da bactéria e, portanto, maior gravidade da tuberculose.

### 7.4 A expressão dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17* está envolvida na indução de apoptose de monócitos infectados com Mtb

Após observar que os genes em validação fazem parte de mecanismos efetores na contenção da infecção por *Mtb*por monócitos humanos, buscamos entender como ocorre essa participação. Para isso, avaliamos os níveis de indução de apoptose e necrose de células knockout para os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17* nas primeiras 24 horas após a infecção com *Mtb*.

A repressão dos 4 genes avaliados resultou em menor indução de apoptose quando comparado ao controle. Mais uma vez a repressão do fator de transcrição *Creb3l1* mostra resultados desfavoráveis ao controle da infecção, nesse caso o decréscimo de apoptose foi de aproximadamente 50% conforme indica a figura 12 C. A repressão dos genes *Cyyr1* e *Myo7b* também resultou em redução significativa da apoptose, além de também notarmos uma indução considerável diante da repressão do gene *Trim17* (Figura 12 C).

Além de resultar em uma menor indução de apoptose, a repressão dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17* também indicou uma tendência em aumentar os níveis de necrose dos monócitos infectados com *Mtb,* assim como mostra a figura 12 D. Destaca-se mais uma vez o *Creb3l1* e também a *Myo7b* que dentre as tendências, para esses genes foram observados os maiores índices de necrose (Figura 12 D).

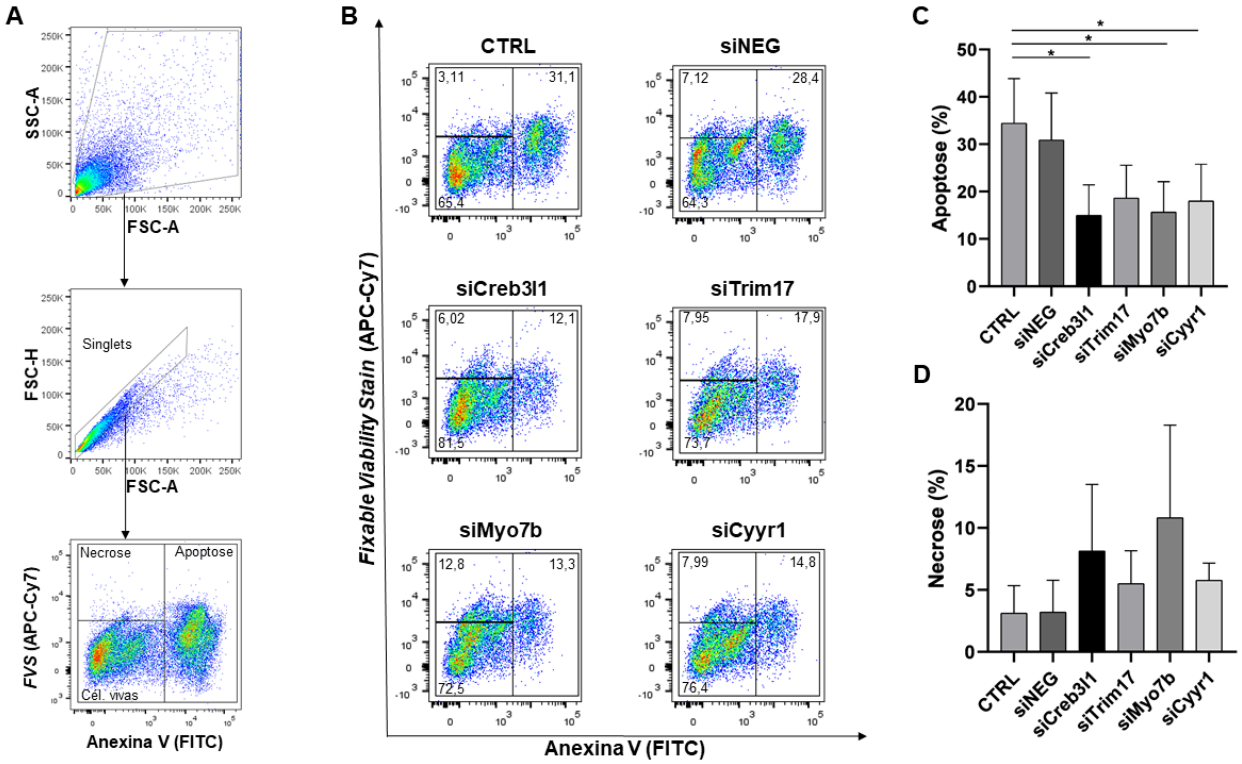



**Figura 12. Avaliação da indução de apoptose e necrose em monócitos humanos infectados com H37Rv, após knockdown utilizando siRNA para os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b e Trim17*.** (A) Estratégia de gating de citometria de fluxo para células marcadas/coradas com AnexinV / FVS. (B) Imagens representativas de células knockout e controles que foram analisadas. (C) Comparação da porcentagem de células apoptóticas nos grupos mostrando diferença significativa após 24 horas de cultura (* P <0,05). (D) Comparação da porcentagem de células necróticas nos grupos. N=3. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. As comparações foram feitas ao controle constituído de monócitos infectados com H37Rv pelo mesmo período. Análise de Variância simples (One way ANOVA) foi utilizado para avaliar diferenças entre controle (CTRL = monócitos + H37Rv) e tratamentos (Monócitos + siRNA ou siNEG + H37Rv) independentes onde *p<0.05.

A interação entre patógeno-hospedeiro pode resultar em diversos desfechos, e a morte celular pode ser vista como uma forma de eliminar o patógeno ou uma forma do patógenos subverter à resposta imune. Apesar dos diferentes tipos, a morte celular, ainda é, tipicamente, discutida como apoptose ou necrose (BORSTEL, 2019). As complexas vias e mecanismos envolvidos na morte celular possuem influência direta na resposta imune do hospedeiro e consequentemente no desfecho da infecção, e em relação a *Mtb*isso não é diferente.

Após ser fagocitada, caso a micobacteria seja morta, a infecção é terminada, no entanto, há casos em que o fagócito do hospedeiro não é capaz de eliminar o patógeno e isso se deve a mecanismos de escape da micobacteria (ZHAI et al., 2019). E inibir a apoptose é um dos principais mecanismos de escape da *Mycobacteruim tuberculosis*, assim como relatou KEANE; REMOLD; KORNFELD, 2000, mostrando a evasão desse patógeno através da supressão do TNF-α em macrófagos e inibindo a via clássica de ativação de apoptose.

A apoptose é um mecanismo favorável ao controle de infecção por *Mtb* pelo fato de induzir a ativação das respostas imune inata e adaptativas (SM BEHAR, CJ MARTIN, MG BOOTY, T NISHIMURA, X ZHAO, H GAN, M DIVANGAHI, 2011). Há relatos na literatura que demonstram que micobactérias intracelulares são mortas por macrófagos que são induzidos a sofrer apoptose, como no trabalho de GUO et al., 2016**,** no qual ao super expressarem EBP50, que é um fator regulador que tem a capacidade de se ligar ao iNOS e controlar a localização do mesmo, aumentou a capacidade de eliminação dessas células através do aumento da apoptose.

Diante disso, observamos por mais uma ótica a importância dos genes em validação para o controle da infecção por *Mtb,* uma vez que a repressão dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b e Trim17* reduziu os níveis de apoptose nos monócitos infectados e consequentemente facilitou a persistência da bactéria (Figura 12 C). Há estudos que nos indicam um papel do gene *Creb3l1* em vias apoptóticas, como o de GREENWOOD et al., 2015**,** que mostraram o papel desse fator de transcrição na modulação de genes envolvidos na resposta ao stress do retículo endoplasmático no hipotálamo de rato, e de maneira a complementar a nossa hipótese, IGNACIO et al., 2019**,** apresentaram em seu trabalho a indução de apoptose em miócitos cardíacos induzida via resposta ao estresse do retículo endoplasmático.

A fase de execução da apoptose é caracterizada por alterações morfológicas, dentre elas destacam-se mudanças dinâmicas na membrana, contração celular e desintegração nuclear, e todas esses acontecimentos são dependentes da força contrátil gerada pelas estruturas do citoesqueleto de actina-miosina, sendo assim, é provável que a repressão do gene *Myo7b*

também tenha influencia na execução da apoptose (CROFT et al., 2005). O gene *Trim17* já teve a sua relação com a apoptose descrita na literatura, como no estudo de LASSOT et al., 2010, que o identificaram como uma como uma das ubiquitina ligases E3 críticas relacionadas à ativação da apoptose neuronal.

Os níveis de necrose também foi algo que chamou a nossa atenção, pois como mostra a figura 12 D, a repressão dos genes *Creb3l1* e *Myo7b* induziu, em média, de 3 a 5 vezes mais necrose do que os controles, algo importante a se notar uma vez que a necrose celular está diretamente ligada a disseminação da *Mtb*(JAISINGHANI et al., 2017).

GIL et al., 2004**,** sugerem, baseados em seus resultados, que a apoptose de monócitos infectados com *Mtb* podem explicar a resposta imune protetora encontrada em indivíduos controle PPD-positivos, ao mesmo tempo em que a necrose está envolvida com a persistência e consequente disseminação bacteriana, além da indução de dano tecidual que ocorre em pacientes com tuberculose ativa. Ainda baseado nos mesmos autores, a indução da necrose se deu principalmente através da repressão do TNF-α, importante citocina na indução de apoptose, e com isso é gerado um microambiente onde a micobacteria consegue persistir e replicar chegando a um ponto de, devido ao grande número de bacilos, romper a membrana celular.

Assim, acreditamos que os genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b e Trim17* possuem funções envolvidas em vias apoptóticas, uma vez que a indução da expressão dos mesmos está relacionada ao controle da infecção por *Mtb,* a repressão dos mesmos indica o contrário devido ao decréscimo de indução de apoptose e aumento na indução de necrose.

### 7.5 A modulação dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs e Cyp3a43* interfere na produção de citocinas produzidas na infecção por *Mtb*

As citocinas são proteínas pleiotrópicas ou pequenas glicoproteínas produzidas por vários tipos de células, como leucócitos, que regulam a imunidade, inflamação e hematopoese (RAY, 2016). O controle da infecção por

*Mtb* é dependente da sinalização que ocorre entre as células imunes, e as citocinas são essenciais nesse aspecto. Essa comunicação resulta, entre outros, na ativação de linfócitos T, estimulação de macrófagos, formação e manutenção de granulomas (O'GARRA; BRITTON, 2017).

Diante disso, avaliamos os níveis de produção de citocinas de monócitos knockout ou tratados com determinados compostos farmacológicos frente à infecção pela *Mycobacterium tuberculosis,* assim como mostra a figura 12. Observamos a produção de citocinas de caráter pró e anti-inflamatório. Em relação às citocinas descritas na literatura como sendo pró-inflamatórias, como TNF-alpha, IL-6, IL-1beta, CXCL10/IP10, IFN-γ, IL-17A, IL-2, IL-12p70 e CCL5/RANTES produzidas por monócitos knockdown para os genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1 e Myo7b* notamos um indício em diminuir a produção das mesmas, de uma maneira geral, como mostra a figura 12 A. E ainda é possível observar aumento da produção da citocina do padrão Th2, a IL-4 (Figura 13).

Os genes *Trim17* e principalmente o *Creb3l1* não parecem ter ligações diretas com a produção de citocinas nas condições observadas, uma vez que não influenciaram, significativamente, na produção de nenhuma citocina avaliada (Figura 13). Já a repressão dos genes *Cyyr1 e Myo7b* reduziu a expressão de citocinas como IFN-γ, IL-2 e CCL5/Rantes, indicando uma possível ligação com a produção das mesmas.

