

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Da Saúde  
**Mestrado**

**AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À HIPÓXIA ASSOCIADOS  
À RESPOSTA IMUNE INATA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE  
PULMONAR ATIVA E LATENTE**

**ALINE DE OLIVEIRA REZENDE**

São Luís – MA  
2021

ALINE DE OLIVEIRA REZENDE

**AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À HIPÓXIA ASSOCIADOS  
À RESPOSTA IMUNE INATA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE  
PULMONAR ATIVA E LATENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira

São Luís – MA  
2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Rezende, Aline de Oliveira.

AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À HIPÓXIA ASSOCIADOS À  
RESPOSTA IMUNE INATA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR  
ATIVA

E LATENTE / Aline de Oliveira Rezende. - 2021.

61 f.

Coorientador(a): Paulo Vitor Soeiro Pereira.

Orientador(a): Eduardo Martins de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
Universidade Federal do Maranhão, on-line, 2021.

1. Fator induzido por hipóxia - HIF-1a. 2. Infecção  
latente de tuberculose. 3. Tuberculose. I. Soeiro  
Pereira, Paulo Vitor. II. Sousa, Eduardo Martins de. III.  
Título.

ALINE DE OLIVEIRA REZENDE

**AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À HIPÓXIA ASSOCIADOS  
À RESPOSTA IMUNE INATA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE  
PULMONAR ATIVA E LATENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 22 / 11 / 2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof(a). Dr(a). Ana Paula Azevedo  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof(a). Dr(a). Rosane Guerra  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof(a) Dr(a). Adeliane Castro Costa  
Faculdade Estácio de Sá de Goiás -FESGO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força, coragem inteligência e sabedoria para concluir este trabalho. A Ele Toda honra e toda Glória!!

Sou imensamente grata à minha família, meus pais Vera e Paulo, pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida, principalmente em todas as minhas decisões acadêmicas. Sempre me ensinando a buscar o melhor, e sempre acreditando em mim! Sem vocês nada seria possível! Amo vocês!!

Agradeço de todo coração ao meu orientador Professor Dr. Eduardo Martins de Sousa por me aceitar como orientanda, e pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho. Agradeço por todas as oportunidades que me ofereceu por ter acreditado em mim, desde antes do início do Mestrado. Suas orientações, ensino e apoio ao longo dessa jornada contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Serei imensamente grata por tudo que aprendi neste tempo!

A Professora Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis ao Professor Dr. André Kipnis pelas orientações com sabedoria, paciência e dedicação, também pela oportunidade de me permitir realizar parte dos meus experimentos em seu laboratório. Agradeço imensamente por terem me recebido em sua casa e pelo tempo dedicado em reuniões e afins para a melhora do nosso trabalho. O tempo que estive no laboratório de Imunopatologia foi essencial para o meu crescimento. Meus sinceros agradecimentos. O Lab de Imunopatologia mora no meu coração!

A professora Dra. Adeliane Castro, que foi extremamente importante para a finalização dessa dissertação. Obrigada pela ajuda, apoio nos experimentos, e por contribuir para o meu conhecimento científico, sempre me auxiliando a pensar na melhor forma de analisar os resultados e escrever. Serei sempre grata a você!

Aos Professores: Lídio Gonçalves e Rafael Carvalho pelas orientações e por todo suporte laboratorial. Muito Obrigada.

Ao professor Dr. Paulo Vitor Soeiro, por sua contribuição, pelas suas importantes considerações e co-orientação nesse trabalho. Agradeço por sua disponibilidade para nos ajudar no que fosse preciso. Muito obrigada!

A equipe do Hospital Presidente Vargas, aos médicos, enfermeiros e demais membros da equipe, que nos ajudaram a recrutar os pacientes e pelos ensinamentos que tive no período das coletas deste trabalho.

A minha amiga Gabrielle Guedes, minha dupla da vida! Estamos juntas nessa caminhada desde nossa graduação, e agora estamos finalizando mais um ciclo juntas. Obrigada por estar ao meu lado sempre, confiar em mim, me ajudar e me levantar quando estive triste! Você sabe que é praticamente como uma irmã pra mim! Torço por você e sei que ainda iremos comemorar muitas vitórias juntas!! Amo você!!

Aos meus amigos da vida: Letícia Barros, Carine Amorim, Débora Caixeta, Dandara Letícia, Alex Jr, João Victor e Rhuan nem sei dizer o que seria de mim sem vocês!! Agradeço por estarem comigo nas alegrias e lutas, mesmo quando estive distante estavam ao meu lado! Obrigada pela disponibilidade em me escutar sempre quando precisei. Muito obrigada pelo apoio!

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções Respiratórias (LIMIR) da Universidade CEUMA que me ajudaram e estiveram comigo do início ao fim deste trabalho: Felipe Lobato, Rayana Ferreira, Raquel Rocha, Victória Rodrigues, Larissa Melo. Obrigada por toda a ajuda, pelas idas ao hospital, pela ajuda na separação e organização das amostras, e pela companhia do dia-a-dia. Sou muito grata a vocês!! Aos demais colegas e amigos do laboratório: Eduardo Willian, Roberval Moraes, Valéria Fontes, Danilo Moraes e Damaris Carvalho, por todo companheirismo. Muito Obrigada!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunopatologia (IPTSP-UFG) que tive a oportunidade de conhecer e conviver: Carine Castro, Laura Raniere, Ana Carolina, agradeço a vocês meninas por me receberem com todo carinho e por todos os momentos que vivemos!! Vocês ganharam um espaço muito especial no meu coração, que nossa amizade permaneça e que Deus abençoe grandemente cada uma de vocês e as recompense!!