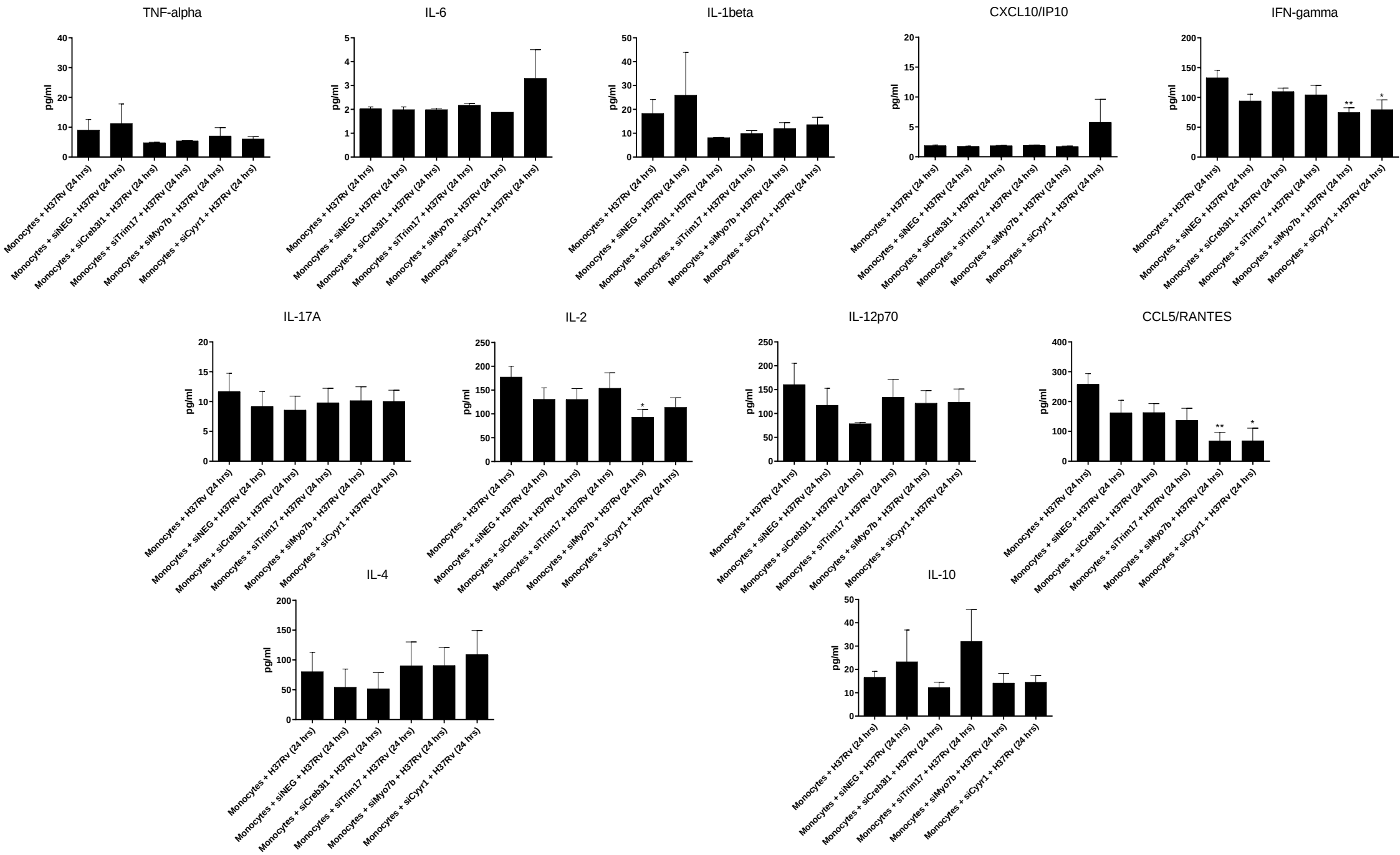

TNF-alpha
IL-6
IL-1beta
CXCL10/IP10
IFN-gamma
IL-17A
IL-2
IL-12p70
CCL5/RANTES
IL-4
IL-10
pg/ml
Monocytes + H37Rv (24 hrs)
Monocytes + siNEG + H37Rv (24 hrs)
Monocytes + siCreb3l1 + H37Rv (24 hrs)
Monocytes + siTrim17 + H37Rv (24 hrs)
Monocytes + siMyo7b + H37Rv (24 hrs)
Monocytes + siCyyr1 + H37Rv (24 hrs)

**Figura 13. Quantificação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura monócitos knockout para os genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1 e Myo7b* frente a infecção por *Mtb*.** Os níveis de citocinas foram avaliados em amostras de sobrenadante de cultura de monócitos em meio de cultura, utilizado como controle, e monócitos knockout com siRNA para os *genes Creb3l1, Trim17, Myo7b e Cyyr1,* ambos os grupos infectados com a cepa de *Mtb*H37Rv durante 24 horas. N=3. Para detecção foi utilizado o kit Magnetic Luminex Assay. As barras representam a média ± desvio padrão de cada grupo. Os resultados foram analisados por meio do teste t. ** P <0,005, * P <0,05.

Interferon-gama (IFN-γ), a principal citocina envolvida em respostas do padrão Th1, tem um papel determinante na resposta contra a tuberculose devido a sua função na ativação de macrófagos e neutrófilos, ativação de linfócitos T citotóxicos, indução de autofagia entre outros (KAK; RAZA; TIWARI, 2018). Estudos mostram que a deficiência na produção de IFN-γ em camundongos está diretamente relacionada à disseminação do patógeno, devido principalmente ao aumento de necrose e da quantidade de bacilos nesses animais, como mostraram COOPER et al., 1993. Em humanos, a deficiência na produção o dessa citocina já foi relatada e inclusive com a mesma consequência (OTTENHOFF; KUMARARATNE; CASANOVA, 1998).

Assim como nós, KRAAIJ et al., 2014, também observaram a produção de IFN-γ  por monócitos humanos *in vitro* em resultado à estimulação, no caso dos autores citados foi usado LPS. Diante disso, sugerimos que a repressão de genes *Cyyr1* e *Myo7b* possui ligação, seja de maneira direta ou indireta, ao decréscimo da produção de IFN-γ comprovando sua importância no processo de desenvolvimento da tuberculose.

Além do IFN-γ, a citocina IL-2 também é citada na literatura como um biomarcador ligado à tuberculose, tendo ligação direta com a persistência da infecção e por isso é relacionado a identificação de pacientes latentes, assim como mostram EL-SABBAGH; EL-KAZZAZ; MASHALY, 2016. O papel da IL-2 no sistema imune passa principalmente por regulação da diferenciação de células T, baseando-se nisso LIU et al., 2019, observaram a disfunção de células T resultante da exaustão causada pela infecção persistente de *Mtb*. No entanto após essas células serem tratadas com IL-2 a função protetora foi recuperada.

Assim, sabendo da importância da IL-2 para o controle da infecção pela micobactéria, a repressão do gene *Myo7b* teve indicio de interferência observada na produção da mesma e consequentemente influenciando negativamente na eliminação do patógeno.

A quimiocina CCL5 também possui sua função relacionada a ativação de células T, além de estar envolvida no recrutamento de células mononucleares, seu papel na tuberculose é destacado pelo fato de ser produzida por macrófagos integrantes do granuloma (SELVARAJ et al., 2011). Notamos mais uma vez que a repressão dos genes *Cyyr1* e *Myo7b* se mostraram, de alguma maneira, relacionados a produção de mais essa citocina (Figura 13), nos levando a imaginar que a modulação desses genes faça parte de um contexto complexo que resulta no decréscimo da produção de determinadas citocinas, em monócitos, relacionadas a ativação de células T, essa que é essencial para o controle da tuberculose (COUNOUPAS; TRICCAS, 2019).

O gene *Myo7b* foi o que mais se destacou em relação ao envolvimento com a produção de citocinas, e isso pode estar ligado ao fato da sua participação direta na fagocitose, ou seja, um papel no controle de infecções (YANG et al., 2005). Miosinas são recrutadas para formação de fagossomos em células fagocíticas (MAY; MACHESKY, 2001). NORAZMI, 2010, observou em seu trabalho utilizando macrófagos, a relação entre eficiência na atividade fagocítica e produção de citocinas proinflamatórias como IL-12, TNF-α e IL-1β, através da infecção por cepas mutantes de BCG expressando MSP-1C afim de induzir resposta imune mais eficiente frente a *Plasmodium falciparum.*

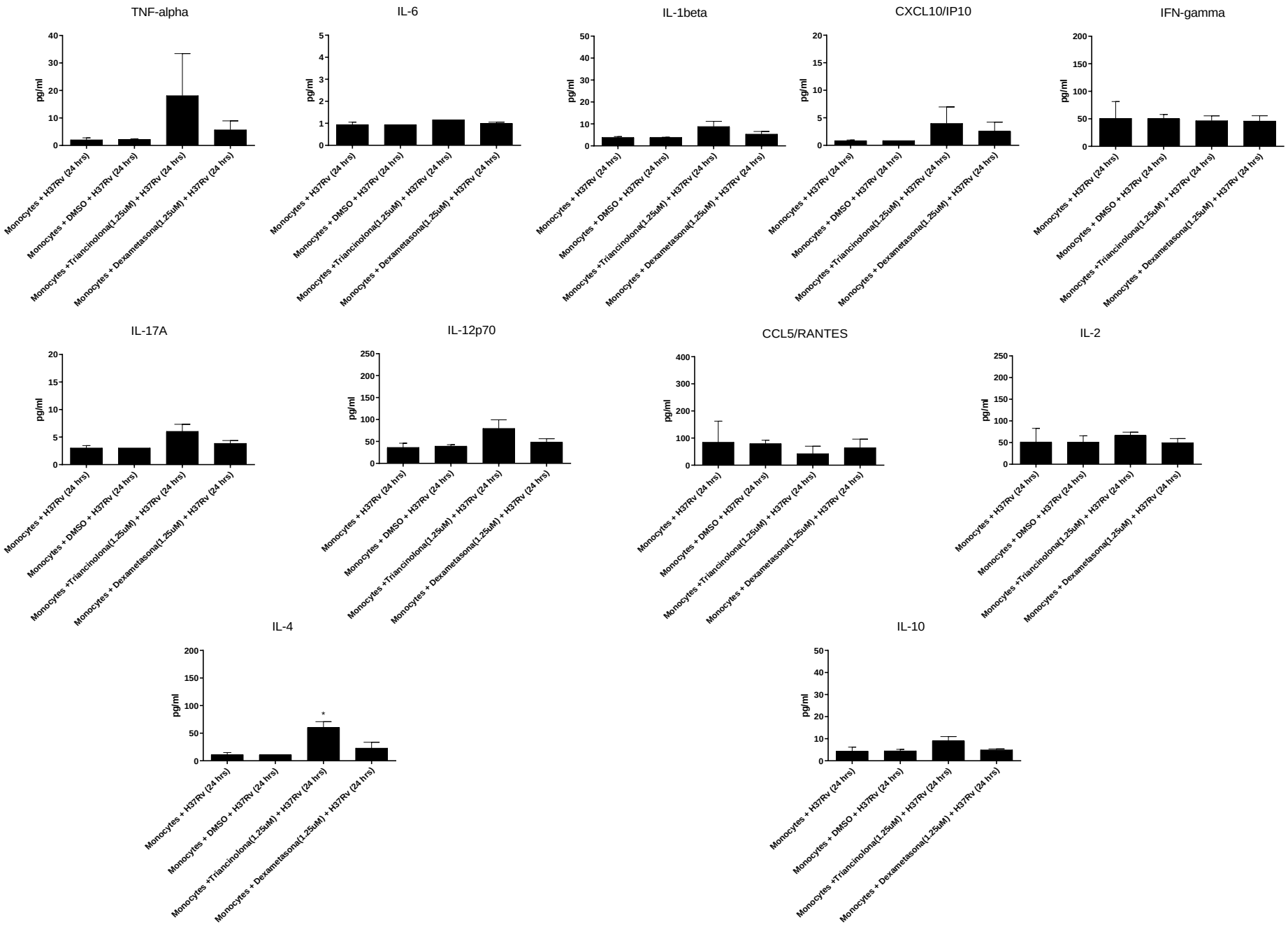

TNF-alpha
IL-6
IL-1beta
CXCL10/IP10
IFN-gamma
IL-17A
IL-12p70
CCL5/RANTES
IL-2
IL-4
IL-10
pg/ml
Monocytes + H37Rv (24 hrs)
Monocytes + DMSO + H37Rv (24 hrs)
Monocytes +Triancinolona(1.25uM) + H37Rv (24 hrs)
Monocytes + Dexametasona(1.25uM) + H37Rv (24 hrs)
*

**Figura 14. Quantificação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura monócitos tratados com triancinolona ou dexametasona frente a infecção por *Mtb*.** Os níveis de citocinas foram avaliados em amostras de sobrenadante de cultura de monócitos em meio de cultura, utilizado como controle, e monócitos tratados com triancinolona (1.25µM) ou dexametasona (1.25µM). Ambos os grupos foram infectados com a cepa de *Mtb*H37Rv durante 24 horas. N=3. Para a detecção foi utilizado o kit Magnetic Luminex Assay. As barras representam a média ± desvio padrão de cada grupo. Os resultados foram analisados por meio do teste t. ** P <0,005, * P <0,05.

Ainda observamos o perfil de citocinas produzidas por monócitos tratados previamente com triancinolona ou dexametasona, drogas que induzem a expressão dos *Cbs* e *Cyp3a43* respectivamente, frente a infecção por *Mtb* como mostra a figura 14. A indução dos genes observados não parece ter influência direta na produção de citocinas próinflamatórias, pelo menos não por meio dessa metodologia utilizada para indução, no entanto, há de se destacar que a indução da expressão do gene *Cbs* resultou, dentre os possíveis efeitos causados pelo tratamento utilizando um composto farmacológico, em aumento da produção da citocina de perfil Th2, a IL-4, como mostra a figura 14. Destacamos ainda o resultado do tratamento com triacinolona, que induz a expressão do gene *Cbs,* induzir também a produção da citocina IL-4 (Figura 14), nos chamou a atenção uma vez esse fato não é bem definido na literatura.

IL-4 atua na resposta imune através da inibição de atividade fagocítica em neutrófilos, como fator quimioatrativo para eosinófilos, além de modular a indução da expressão de citocinas como IL-1 em monócitos e macrófagos (BONDER; DISEASES, 1999) e IFN-γ por células T (REFAELI et al., 2002). POORAN et al., 2019, mostraram em seu trabalho que a IL-4 resulta na persistência de *Mtb*fagocitadas por macrófagos, possivelmente por meio de alterações em vias e mecanismos ligados a Treg e Th1.

Assim, acreditamos que a modulação dos genes *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs* e *Cyp3a43* atua no controle da *Mtb* tendo ligações com o perfil de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

### 7.6 A inibição de enzimas epigenéticas induz mudanças no perfil de expressão gênicas dos genes estudados e contribui para na atividade microbicida

Estudos mostram que alguns patógenos possuem a capacidade de interferir na resposta imune do hospedeiro através da indução de alterações epigenéticas na expressão gênica, como a *Listeria monocytogenes* que através da ação do fator de virulência LntA induz a expressão de IL-8 através da ativação da via de sinalização MAPK. O Epstein–Barr vírus é mais um patógeno capaz de induzir alterações epigenéticas, nesse caso através da LMP1 que induz o silenciamento de E-caderina por meio da indução da atividade das enzimas epigenéticas DNMT1, 3A e 3B (TAKAHASHI, 2014).

A infecção por *Mtb*também induz alterações epigenéticas em células do sistema imune do hospedeiro, como apresentado por DINARDO et al., 2020, que ao analisar os níveis de metilação em PBMCs de pacientes com tuberculose ativa, notaram níveis de hipermetilação nas regiões promotoras de genes fundamentais na resposta imune frente a esse patógeno, modulando os genes das vias de IL-2/STAT5, TNF/NF-κB, e membros da via de sinalização do IFN-γ. Dentre as alterações epigenéticas causadas pela *Mtb* destaca-se a modulação da expressão de enzimas que alteram o estado conformacional da cromatina, nesse caso como publicado por MOREIRA et al., 2020, as histonas desacetilases (HDACs), que tem seus níveis de expressão alterados em macrófagos humanos após o contato com a *Mtb*.

Em nossas análises *in silíco,* vias epigeneticas foram diferencialmente expressas como mostram as figuras 4D e 6C, assim, observamos a expressão de algumas HDACs em monócitos humanos após infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. A figura 15A mostra a expressão gênica das HDACs 1, 4, 6, 8, 9, 11 além da Hist1h2ab, em condições que acreditamos que a infecção está sob controle, ou seja, 24 horas de infecção e MOI de 1:1. Notamos que, como exceção, apenas a HDAC11 foi downregulada enquanto as demais foram upreguladas, e diante das diferenças estruturais e funcionais que caracterizam cada enzima, acreditamos que isso é um resultado esperado uma vez que cada

uma das enzimas deve atuar em regiões diferentes da cromatina e consequentemente sob a modulação de diferentes genes.

Em nossos resultados destaca-se a HDAC9 (Figura 14A), essa enzima epigenética que pertence à classe II da família das HDACs e tem o seu gene inserido no cromossomo 7 em humanos (ZHOU et al., 2001). A HDAC9 é descrita na literatura tendo papel em diversas doenças, como no trabalho de MARKUS et al., 2013, que mostrou a relação da desregulação na expressão dessa enzima, devido ao polimorfismo na região cromossômica 7p21.1, com o aumento no risco de AVC isquêmico.

Os resultados apresentados por ZHANG et al., 2020, ajudam a direcionar os encontrados por nós, pois em seu estudo sobre osteoporose perceberam que animais com 16 meses de vida apresentavam considerável perda de massa óssea além de superexpressão de HDAC9 no tecido ósseo e também em células-tronco mesenquimais da medula óssea, porém, experimentos mecanísticos permitiram observar que a ação de inibidores de HDAC9 equilibrou os níveis de expressão dessa enzima e consequentemente a autofagia foi regulada através do controle da acetilação na H3K9 que contém

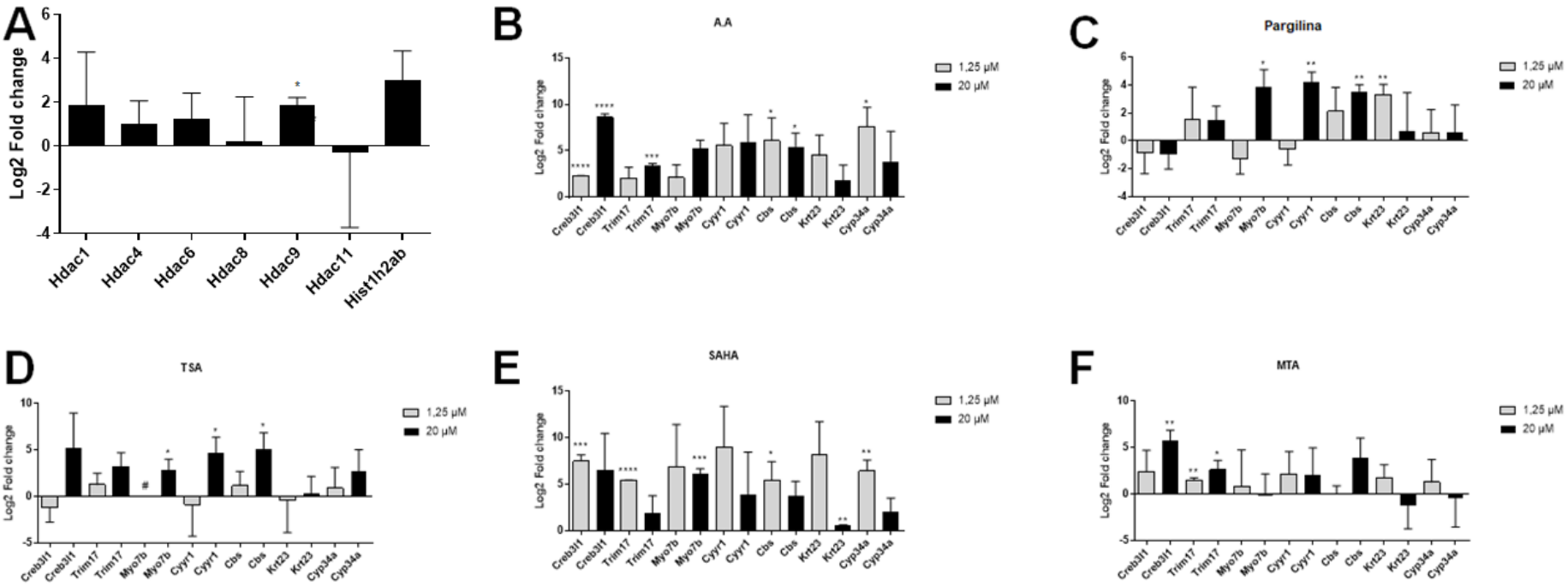



**Figura 15. Perfil transcricional de enzimas epigenéticas e dos genes em monócitos humanos infectados com *Mycobaterium tuberculosis* ou tratados com epidrogas**. (A) Resultados de experimentos utilizando a técnica de RT-qPCR, para quantificação dos genes: *Hdac1, Hdac4, Hdac6, Hdac8, Hdac9, Hdac11 e Hist1h2ab* em monócitos humanos infectados com *Mycobaterium tuberculosis*. Tempo de infecção: 24 horas. MOI: 1:1. N=3. Comparado ao controle constituído apenas de monócitos e meio de cultura, pelo mesmo período. (B-F) Resultados de experimentos utilizando a técnica de RT-qPCR, para quantificação dos genes: *Creb3l1, Cyyr1, Myo7b, Trim17, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* em monócitos humanos tratados com: (B) Ácido anacárdico (A.A); (C) Pargilina; (D) Tricostatina A (TSA); (E) SAHA ou (F) 5' –methylthioadenosine (MTA), por 24 horas em diferentes concentrações. N=2. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. O teste t foi utilizado para avaliar diferenças entre genes independentes onde *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 e ****p<0.0001.

dentre outras, as regiões promotoras de genes envolvidos na autofagia, sendo eles *ATG7, BECN1 e LC3a/b*.

A situação que envolve resistência/controle a infecção passa por um perfil de modulação de expressão gênica integrado por genes up e downregulados, e sabendo disso tratamos monócitos com diferentes epidrogas que segundo a literatura possuem a capacidade de inibir a expressão de enzimas epigenéticas, sendo os compostos: tricostatina A (TSA) (Sigma-Aldrich®) cujo o tipo de enzima alvo são as HDAC, pargilina (Sigma-Aldrich®) que inibe a ação de HDMT, ácido anacárdico (A.A) (Sigma-Aldrich®) que inibe HAT, 5' – methylthioadenosine (MTA) (Sigma-Aldrich®) que inibe a classe de enzima HMT e SAHA (Sigma-Aldrich®) que atua inibindo HDACs também (BOSSCHE et al., 2014; DEKKER; VAN DEN BOSCH; MARTIN, 2014; HEERBOTH et al., 2014).

De uma maneira geral todos os compostos testados parecem induzir a expressão dos 7 genes observados, como indica a figura 15B-F. Esse resultado nos indica que possivelmente a modulação desses genes ocorre através da atuação de mecanismos baseados na ação de enzimas epigenéticas. E diante disso, com o intuito de observar se essa modulação causada pelas epidrogas influenciaria nas funções efetoras dos monócitos, observamos a capacidade de fagocitose e killing dessas células pré-tratadas frente a infecção por *Mtb*.

A figura 16 nos mostra resultados relacionados a atividade fagocítica de monócitos humanos pré-tratados com cada uma das epidrogas em diferentes concentrações. Inicialmente, nos chama a atenção o fato de tratarmos as células com SAHA e TSA, ambos com a capacidade de inibir a função enzimática de praticamente todas as HDACs, e notarmos resultados distintos de maneira considerável, no qual, o tratamento com SAHA induziu a um decréscimo na capacidade de essas células fagocitar a micobatéria, independentemente da quantidade do composto utilizado no tratamento, enquanto que o tratamento com TSA induziu níveis significativamente mais elevados de fagocitose pelos monócitos (Figura 16A e B).

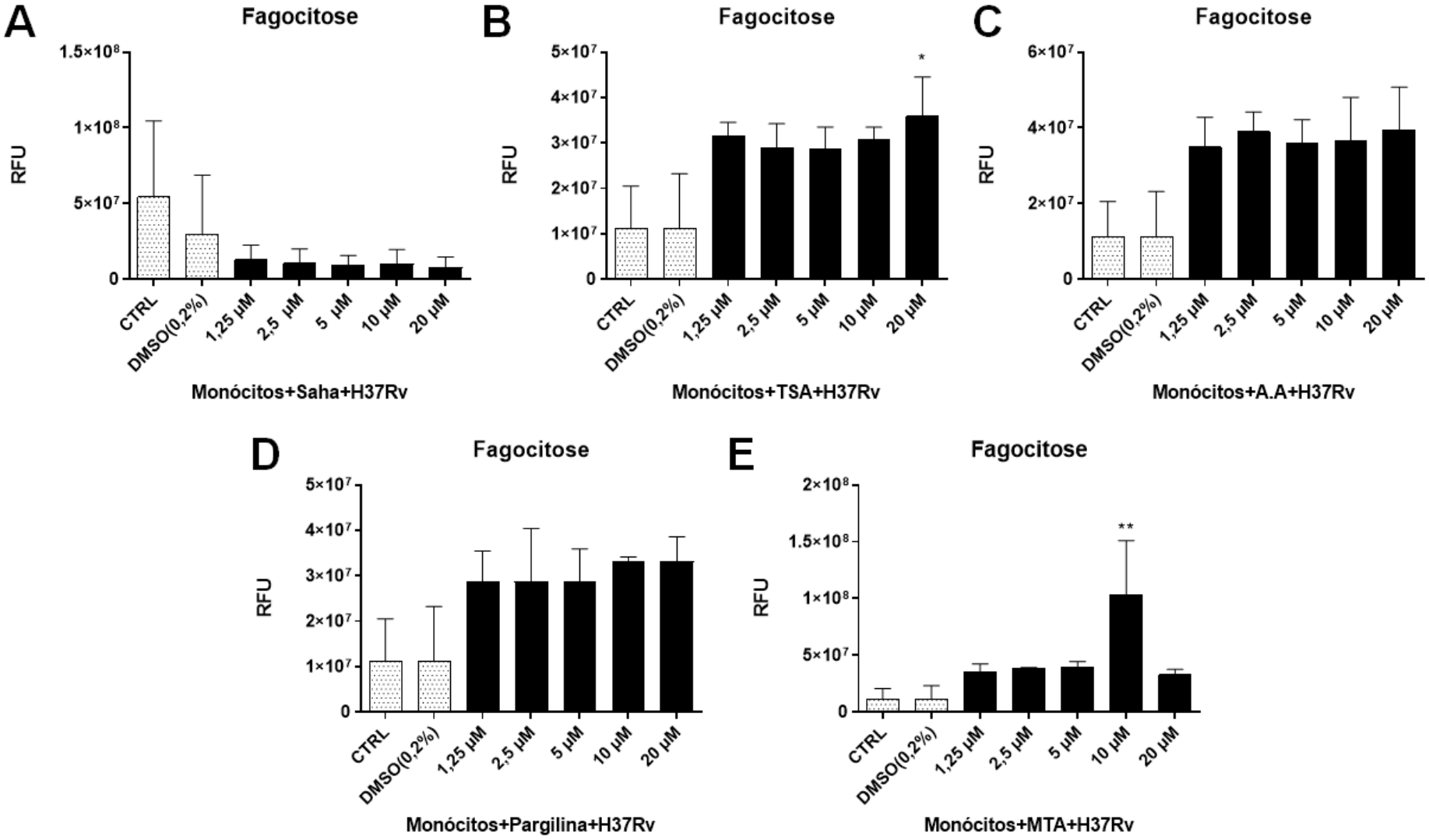

A
Fagocitose
RFU
1.5×10⁸
1×10⁸
5×10⁷
0
CTRL
DMSO(0,2%)
1,25 µM
2,5 µM
5 µM
10 µM
20 µM
Monócitos+Saha+H37Rv
B
Fagocitose
RFU
5×10⁷
4×10⁷
3×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
0
*
CTRL
DMSO(0,2%)
1,25 µM
2,5 µM
5 µM
10 µM
20 µM
Monócitos+TSA+H37Rv
C
Fagocitose
RFU
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
CTRL
DMSO(0,2%)
1,25 µM
2,5 µM
5 µM
10 µM
20 µM
Monócitos+A.A+H37Rv
D
Fagocitose
RFU
5×10⁷
4×10⁷
3×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
0
CTRL
DMSO(0,2%)
1,25 µM
2,5 µM
5 µM
10 µM
20 µM
Monócitos+Pargilina+H37Rv
E
Fagocitose
RFU
2×10⁸
1.5×10⁸
1×10⁸
5×10⁷
0
**
CTRL
DMSO(0,2%)
1,25 µM
2,5 µM
5 µM
10 µM
20 µM
Monócitos+MTA+H37Rv

**Figura 16**. **Avaliação da atividade fagocítica de monócitos humanos infectados com H37Rv, após tratamento com epidrogas.** Monócitos de doadores hígidos plaqueados na concentração de $7,5x10^3$, tratados por 24 horas com diferentes compostos químicos em diferentes concentrações, sendo: (A) SAHA; (B) Tricostatina A (TSA); (C) Ácido anacárdico (A.A); (D) Pargilina; (E) 5' –methylthioadenosine (MTA), por 24 horas em diferentes concentrações. Após o tratamento, a infecção foi realizada utilizando a cepa de *Mycobaterium tuberculosis* H37Rv, MOI 1:1. Atividade microbicida foi avaliada por 2 horas para fagocitose. Os valores do teste de redução de resazurina em unidades de fluorescência relativa (RFU) foram obtidos com base na concentração de bactérias por poço avaliado. N=4. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. As comparações foram feitas ao controle constituído de monócitos infectados com H37Rv pelo mesmo período. Análise de Variância simples (One way ANOVA) foi utilizado para avaliar diferenças entre controle (CTRL = monócitos + H37Rv) e tratamentos (Monócitos + compostos químicos + H37Rv) independentes onde *$p<0.05$ e **$p<0.01$.

Apesar de os dois compostos terem os mesmos alvos de atuação, a diferença, praticamente contrária, que observamos provavelmente é explicada por detalhes que caracterizam as diferenças estruturais de cada um dos compostos, no qual, o TSA é um produto natural isolado de *Streptomyces hygroscopicus,* enquanto o SAHA foi sintetizado com o intuito de observar se a possibilidade de que um grupo fenil hidrofóbico em uma extremidade da molécula pudesse aumentar sua atividade (VICTORIA M. RICHON,STEPHANE EMILIANI, ERIC VERDIN,YAEL WEBB,RONALD BRESLOW, RICHARD A. RIFKIND,1998).

Resultados diferentes induzidos por esses compostos também foram observados por outros autores, como no trabalho publicado por FREESE et al., 2019, que ao tratarem linhagens celular de carcinoma hepatocelular (Hep3B, HepG2, PLC, HuH7), com TSA e SAHA com o intuito de comparar seus efeitos antitumorais ao inibirem HDACs, perceberam que apenas o composto SAHA foi capaz de induzir senescência nesse tipo de célula.

CAI et al., 2018 também alcançaram resultados diferentes ao tratar o mesmo tipo de celular com TSA e SAHA, nesse caso, os autores trataram células de linhagem de adenocarcinoma ductal pancreático (MiaPaCa-2 e

PANC-1) e perceberam que TSA foi capaz de induzir mais apoptose quando comparado ao SAHA.

Todos os outros compostos testados induziram níveis mais elevados da capacidade fagocítica dos monócitos quando comparado aos seus respectivos controles, inclusive em concentrações mais elevadas do tratamento como mostra a figura 16C-E. A inibição da atividade de diferentes enzimas epigenéticas tais como HDACs, HAT, HMT e HDMT e os diferentes resultados obtidos, evidencia o quão complexo é a ativação de toda maquinaria transcricional, e a consequente ativação da resposta imune, após o contato entre célula imune do hospedeiro e a *Mycobacterium tuberculosis*, que interfere diretamente no controle ou suscetibilidade a infecção.

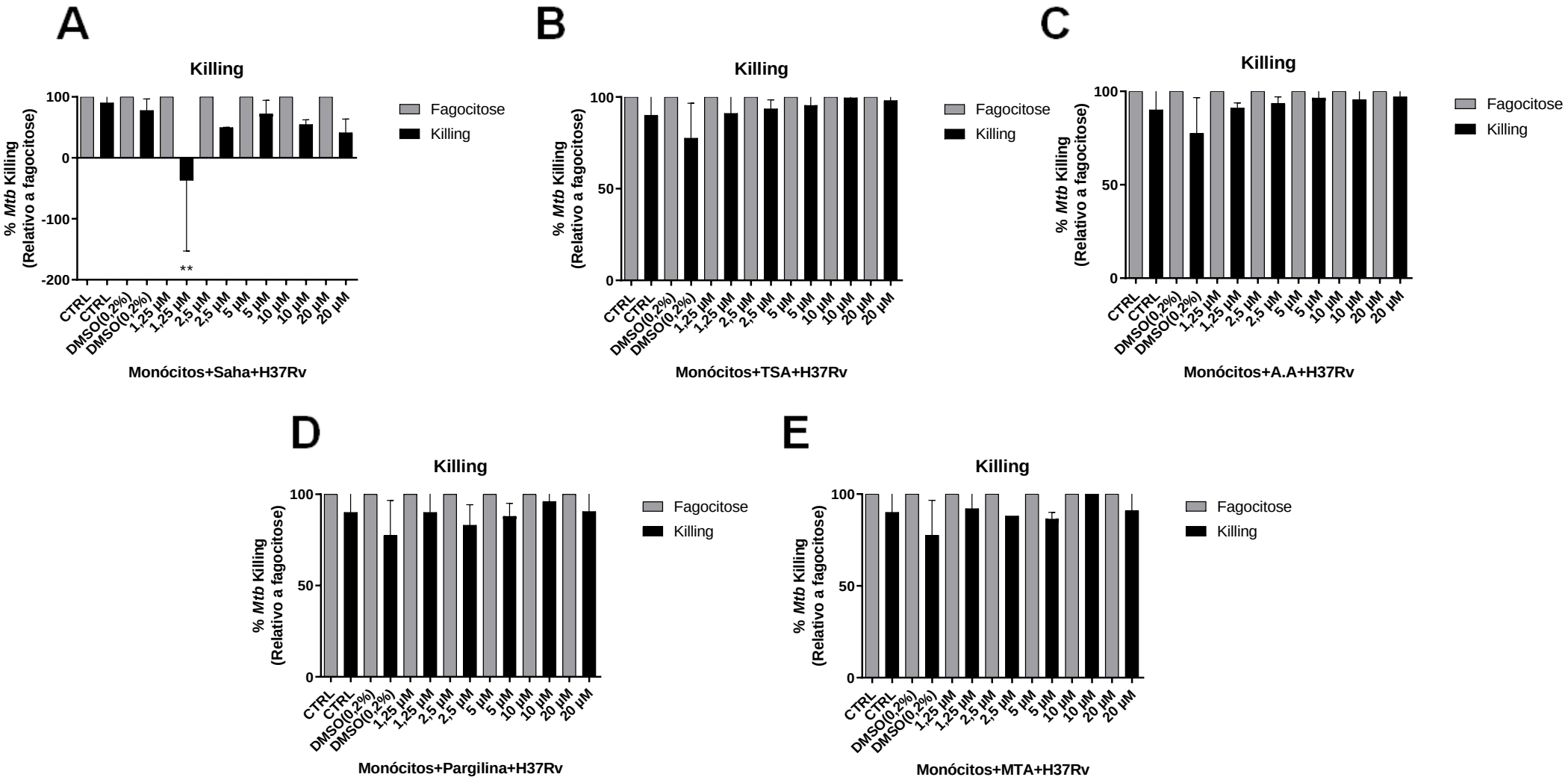

A
Killing
% Mtb Killing
(Relativo a fagocitose)
100
0
-100
-200
**
CTRL
CTRL
DMSO(0,2%)
DMSO(0,2%)
1,25 µM
1,25 µM
2,5 µM
2,5 µM
5 µM
5 µM
10 µM
10 µM
20 µM
20 µM
Monócitos+Saha+H37Rv
Fagocitose
Killing
B
Killing
% Mtb Killing
(Relativo a fagocitose)
100
50
0
Monócitos+TSA+H37Rv
Fagocitose
Killing
C
Killing
% Mtb Killing
(Relativo a fagocitose)
100
50
0
Monócitos+A.A+H37Rv
Fagocitose
Killing
D
Killing
% Mtb Killing
(Relativo a fagocitose)
100
50
0
Monócitos+Pargilina+H37Rv
Fagocitose
Killing
E
Killing
% Mtb Killing
(Relativo a fagocitose)
100
50
0
Monócitos+MTA+H37Rv
Fagocitose
Killing

**Figura 17**. **Avaliação da atividade microbicida de monócitos humanos infectados com H37Rv, após tratamento com epidrogas.** Monócitos de doadores hígidos plaqueados na concentração de $7,5x10^4$, tratados por 24 horas com diferentes compostos químicos em diferentes concentrações, sendo: (A) SAHA; (B) Tricostatina A (TSA); (C) Ácido anacárdico (A.A); (D) Pargilina; (E) 5' –methylthioadenosine (MTA), por 24 horas em diferentes concentrações. Após o tratamento, a infecção foi realizada utilizando a cepa de *Mycobaterium tuberculosis* H37Rv, MOI 1:1. Atividade microbicida foi avaliada por 24 horas para killing. Para o killing relativo a fagocitose, figuras 17A-E, monócitos humanos tiveram sua eficiência microbicida avaliada tendo os valores de fagocitose como 100% e os valores de killing é a porcentagem do quanto restou de bactérias 24 após a infecção. Os valores do teste de redução de resazurina em unidades de fluorescência relativa (RFU) foram obtidos com base na concentração de bactérias por poço avaliado. N=4. A análise dos dados foi realizada com o GraphPad Prism V 8.0. As comparações foram feitas ao controle constituído de monócitos infectados com H37Rv pelo mesmo período. Análise de Variância simples (One way ANOVA) foi utilizado para avaliar diferenças entre controle (CTRL = monócitos + H37Rv) e tratamentos (Monócitos + compostos químicos + H37Rv) independentes onde $*p<0.05$ e $**p<0.01$.

Assim, observamos também a capacidade de monócitos tratados com diferentes epidrogas em eliminar a *Mtb,* como apresentado na figura 17. Observamos uma tendência em o tratamento com as diferentes epidrogas induzirem a eliminação do patógeno (Figura 17A-E). Os compostos, que possuem a capacidade de modular a expressão dos genes estudados, tornam os monócitos capazes de eliminar o patógeno de maneira semelhante ao controle não tratado.

Nas condições testadas, é possível notar o efeito dose-dependente de compostos como TSA e o A.A que apresentaram os melhores índices de eliminação da bactéria na concentração mais alta, mesmo quando o tratamento na concentração mais baixa foi o suficiente para eliminar aproximadamente 80% em ambos os casos.

Ainda sobre concentrações dos compostos em relação à eficácia microbicida, o composto SAHA, figura 17A, teve na menor concentração resultados que indicaram que o monócito não só não eliminou o patógeno resultando em proliferação do mesmo, enquanto que as concentrações maiores induziram índices acima de 50% de eliminação de bactérias e esse resultado indica que a expressão dos genes em validação está relacionada ao controle da

infecção por *Mtb*e que possivelmente elementos epigenéticos atuam na modulação da expressão gênica dos mesmos.

Esse tipo de suposição é possível ser feita baseada em resultados apresentados na literatura como o de ESPÍNDOLA et al., 2018, que ao investigarem disfunções imunes de monócitos de pacientes HIV+ tratados e não tratados com terapia anti-retroviral, observaram diferenças no padrão de expressão gênica de enzimas epigeneticas durante a infecção por HIV, inclusive dentre as enzimas foi destacado a correlação entre a histona acetiltransferase1 (HAT1) com sCD163, um biomarcador plasmático de progessão, e também foi notado considerável mudança no perfis de produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio quando os monócitos dos pacientes foram infectados com *Mtb*.

Por fim, acreditamos ter embasamento de que os genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b, Cbs, Krt23 e Cyp3a43* estão envolvidos com a resistência à infecção por *Mycobacterium tuberculosis.*

## 8. CONCLUSÃO

Baseado em dados de transcriptômica de células de pulmão e fígado de camundongos infectados com Mtb e dados públicos de pacientes com a forma ativa e latente da tuberculose, foram identificados 7 genes diferencialmente expressos e relacionados ao controle da infecção: os genes, *Creb3l1, Trim17, Cyyr1 e Myo7b* foram upregulados e *Cbs, Krt23 e Cyp3A43* foram downregulados.

Com a validação *in vitro,* mostramos que a indução da expressão dos genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b e Hdac9*, e a repressão de *Cbs, Krt23 e Cyp3A43*, em monócitos humanos infectados por *Mtb* está relacionada à maior produção de citocinas como IFN-γ, IL-2 e CCL5/Rantes, maior número de bactérias fagocitadas e indução da apoptose e resistência à infecção.

Demonstramos também que a inibição da expressão dos genes *Creb3l1, Trim17, Cyyr1, Myo7b* e a upregulação de *Cbs, Krt23* e *Cyp3A43* correlaciona-se à redução na fagocitose, ao aumento de IL-4 e provável indução de necrose, o que resultaria na persistência da micobactéria e consequente perfil de suscetibilidade.

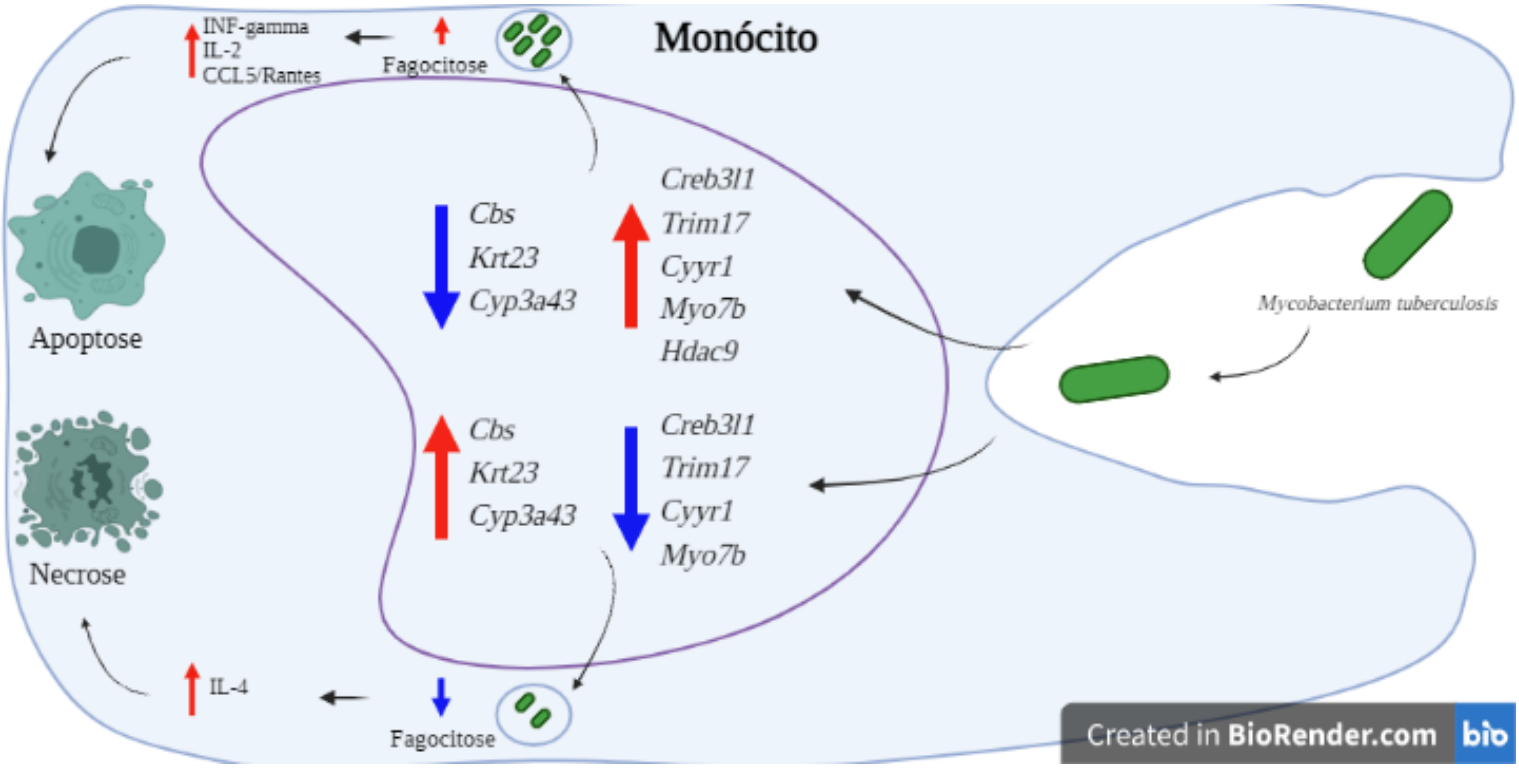


**Figura 18**. **A fagocitose da *Mtb*pode induzir a expressão de um conjunto de genes no monócito que favorecem a resistência ou a suscetibilidade à infecção.**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S. et al. VapBC22 toxin-antitoxin system from Mtbis required for pathogenesis and modulation of host immune response. **Science Advances**, v. 6, n. 23, p. 1–14, 2020.

AHMED, M. et al. Immune correlates of tuberculosis disease and risk translate across species. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 528, p. 1–18, 2020.

AMELIO, P. et al. HIV Infection Functionally Impairs Mtb-Specific CD4 and CD8 T-Cell Responses . **Journal of Virology**, v. 93, n. 5, 2018.

ANDERS, S. et al. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. **Nature protocols**, v. 8, n. 9, p. 1765–86, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975260>.

ANDRADE, B.; AMARAL, E. Nuclear Factor κB Activation Pathways During Infection. **Cell Communication Insights**, v. 9, n. 0, 2017.

ARNLJOTS, K. et al. EBSCOhost: Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloi... p. 1789–1795, 1998. Disponível em: <http://web.ebscohost.com.ep.fjernadgang.kb.dk/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=9b4ebb9a-ea72-4f07-ad35-35963b9fdbf6@sessionmgr10&vid=2&hid=10>.

ARSHAD, A. et al. Analysis of Tuberculosis Meningitis Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 2962, 2020.

ASHE, H. et al. Role of the runt-related transcription factor ( RUNX ) family in prostate cancer. p. 1–15, 2021.

BADLEY, A. D. et al. Altering cell death pathways as an approach to cure HIV infection. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 7, p. e718-11, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.248>.

BAI, X. et al. Inhibition of Nuclear Factor-Kappa B Activation Decreases Survival of Inhibition of Nuclear Factor-Kappa B Activation Decreases Survival of Mtbin Human Macrophages. n. April, 2013.

BALBOA, L. et al. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the

context of tuberculosis infection. p. 319–330, 2015.

BANDYOPADHYAY, K.; MARRERO, I.; KUMAR, V. NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 3, p. 337–346, 2016.

BARGER, S. R.; GAUTHIER, N. C.; KRENDEL, M. Squeezing in a Meal: Myosin Functions in Phagocytosis. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 2, p. 157–167, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.11.002>.

BARRIOS-PAYÁN, J. et al. Extrapulmonary locations of MtbDNA during latent infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 8, p. 1194–1205, 2012.

BARROS, H.; DONALISIO, M. R. Temporal trend of tuberculosis in Brazil Tendência temporal da tuberculose no Brasil Evolución temporal de la tuberculosis en Brasil. v. 36, n. 6, p. 1–14, 2020.

BEHAR, B. S. M. et al. Susceptibility of Mice Deficient in CD1D or TAP1 to Infection with Mycobacterium tuberculosis. v. 189, n. 12, 1999.

BEHERA, J. et al. Hydrogen Sulfide Promotes Bone Homeostasis by Balancing Inflammatory Cytokine Signaling in CBS-Deficient Mice through an Epigenetic Mechanism. **Scientific Reports**, n. September, p. 1–16, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33149-9>.

BELMIRO, C. L. R. et al. Unfractionated heparin and new heparin analogues from ascidians (chordate-tunicate) ameliorate colitis in rats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11267–11278, 2009.

BEWKET, G. et al. Helminth species specific expansion and increased TNF-alpha production of non-classical monocytes during active tuberculosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009194, 2021.

BLANKLEY, S. et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A 380 gene meta-signature of active TB compared to healthy controls. v. 47, n. 18, p. 1712–1723, 2014.

BLANKLEY, S. et al. The Transcriptional Signature of Active Tuberculosis Reflects Symptom Status in Extra-Pulmonary and Pulmonary Tuberculosis. p. 1–14, 2016.

BO, N. et al. Novel HDAC11 inhibitors suppress lung adenocarcinoma stem cell self-renewal and overcome drug resistance by suppressing Sox2. p. 1–20, 2020.

BONDER, C. S.; DISEASES, I. Interleukin-4 regulation of human monocyte and macrophage interleukin-10 and interleukin-12 production . Role of a functional interleukin-2 receptor c -chain. 1999.

BORSTEL, F. Differential functions of apoptotic and necrotic cell death in tuberculosis. n. April, p. 1–17, 2019.

BOSSCHE, J. Van Den et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Inhibiting epigenetic enzymes to improve atherogenic macrophage functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 455, n. 3–4, p. 396–402, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.029>.

BRANDL, E. J. et al. Genetic variation in CYP3A43 is associated with response to antipsychotic medication. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 1, p. 29–34, 2015.

BRIFFOTAUX, J.; LIU, S.; GICQUEL, B. Genome-wide transcriptional responses of Mycobacterium to antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–14, 2019.

BROUSSARD, E. K. et al. invasive to malignant lesions. v. 6, n. 7, p. 666–674, 2014.

BUREL, J. G. et al. Host transcriptomics as a tool to identify diagnostic and mechanistic immune signatures of tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, p. 1–12, 2019.

CAI, M. et al. Depletion of HDAC1 , 7 and 8 by Histone Deacetylase Inhibition Confers Elimination of Pancreatic Cancer Stem Cells in Combination with Gemcitabine. **Scientific Reports**, n. September 2017, p. 1–11, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20004-0>.

CAMPBELL, L. A.; KUO, C.-C. Functional Crosstalk Between T Cells and Monocytes in Cancer and Atherosclerosis. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 18, n. 1, p. 48–54, 2020.

CARDENAS, C. L. L. et al. An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. **Nature Communications**, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03394-7>.

CARROLL, S.; GOODSTEIN, D. Defining the scientific method. **Nature Methods**, v. 6, n. 4, p. 237, 2009.

CASTAÑO, D.; GARCÍA, L. F.; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16 þ monocytes with Mtbinfection. **Tuberculosis**, v. 91, n. 5, p. 348–360, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2011.04.002>.

CHAI, Q.; WANG, L.; LIU, C. H. New insights into the evasion of host innate immunity by Mycobacterium tuberculosis. **Cellular & Molecular Immunology**, n. May, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0502-z>.

CHANDRAN, A. et al. MtbInfection Induces HDAC1-Mediated Suppression of IL-12B Gene Expression in Macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. December, p. 1–14, 2015a.

CHANDRAN, A. et al. Mtbinfection induces HDAC1-mediated suppression of IL-12B gene expression in macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. DEC, p. 1–14, 2015b.

CHEN, J. et al. Improved human disease candidate gene prioritization using mouse phenotype. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–13, 2007.

CHEN, J.; ARONOW, B. J.; JEGGA, A. G. Disease candidate gene identification and prioritization using protein interaction networks. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1–14, 2009.

CHEN, Q. et al. Identification of monocyte-associated genes as predictive biomarkers of heart failure after acute myocardial infarction. **BMC Medical Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00890-6>.

CHENG, S. et al. Effect of Diagnostic and Treatment Delay on the Risk of Tuberculosis Transmission in Shenzhen, China: An Observational Cohort Study, 1993-2010. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

CHURCHYARD, G. et al. What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 6, p. S629–S635, 2017.

COLANGELI, R. et al. Mtbprogresses through two phases of latent infection in humans. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18699-9>.

COLE, J. et al. The therapeutic potential of epigenetic manipulation during infectious diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 167, p. 85–99, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.013>.

COLE, S. T. Learning from the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis. v. 452, p. 20–23, 1999.

COOPER, B. A. M. et al. Disseminated Tuberculosis in Interferon 7 Gene-disrupted Mice. v. 178, n. December, 1993.

CORREIA-NEVES, M. et al. Biomarkers for tuberculosis: the case for lipoarabinomannan. **ERJ Open Research**, v. 5, n. 1, p. 00115-2018, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1183/23120541.00115-2018>.

COUNOUPAS, C.; TRICCAS, J. A. The generation of T-cell memory to protect against tuberculosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 97, n. 7, p. 656–663, 2019.

CREVEL, R. Van; OTTENHOFF, T. H. M.; MEER, J. W. M. Van Der. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. v. 15, n. 2, p. 294–309, 2002.

CRISAN-DABIJA, R. et al. Tuberculosis and COVID-19 : Lessons from the Past Viral Outbreaks and Possible Future Outcomes. v. 2020, 2020.

CROFT, D. R. et al. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. n. February, 2005.

CRUZ, A. et al. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis. v. 207, n. 8, p. 1609–1616, 2010.

DA SILVA, D. G. H. et al. Impact of genetic polymorphisms in key enzymes of

homocysteine metabolism on the pathophysiology of sickle cell anemia. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 106, n. February, p. 53–61, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.019>.

DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN, L. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 37–49, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.014>.

DE PABLO-BERNAL, R. S. et al. Modulation of monocyte activation and function during direct antiviral agent treatment in patients coinfected with HIV and hepatitis C virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 9, p. 1–13, 2020.

DEKKER, F. J.; VAN DEN BOSCH, T.; MARTIN, N. I. Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases and deacetylases are potential drugs for inflammatory diseases. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 654–660, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.012>.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of Mtbinfection. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, 2013.

DENARD, B. et al. The membrane-bound transcription factor CREB3L1 is activated in response to virus infection to inhibit proliferation of virus-infected cells. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 1, p. 65–74, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.006>.

DHAR, N.; MCKINNEY, J. D. Mtbpersistence mutants identi fi ed by screening in isoniazid-treated mice. v. 107, n. 27, p. 12275–12280, 2010.

DINARDO, A. R. et al. DNA hypermethylation during tuberculosis dampens host immune responsiveness. v. 130, n. 6, p. 3113–3123, 2020.

DIVANGAHI, M. et al. NOD2-Deficient Mice Have Impaired Resistance to MtbInfection through Defective Innate and Adaptive Immunity . **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, p. 7157–7165, 2008.

DOLASIA, K.; NAZAR, F.; MUKHOPADHYAY, S. MtbPPE18 protein inhibits MHC class II antigen presentation and B cell response in mice. **European Journal of Immunology**, v. 51, n. 3,

p. 603–619, 2021.

DONNACHIE, E.; FEDOTOVA, E. P.; HWANG, S. A. Trehalose 6,6-Dimycolate from MtbInduces Hypercoagulation. **American Journal of Pathology**, v. 186, n. 5, p. 1221–1233, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.12.019>.

DRIVER, E. R. et al. Evaluation of a Mouse Model of Necrotic Granuloma Formation Using C3HeB / FeJ Mice for Testing of Drugs against Mycobacterium. v. 56, n. 6, p. 3181–3195, 2012.

DUPONT, M. et al. Tuberculosis Exacerbates HIV-1 Infection through Formation in Macrophages Article Tuberculosis Exacerbates HIV-1 Infection through IL-10 / STAT3-Dependent Tunneling Nanotube Formation in Macrophages. p. 3586–3599, 2019.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D.; RHEE, K. Y. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0013-4>.

EL-SABBAGH, A. M.; EL-KAZZAZ, S. S.; MASHALY, G. E. Interferon-gamma (IFN-) and Interleukin-2 (IL2) as immunological markers in pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2016.

EL-SAID, M. F. et al. A common mutation in the CBS gene explains a high incidence of homocystinuria in the Qatari population. **Human mutation**, v. 27, n. 7, p. 719, 2006.

ELKINGTON, P. T.; UGARTE-GIL, C. A.; FRIEDLAND, J. S. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Matrix metalloproteinases in tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 2, p. 456–464, 2011.

ESPÍNDOLA, M. S. et al. Epigenetic alterations are associated with monocyte immune dysfunctions in HIV-1 infection. n. September 2017, p. 1–14, 2018.

ESPOSITO, S. et al. A Case Report of Widely Disseminated Tuberculosis in Immunocompetent Adult Male. **Clinical Practice and Cases in Emergency Medicine**, v. 4, n. 3, p. 375–379, 2020.

ESTERHUYSE, M. M.; LINHART, H. G.; KAUFMANN, S. H. E. Can the battle against

tuberculosis gain from epigenetic research? **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 220–226, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.002>.

ETNA, M. P. et al. Impact of MtbRD1-locus on human primary dendritic cell immune functions. **Scientific Reports**, v. 5, n. October, p. 1–14, 2015.

FANG, J. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29467962%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5805548>.

FATTORINI, L. et al. Involvement of the fadD33 gene in the growth of Mtbin the liver of BALB/c mice. **Microbiology**, v. 148, n. 12, p. 3873–3880, 2015.

FERWERDA, G. et al. Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2 . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 4, p. 1011–1018, 2007.

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; LIN, P. L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 271–278, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2011.14>.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the Mtbcomplex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FRANCK, R. et al. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 14, n. 9, p. R95, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2013-14-9-r95>.

FREESE, K. et al. Histone Deacetylase Expressions in Hepatocellular Carcinoma and Functional E ff ects of Histone Deacetylase Inhibitors on Liver Cancer Cells In Vitro. [s.d.]

GANDOTRA, S. et al. proteasome as essential for persistence in mice. v. 13, n. 12, p. 1515–1520, 2011.

GAO, J. et al. Guinea pig infected with Mtbvia oral consumption. v. 2119, 2018.

GARCIA-MARTINEZ, L. et al. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and

resistance. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22024-3>.

GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=545600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GENTLEMAN, R. I. and R. R : A Language for Data Analysis and Graphics. **Computational and Graphical Statistics**, v. 5, n. 3, p. 299–314, 2015. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/pdf/1390807.pdf?acceptTC=true>.

GEORGE SEBASTIAN, V.K CHALLU, P. K. SIGNIFICANCE OF H37Rv MTB. p. 14–22, 2015.

GERSHWIN, M. E.; VIERLING, J. M.; MANNS, M. P. Liver immunology: Principles and practice. **Liver Immunology: Principles and Practice**, p. 1–480, 2014.

GHIGNA, M. R. et al. Epstein-barr virus infection and altered control of apoptotic pathways in posttransplant lymphoproliferative disorders. **Pathobiology**, v. 80, n. 2, p. 53–59, 2012.

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4–13, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2010.54>.

GIL, D. P. et al. Differential Induction of Apoptosis and Necrosis in Monocytes from Patients with Tuberculosis and Healthy Control Subjects. v. 189, 2004.

GIL, Y. et al. Automated Hypothesis Testing with Large Scientific Data Repositories. **Proceedings of the Fourth Annual Conference on Advances in Cognitive Systems (ACS)**, n. June, p. 1–6, 2016.

GILES, A. J. et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: Mechanisms and implications for immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2018.

GOLETTI, D. et al. Tuberculosis Biomarkers: From Diagnosis to Protection. **Infectious disease reports**, v. 8, n. 2, p. 6568, 2016. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403267%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4927936>.

GOMES, T. et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil : a hierarchical model. 2014.

GOODSMITH, N. et al. Disruption of an M . tuberculosis Membrane Protein Causes a Magnesium-dependent Cell Division Defect and Failure to Persist in Mice. p. 1–23, 2015.

GOUNDER, L. et al. Hepatic tuberculosis in human immunodeficiency virus co-infected adults : a case series of South African adults. p. 7–12, 2017.

GREENWOOD, M. et al. Transcription Factor CREB3L1 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress Response Genes in the Osmotically Challenged Rat Hypothalamus. v. 1, p. 1–13, 2015.

GRESCH, O.; ALTROGGE, L. Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 801, n. 4, p. 65–74, 2012.

GREWAL, S. I. S.; MOAZED, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 798–802, 2003.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 1, p. E101–E111, 2006.

GUO, D. et al. KRT23 Acts as an Oncogene in Hepatocellular Carcinoma by Regulating P21 via PI3K/AKT/GSK3β Pathway. p. 1–36, 2020.

GUO, Y. et al. EBP50 induces apoptosis in macrophages by upregulating nitric oxide production to eliminate intracellular Mycobacterium. **Nature Publishing Group**, n. December 2015, p. 1–11, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep18961>.

GUPTA, R. K.; KUMAR, S. Central nervous system tuberculosis. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 21, n. 4, p. 795–814, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nic.2011.07.004>.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and

MtbSurvival in Infected Macrophages. v. 119, p. 753–766, 2004.

HAHN, S. A. et al. Keratin23 ( KRT23 ) Knockdown Decreases Proliferation and Affects the DNA Damage Response of Colon Cancer Cells. v. 8, n. 9, 2013.

HALL, A. et al. RUNX represses Pmp22 to drive neurofibromagenesis. **Science Advances**, v. 5, n. 4, p. 1–13, 2019.

HAN, J. H. et al. Association between cytochrome CYP17A1 , CYP3A4 , and CYP3A43 polymorphisms and prostate cancer risk and aggressiveness in a Korean study population. n. December 2013, p. 285–291, 2015.

HARLING, G.; CASTRO, M. C. A spatial analysis of social and economic determinants of tuberculosis in Brazil. 2014.

HARRIS, T. G.; SULLIVAN MEISSNER, J.; PROOPS, D. Delay in diagnosis leading to nosocomial transmission of tuberculosis at a New York City health care facility. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 2, p. 155–160, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2012.02.015>.

HEERBOTH, S. et al. Use of epigenetic drugs in disease: An overview. **Genetics and Epigenetics**, v. 1, n. 6, p. 9–19, 2014.

HERVOUET, E. et al. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. **Clinical Epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2018.

HICKEY, A. J. et al. A systematic review of hepatic tuberculosis with considerations in human immunodeficiency virus co-infection. **???**, p. 1–11, 2015. Disponível em: <???>.

HUNTER, S. et al. Human liver infiltrating γδ T cells are composed of clonally expanded circulating and tissue-resident populations. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 3, p. 654–665, 2018.

IBRAHIM, M. K.; ZAMBRUNI, M.; MELBY, C. L. crossm Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. v. 30, n. 4, p. 919–971, 2017.

IBRAHIM, M.; MULAT, E. Diabetes Mellitus and Tuberculosis Comorbidity and Associated Factors Among Bale Zone Health. p. 3879–3886, 2020.

ID, R. D. et al. Capture and visualization of live Mtbbacilli from tuberculosis patient bioaerosols. p. 1–16, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009262>.

IGNACIO, J. et al. Hyperosmotic stress promotes endoplasmic reticulum stress - dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. **Apoptosis**, v. 24, n. 9, p. 785–797, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01558-4>.

ILIEVSKA-POPOSKA, B. et al. Latent Tuberculosis Infection - Diagnosis and Treatment. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 651–655, 2018.

IQBAL, S. et al. Monocyte Lymphocyte Ratio as a Possible Prognostic Marker in Antituberculous Therapy. v. 18, n. 2, p. 178–181, 2014.

JAFARZADEH, A. et al. Contribution of monocytes and macrophages to the local tissue inflammation and cytokine storm in COVID-19: Lessons from SARS and MERS, and potential therapeutic interventions. n. January, 2020.

JAISINGHANI, N. et al. Necrosis triggered by Mtbalters macrophage triglyceride metabolism and inflammatory response in a DGAT1 – dependent manner. 2017.

KAHARI, J. et al. Persistent DNA Hyper-methylation Dampens Host Anti-Mycobacterial Immunity. 2019.

KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, B. K. Interferon-gamma (IFN-γ): Exploring its implications in infectious diseases. **Biomolecular Concepts**, v. 9, n. 1, p. 64–79, 2018.

KARAHALIL, B. Overview of Systems Biology and Omics Technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 37, p. 4221–4230, 2016.

KE, B. et al. B-Catenin Regulates Innate and Adaptive Immunity in Mouse Liver Ischemia-Reperfusion Injury. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 1203–1214, 2013.

KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. Virulent MtbStrains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages. 2000.

KHYZHA, N. et al. Epigenetics of Atherosclerosis: Emerging Mechanisms and Methods. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 4, p. 332–347, 2017. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.004>.

KIM, B. Y. et al. Dexamethasone inhibits activation of monocytes/macrophages in a milieu rich in 27-oxygenated cholesterol. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–13, 2017.

KINAST, V. et al. Identification of Keratin 23 as a Hepatitis C Virus-Induced Host Factor in the Human Liver. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 610, 2019.

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

KOCH, R. tubercle bacillus, 1882. p. 246–251, 1982.

KOH, H. J. et al. CD82 hypomethylation is essential for tuberculosis pathogenesis via regulation of RUNX1-Rab5/22. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 50, n. 5, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0091-4>.

KOLB, M. et al. Transient expression of IL-1β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis Find the latest version : Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. v. 107, n. 12, p. 1529–1536, 2001.

KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 216–233, 2009.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1289–1291, 2007.

KORF, H. et al. Liver X receptors contribute to the protective immune response against Mtbin mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1626–1637, 2009.

KRAAIJ, M. D. et al. Human monocytes produce interferon-gamma upon stimulation with LPS. **Cytokine**, v. 67, n. 1, p. 7–12, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.02.001>.

KRUPA, A. et al. Binding of CXCL8 / IL-8 to MtbModulates the Innate Binding of CXCL8 / IL-8 to Mycobacterium tuberculosis. n. August, 2015.

KRUSEKOPF, S.; ROOTS, I.; KLEEBERG, U. Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5 , CYP3A7 and CYP3A43. v. 466, p. 7–12, 2003.

KUMAR, K.; KON, O. M. Diagnosis and treatment of tuberculosis: latest developments and future priorities. **Annals of Research Hospitals**, v. 1, p. 1–1, 2017.

LAMB, C. A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S. A. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 12, p. 759–774, 2013.

LAMICHHANE, S. R. A. M.; MILIC, N. Mycobacterium tuberculosis : Gene and Genome Analysis. **Asian Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 24–33, 2018.

LASSOT, I. et al. Trim17 , a novel E3 ubiquitin-ligase , initiates neuronal apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, p. 1928–1941, 2010.

LASSOT, I. et al. The E3 Ubiquitin Ligases TRIM17 and TRIM41 Modulate α-Synuclein Expression by Regulating ZSCAN21. **Cell Reports**, v. 25, n. 9, p. 2484–2496.e9, 2018.

LASTRUCCI, C. et al. Tuberculosis is associated with expansion of a motile , permissive and immunomodulatory CD16 + monocyte population via the IL-10 / STAT3 axis. **Nature Publishing Group**, p. 1–19, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2015.123>.

LÁZÁR-MOLNÁR, E. et al. extraordinarily sensitive to tuberculosis. v. 107, n. 30, 2010.

LEARY, O.; SULLIVAN, M. P. O.; KEANE, J. IL-10 Blocks Phagosome Maturation in Mtb–Infected Human Macrophages. v. 1, [s.d.]

LEEUWEN, L. M. Van; SAR, A. M. Van Der; BITTER, W. Animal Models of Tuberculosis : Zebrafish. p. 1–13, 2015.

LEISCHING, G. et al. RNAseq reveals hypervirulence-specific host responses to M. Tuberculosis infection. **Virulence**, v. 8, n. 6, p. 848–858, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1250994>.

LI, J. et al. Structure of Myo7b / USH1C complex suggests a general PDZ domain binding mode by MyTH4-FERM myosins. 2017.

LI, W. et al. IL-32: A Host Proinflammatory Factor against Influenza Viral Replication Is

Upregulated by Aberrant Epigenetic Modifications during Influenza A Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5056–5065, 2010.

LIANA, P.; BRESTILOVA, B.; RAHADIYANTO, K. Y. The ratio of monocytes to lymphocytes accuracy as tuberculosis predictor The ratio of monocytes to lymphocytes accuracy as tuberculosis predictor. 2019.

LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. The Subread aligner: Fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 10, 2013.

LINGALA, S. et al. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, n. 1, p. 27–35, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.05.005>.

LIU, J. et al. The risk factors for tuberculosis in liver or kidney transplant recipients. v. 14, n. 1, p. 1–6, 2014a.

LIU, J. et al. Osteoclastic miR-214 targets TRAF3 to contribute to osteolytic bone metastasis of breast cancer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40487>.

LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **The Role of Bioinformatics in Agriculture**, v. 2012, p. 1–25, 2014b.

LIU, L. et al. CREB3L1 and PTN expressions correlate with prognosis of brain glioma patients. v. 0, n. March, p. 1–8, 2018a.

LIU, L. qiang et al. CREB3L1 and PTN expressions correlate with prognosis of brain glioma patients. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 3, 2018b.

LIU, X. et al. IL-2 Restores T-Cell Dysfunction Induced by Persistent MtbAntigen Stimulation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.

LIU, Y. et al. LMO2 attenuates tumor growth by targeting the Wnt signaling pathway in breast and colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–11, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep36050>.

LIU, Y.; LIANG, M. Functional role of epigenetic regulation in the development of prenatal programmed hypertension. **Kidney International**, v. 96, n. 1, p. 10–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.03.003>.

LODDENKEMPER, R.; LIPMAN, M.; ZUMLA, A. Clinical Aspects of Adult Tuberculosis. p. 1–25, 2016.

LU, D. Epigenetic modification enzymes: catalytic mechanisms and inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 3, p. 141–149, 2013.

LU, Y. et al. Bioinformatics analysis of microRNA expression between patients with and without latent tuberculosis infections. **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 3977–3988, 2019.

LV, J. et al. TLR4-NOX2 axis regulates the phagocytosis and killing of Mtbby macrophages. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

MACLEAN, E. et al. A systematic review of biomarkers to detect active tuberculosis. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 748–758, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0380-2>.

MAERTZDORF, J. et al. MtbInvasion of the Human lung: First contact. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–12, 2018.

MAITRA, A. et al. Cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis : An Achilles ' heel for the TB-causing pathogen. n. June, p. 548–575, 2019.

MANDELL, M. A. et al. Correction : TRIM17 contributes to autophagy of midbodies while actively sparing other targets from degradation TRIM17 contributes to autophagy of midbodies while actively sparing other targets from degradation. 2017.

MANOJ, E. M.; SRIGRISHNA, R.; RAGUNATHAN, M. K. Hepatic tuberculosis presenting with extreme hyperferritinemia masquerading as adult-onset Stills disease: A case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 6, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <???>.

MANSOOR, S.; KUPPERMANN, B. D.; KENNEY, M. C. Intraocular sustained-release delivery systems for triamcinolone acetonide. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 4, p. 770–784,

2009.

MARKUS, H. S. et al. Evidence HDAC9 Genetic Variant Associated With Ischemic Stroke Increases Risk via Promoting Carotid Atherosclerosis. p. 1220–1225, 2013.

MARTINEZ, A. N.; MEHRA, S.; KAUSHAL, D. Role of Interleukin 6 in Innate Immunity to MtbInfection. v. 207, p. 1253–1261, 2013.

MATHEMA, B. et al. Drivers of Tuberculosis Transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 6, p. S644–S653, 2017.

MAY, R. C.; MACHESKY, L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. n. June 2014, 2001.

MCMULLAN, G. S.; LEWIS, J. H. Tuberculosis of the Liver, Biliary Tract, and Pancreas. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, p. 1–41, 2017.

MECHAL, Y. et al. Evaluation of GeneXpert MTB / RIF system performances in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. p. 1–8, 2019.

MEENA, M. et al. Primary/local hepatic tuberculosis without dissemination. **BMJ Case Reports**, v. 2015, p. 2–4, 2015.

MIGGIANO, R.; RIZZI, M.; FERRARIS, D. M. Mtbpathogenesis, infection prevention and treatment. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 10–13, 2020.

MIKULAK, J. et al. Hepatic natural killer cells: Organ-specific sentinels of liver immune homeostasis and physiopathology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, p. 1–12, 2019.

MILLS, J. W. et al. Extensive Mycobacterium bovis BCG infection of liver parenchymal cells in immunocompromised mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3175–3180, 2001.

MINEMURA, M.; TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y. Liver involvement in systemic infection. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 9, p. 632–642, 2014.

MÖLLER, M. et al. Genetic Resistance to MtbInfection and Disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. September, p. 2219, 2018.

MOREIRA, J. D. et al. Functional Inhibition of Host Histone Deacetylases ( HDACs )

Enhances in vitro and in vivo Anti-mycobacterial Activity in Human Macrophages and in Zebrafish. v. 11, n. February, p. 1–16, 2020.

MUSTAFA, T. et al. A mouse model for slowly progressive primary tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 50, n. 2, p. 127–136, 1999.

NARANBHAI, V. et al. Distinct Transcriptional and Anti-Mycobacterial Pro fi les of Peripheral Blood Monocytes Dependent on the Ratio of Monocytes : Lymphocytes. **EBIOM**, v. 2, n. 11, p. 1619–1626, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.027>.

NEEFJES, J.; THOLE, J.; YOUNG, D. Coronin is involved in uptake of Mycobacterium bovis BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. v. 3, 2001.

NGUYEN, L. Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. v. 90, n. 7, p. 1585–1604, 2017.

NORAZMI, M. N. Phagocytic activity and pro-inflammatory cytokines production by the murine macrophage cell line J774A . 1 stimulated by a recombinant BCG ( rBCG ) expressing the MSP1-C of Plasmodium ... Phagocytic activity and pro-inflammatory cytokines production by th. n. December, 2010.

NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 985–999, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>.

O'GARRA, A.; BRITTON, W. J. **Cytokines in Tuberculosis**. [s.l: s.n.]

OLIVEIRA, G. P. De et al. Special article Tuberculosis in Brazil : last ten years analysis – 2001 – 2010. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 218–233, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.01.005>.

ONDOV, B. D. et al. Efficient mapping of Applied Biosystems SOLiD sequence data to a reference genome for functional genomic applications. **Bioinformatics**, v. 24, n. 23, p. 2776–2777, 2008.

ONIX J CANTRES-FONSECA, WILLIAM RODRIGUEZ-CINTRÓN, F. D. O.-A. and S. B.-C. Extra Pulmonary Tuberculosis: An Overview. **Intech**, v. 32, n. July, p. 137–144, 2013.

Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-telecommunications-technologies/gps-total-electron-content-tec- prediction-at-ionosphere-layer-over-the-equatorial-region%0AInTec%0Ahttp://www.asociatiamhc.ro/wp-content/uploads/2013/11/Guide-to-Hydropower.pdf>.

OREKHOV, A. N. et al. Monocyte differentiation and macrophage polarization. v. 4, 2019.

ORME, I. M.; BASARABA, R. J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 601–609, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.009>.

OTTENHOFF, T. H. M.; KUMARARATNE, D.; CASANOVA, J. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunology**, v. 19, n. 11, p. 491–494, 1998.

P.B. DANIELSON, B. S. P. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 561–597, 2005.

PAHARI, S. et al. Reinforcing the functionality of mononuclear phagocyte system to control tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, 2018.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.

PANDEY, A. K.; SASSETTI, C. M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. v. 2008, 2008.

PANIGRAHI, P. Probiotic bacteria change Escherichia coli-induced gene expression in cultured colonocytes: Implications in intestinal pathophysiology. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 47, p. 6370, 2007.

PARK, J. et al. Functional methylome analysis of human diabetic kidney disease Graphical abstract Find the latest version : Functional methylome analysis of human diabetic kidney disease. v. 4, n. 11, 2019.

PARSAK, C. K. et al. Isolated Hepatic Tuberculosis Presenting as Cystic-Like and Tumour-Like Mass Lesions. **Case Reports in Gastroenterology**, v. 2, n. 1, p. 18–21, 2008.

PATHAK, A. N. “ In-Silico Design and Analysis of CYYR1- A Putative Gene / Protein Involved in Neuroendocrine Tumors . ”. v. II, n. 11, p. 14221–14234, 2015.

PERRI, F. et al. Epigenetic control of gene expression : Potential implications for cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 111, p. 166–172, 2017.

PIERRE, W. C. et al. Alteration of the brain methylation landscape following postnatal inflammatory injury in rat pups. **FASEB Journal**, v. 34, n. 1, p. 432–445, 2020.

POLLARD, B. J.; KITCHEN, G. Bones and Joints Tuberculosis. **Handbook of Clinical Anaesthesia, Fourth Edition**, n. March 2007, p. 225–242, 2017.

POORAN, A. et al. IL-4 subverts mycobacterial containment in Mtb-infected human macrophages. p. 1–13, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.02242-2018>.

PRADHAN, G.; SHRIVASTVA, R.; ALERTS, E. Mycobacterial PknG Targets the Rab7l1 Signaling Pathway To Inhibit Phagosome − Lysosome Fusion. 2021.

PRADOS-ROSALES, R. et al. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 4, p. 1471–1483, 2011.

PRASANNA, A.; NIRANJAN, V. Classification of MtbDR , MDR , XDR Isolates and Identification of Signature Mutation Pattern of Drug Resistance. v. 15, n. 4, p. 261–268, 2019.

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 709–717, 2002.

QIN, J. et al. Histone Modifications and their Role in Colorectal Cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 26, n. 4, p. 2023–2033, 2020.

QUEIROZ, A.; RILEY, L. W. Bacterial immunostat: Mtblipids and their role in the host immune response. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 9–18, 2017.

QUEVAL, C. J. et al. MtbControls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated

Signaling. **Cell Reports**, v. 20, n. 13, p. 3188–3198, 2017.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. 2 SUPPL. 1, 2006.

RAGHURAMAN, S. et al. The Emerging Role of Epigenetics in Inflammation and Immunometabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 11, p. 782–795, 2016.

RAJ, A. et al. Comparative evaluation of several gene targets for designing a Multiplex-PCR for an early diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 1, p. 88–96, 2016.

RAJAGOPALA, S. et al. Latent MtbInfection in liver transplant recipients-Controversies in current diagnosis and management. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 1, n. 1, p. 34–37, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0973-6883(11)60120-5>.

RAJAN, P. K. et al. The role of histone acetylation-/methylation-mediated apoptotic gene regulation in hepatocellular carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 1–21, 2020.

RATNAM, S. et al. Hormonal Regulation of Cystathionine □ -Synthase Expression in Liver *. v. 277, n. 45, p. 42912–42918, 2002.

RAY, A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. **MOJ Immunology**, v. 4, n. 2, 2016.

REAMON-BUETTNER, S. M. et al. Transcriptomic analysis reveals priming of the host antiviral interferon signaling pathway by bronchobini® resulting in balanced immune response to rhinovirus infection in mouse lung tissue slices. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

REFAELI, Y. et al. Interferon γ is required for activation-induced death of T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 7, p. 999–1005, 2002.

REIS-SANTOS, B. et al. Tuberculosis in Brazil and cash transfer programs: A longitudinal database study of the effect of cash transfer on cure rates. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–18, 2019.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e47, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605792%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4402510>.

ROHDE, K. et al. Mtband the environment within the phagosome. v. 219, p. 37–54, 2007.

ROSANNA, D. P.; SALVATORE, C. Reactive Oxygen Species , Inflammation , and Lung Diseases. n. Xd, p. 3889–3900, 2012.

ROWLEY, J. W. et al. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. **Blood**, v. 118, n. 14, p. 101–112, 2011.

SAINI, V. et al. Hydrogen sulfide stimulates Mtbrespiration, growth and pathogenesis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-14132-y>.

SANCHES, I.; CARVALHO, A.; DUARTE, R. Who are the patients with extrapulmonary tuberculosis? **Revista Portuguesa de Pneumologia** , v. 21, n. 2, p. 90–93, 2015.

SANTOS, J. M. P. D. C. D. S.-M. A. C. D. V. T. A. N. Effect of triamcinolone in keloids morphological changes and cell apoptosis. v. 42, n. 3, p. 171–174, 2015.

SARAO, V.; VERITTI, D.; LANZETTA, P. Triamcinolone Acetonide for the Treatment of Diabetic Macular Oedema. **European Ophthalmic Review**, v. 06, n. 01, p. 28, 2012.

SCANGA, C. A. et al. MyD88-Deficient Mice Display A Profound Loss in Resistance to MtbAssociated with Partially Impaired Th1 Cytokine and Nitric Oxide Synthase 2 Expression. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2400–2404, 2004.

SCANGA, C. A.; FLYNN, J. L. Modeling Tuberculosis in Nonhuman Primates. n. 3, p. 1–16, 2014.

SCHAUM, N. et al. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. **Nature**, v. 562, n. 7727, p. 367–372, 2018.

SEILER, P. et al. Limited mycobacterial infection of the liver as a consequence of its

microanatomical structure causing restriction of mycobacterial growth to professional phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7922–7926, 2001.

SELVARAJ, P. et al. CCL5 (RANTES) gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of south India. **International Journal of Immunogenetics**, v. 38, n. 5, p. 397–402, 2011.

SENGUPTA, S. et al. MtbEsxL inhibits MHC-II expression by promoting hypermethylation in class-II transactivator loci in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 17, p. 6855–6868, 2017.

SHAH, J. A. et al. Human TOLLIP Regulates TLR2 and TLR4 Signaling and Its Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to Tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1737–1746, 2012.

SHAH, N. et al. A crowdsourcing approach for reusing and meta-analyzing gene expression data. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 803–806, 2016.

SHARMA, D.; KC, S.; JAISI, B. Prevalence of Tuberculosis in Patients with Liver Cirrhosis. **Journal of Nepal Health Research Council**, v. 15, n. 3, p. 264–267, 2018.

SHERMAN, D. R. et al. MtbH37Rv:ΔRD1 is more virulent than M. bovis Bacille Calmette-Guérin in long-term murine infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 1, p. 123–126, 2004.

SIGAL, G. B. et al. Biomarkers of Tuberculosis Severity and Treatment Effect: A Directed Screen of 70 Host Markers in a Randomized Clinical Trial. **EBioMedicine**, v. 25, p. 112–121, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.018>.

SILVA, D. R. et al. Risk factors for tuberculosis : diabetes , smoking , alcohol use , and the use of other drugs. v. 44, n. 2, p. 145–152, 2018.

SM BEHAR, CJ MARTIN, MG BOOTY, T NISHIMURA, X ZHAO, H GAN, M DIVANGAHI, H. R. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 279–287, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2011.3>.

SON, C. G. et al. Database of mRNA gene expression profiles of multiple human organs.

**Genome Research**, v. 15, n. 3, p. 443–450, 2005. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/content/15/3/443.abstract>.

SONESON, C.; DELORENZI, M. Comparison of Differential Expression Analysis. 2013.

SOOD, R.; KAMIKUBO, Y.; LIU, P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. **Blood**, v. 129, n. 15, p. 2070–2082, 2017.

SUBBIAN, S. et al. Spontaneous Latency in a Rabbit Model of Pulmonary Tuberculosis. **AJPA**, v. 181, n. 5, p. 1711–1724, 2012.

SUDHA, S. Tuberculosis diagnosis - An overview to the conventional diagnostic methodology and need for nanodiagnosis. **International Journal of Medical Engineering and Informatics**, v. 8, n. 1, p. 27–40, 2016.

SURGERY, M. HDAC8 , A Potential Therapeutic Target , Regulates Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells in Fibrous Dysplasia. p. 148–161, 2019.

TAKAHASHI, K. Influence of bacteria on epigenetic gene control. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 6, p. 1045–1054, 2014.

TAMGUE, O. et al. Differential targeting of c-Maf, Bach-1, and Elmo-1 by microRNA-143 and microRNA-365 promotes the intracellular growth of Mtbin alternatively IL-4/IL-13 activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–16, 2019.

THOBAKGALE, C. et al. Interleukin 1-beta (IL-1β) production by innate cells following TLR stimulation correlates with TB recurrence in ART-treated HIV infected patients. v. 74, n. 2, p. 213–220, 2018.

TROWBRIDGE, J. M.; GALLO, R. L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology**, v. 12, n. 9, p. 117R–125R, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwf066>.

TUMORS, N. “ In-Silico Design and Analysis of CYYR1- A Putative Gene / Protein Involved in “ In-Silico Design and Analysis of CYYR1- A Putative Gene / Protein Involved in Neuroendocrine Tumors . ”. n. November, 2018.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>.

UHLEN, M. et al. Transcriptomics resources of human tissues and organs. **Molecular Systems Biology**, v. 12, n. 4, p. 862–862, 2016.

VAN CREVEL, R. et al. Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, n. June 2014, 2011.

VELLANKI, R. N.; ZHANG, L.; VOLCHUK, A. OASIS/CREB3L1 Is Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in Human Glioma Cell Lines and Contributes to the Unfolded Protein Response, Extracellular Matrix Production and Cell Migration. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

VERMA, D. et al. Anti-mycobacterial activity correlates with altered DNA methylation pattern in immune cells from BCG-vaccinated subjects. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12110-2>.

VERMA, R.; PATIL, T. B.; LALLA, R. Disseminated tuberculosis manifesting as pulmonary, meningeal and spinal tuberculosis in an immunocompetent patient. **BMJ Case Reports**, n. December, 2012.

VERZA, M. et al. Genomic epidemiology of Mtbin Santa Catarina , Southern Brazil. **Scientific Reports**, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69755-9>.

VICTORIA M. RICHON*†,STEPHANE EMILIANI‡§,ERIC VERDIN‡§,YAEL WEBB¶,RONALD BRESLOW¶, RICHARD A. RIFKIND*, A. P. A. M. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. v. 95, n. March, p. 3003–3007, 1998.

VILLASEÑOR, T. et al. Activation of the Wnt pathway by Mycobacterium tuberculosis: A Wnt-Wnt Situation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–16, 2017.

VINCENT R. TATCO, M. M. A. M.-S. and J. A. U. The Many Faces of Hepatic Tuberculosis. **WFPI TB Corner**, v. 1, n. November, p. 1–6, 2015. Disponível em:

<http://www.wfpiweb.org/Portals/7/Outreach/Hepatic-TB-Imaging.pdf>.

VINCI, M. C. Sensing the Environment: Epigenetic Regulation of Gene Expression. **Journal of Physical Chemistry & Biophysics**, v. S3, n. 01, p. 1–6, 2014.

VITALE, L. et al. Cysteine and tyrosine-rich 1 (CYYR1), a novel unpredicted gene on human chromosome 21 (21q21.2), encodes a cysteine and tyrosine-rich protein and defines a new family of highly conserved vertebrate-specific genes. **Gene**, v. 290, n. 1–2, p. 141–151, 2002.

WAKIM, K. G. Physiology of the liver. **The American Journal of Medicine**, v. 16, n. 2, p. 256–271, 2017.

WANG, R. et al. Persistent Mtbinfection in mice requires PerM for successful cell division. **eLife**, v. 8, p. 1–21, 2019.

WANG, X. The prognostic value of differentially expressed CYP3A subfamily members for hepatocellular carcinoma. p. 1713–1726, 2018.

WANG, Z. et al. Meta-analysis of human gene expression in response to Mtbinfection reveals potential therapeutic targets. **BMC Systems Biology**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2018.

WARNES, G. et al. Package ‘ gtools ’. n. June 2016, 2005.

WEAVER, I. C. G. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–854, 2004.

WEAVER, I. C. G. Genomics, Proteomics, and the Nervous System. v. 2, n. November 2011, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7197-5>.

WHITLOW, E.; MUSTAFA, A. S.; HANIF, S. N. M. An overview of the development of new vaccines for tuberculosis. **Vaccines**, v. 8, n. 4, p. 1–13, 2020.

WHO, 2020. **Global tuberculosis report 2020. World Health Organization; 2020.** [s.l: s.n.]v. 4

WIECZOREK, G. et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. **Cancer Research**, v. 69, n. 2, p. 599–608, 2009.

WINCHESTER, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. **Glycobiology**, v. 15, n. 6, p. 1–15, 2005.

WONGCHANA, W. et al. Notch signaling regulates the responses of lipopolysaccharide-stimulated macrophages in the presence of immune complexes. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–20, 2018.

WU, Z. et al. Diagnosis and treatment of hepatic tuberculosis: Report of five cases and review of literature. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 9, p. 845–850, 2013.

XIE, P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. **Journal of Molecular Signaling**, v. 8, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Journal of Molecular Signaling>.

XU, X. et al. Human and mouse microarrays-guided expression analysis of membrane protein trafficking-related genes in MDCK cells, a canine epithelial model for apical and basolateral differential protein targeting. **Biochimie Open**, v. 4, p. 119–126, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2017.04.002>.

YANG, H.; LU, S. COVID-19 and tuberculosis. [s.d.]

YANG, Y. et al. Myosin VIIB from Drosophila is a high duty ratio motor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 37, p. 32061–32068, 2005.

YASEEN, I. et al. Histone methyltransferase SUV 39H1 participates in host defense by methylating mycobacterial histone-like protein HupB . **The EMBO Journal**, v. 37, n. 2, p. 183–200, 2018.

ZHAI, W. et al. The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis. 2019.

ZHANG, L. et al. Impaired autophagy triggered by HDAC9 in mesenchymal stem cells accelerates bone mass loss. v. 6, p. 1–16, 2020.

ZHANG, N. et al. Keratin 23 promotes telomerase reverse transcriptase expression and human colorectal cancer growth. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 7, p. e2961-11, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.339>.

ZHANG, X. et al. Interaction between p53 and Ras signaling controls cisplatin resistance via HDAC4- and HIF-1 α -mediated regulation of apoptosis and autophagy. v. 9, n. 4, 2019.

ZHOU, N. et al. RUNX proteins desensitize multiple myeloma to lenalidomide via protecting IKZFs from degradation. **Leukemia**, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0403-2>.

ZHOU, X. et al. Cloning and characterization of a histone deacetylase , HDAC9. 2001.

ZILLE, A. I. et al. Social determinants of pulmonary tuberculosis in Brazil : an ecological study. p. 1–9, 2019.