Aos amigos que fiz durante o mestrado: Wallyson, Laís e toda a turma de mestrado 2019.1, posso dizer que ganhei amigos especiais na pós-graduação, pessoas que levarei para sempre comigo. Muito obrigada pela ajuda e companheirismo, podem contar sempre comigo!

As agências de fomento CAPES e FAPEMA pelo financiamento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (UFMA), e aos professores que fazem parte do programa, que me moldaram durante este tempo, e auxiliaram no meu crescimento.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte desse trabalho de forma direta ou indiretamente. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Histórico e epidemiologia</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Tuberculose (TB)</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4 Infecção latente de tuberculose (ILTb)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4 Imunopatologia da TB</b> .....	<b>20</b>
2.4.1 Imunidade Inata .....	20
2.4.2 Polarização de macrófagos .....	22
2.4.3 Formação do granuloma .....	23
2.4.4 Mecanismos metabólicos na resposta imune ao Mtb .....	24
<b>2.5 Fator induzido por hipóxia – HIF - 1<math>\alpha</math></b> .....	<b>25</b>
<b>2.6 Gene A20</b> .....	<b>29</b>
<b>2.7 Via de sinalização NF- <math>\kappa</math>B</b> .....	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 1:</b> .....	<b>33</b>
<b>Artigo publicado na revista Biomedicines</b> .....	<b>33</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>34</b>
<b>2. Materials and Methods</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1. Ethical Statements</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2. Chemicals and Reagents</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3. Study Population</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4. Tuberculin Skin Test</b> .....	<b>35</b>
<b>2.5. IFN-<math>\gamma</math> Release Assay</b> .....	<b>36</b>
<b>2.6. Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells</b> .....	<b>36</b>
<b>2.7. Gene Expression Analysis</b> .....	<b>36</b>
<b>2.8. 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) Levels</b> .....	<b>37</b>
<b>2.9. Cell Culture and Treatment Conditions</b> .....	<b>37</b>

<b>2.10. ELISA for NF-<math>\kappa</math>B and TNF-<math>\alpha</math> Production .....</b>	<b>37</b>
<b>2.11. Statistical Analysis.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Results.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Cytokine Gene Expression Levels in PBMCs and Levels of 25(OH)D<sub>3</sub> .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2. Gene Expression of A20 and HIF1A in PBMCs .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3. Activation of the NF-<math>\kappa</math>B Pathway in the Absence of HIF-1<math>\alpha</math> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4. TNF-<math>\alpha</math> Levels in the Absence of HIF-1<math>\alpha</math>.....</b>	<b>42</b>
<b>4. Discussion .....</b>	<b>43</b>
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>47</b>
<b>References.....</b>	<b>48</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO A: Artigo publicado na Revista Biomedicines .....</b>	<b>61</b>



## LISTA DE ABREVIACOES

<b>2-ME</b>	2-Metoxiestradiol
<b>AG</b>	Arabinogalactano
<b>AM</b>	Arabinano
<b>APC</b>	Clulas apresentadoras de antígenos
<b>BAAR</b>	Bacilo lcool cido resistente
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmette e Guri
<b>CMTB</b>	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>CFP-10</b>	Protenas de filtrado de cultura
<b>DC</b>	Clulas Dendrticas
<b>DUB</b>	Deubiquinao
<b>DTH</b>	Resposta de hipersensibilidade de tipo retardado
<b>ESAT-6</b>	Alvo antignico secretado inicial de 6 kDa
<b>FADD</b>	Proteína de domínio de morte associada a Fas
<b>GlcNAc</b>	Acetil-N-glucosamina
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IGRAS</b>	Interferon gamma release assays (Ensaio de liberao Interferon gamma)
<b>iNOS</b>	xido nítrico sintase
<b>ILTB</b>	Infeco latente de tuberculose
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator induzido por hipóxia 1 alfa
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>LAM</b>	Lipoarabinomanano
<b>LM</b>	Lipomanano
<b>ManLAM</b>	Lipoarabinomanano coberto de manose
<b>MHC-II</b>	Complexo de histocompatibilidade tipo II
<b>MNT</b>	Micobactérias não tuberculosas
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MOM</b>	Membrana externa micobacteriana
<b>MurNAc</b>	cido-N-acetil-murâmico
<b>NETs</b>	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
<b>NK</b>	Células natural killers

<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa B (Fator Nuclear Kappa B)
<b>OMS</b>	Organização mundial de saúde
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PCR-RT</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PPD</b>	Derivado proteico purificado
<b>PHDs</b>	Protil-4-hidroxilases
<b>PT</b>	Prova tuberculínica
<b>pVHL</b>	Proteína von Hippel-Lindau
<b>PRR's</b>	Receptores de reconhecimento padrão
<b>QFT-TB</b>	Quantiferon TB Gold
<b>TRADD</b>	Proteína de domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TB-HIV</b>	Coinfecção Tuberculose e HIV
<b>TB-MDR</b>	Tuberculose multidroga resistente
<b>TB-XDR</b>	Tuberculose extensivamente resistente
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TLRs</b>	Toll-Like receptors (Receptores tipo Toll)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator alfa de necrose tumoral
<b>TNF-R1</b>	Receptor do fator de necrose tumoral
<b>TST</b>	Teste cutâneo da tuberculina
<b>VDR</b>	Receptor de Vitamina D
<b>ZN</b>	Coloração de Zhiel-Neelsen
<b>WHO</b>	Organização mundial de saúde (World Health Organization)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Representação da parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</b> .....	<b>17</b>
<b>Figura 2: Imunopatologia da TB.</b> .....	<b>22</b>
<b>Figura 3: Polarização de macrófagos na infecção por Mtb.</b> .....	<b>23</b>
<b>Figura 4: Estrutura do granuloma na TB.</b> .....	<b>24</b>
<b>Figura 5: HIF-1<math>\alpha</math> em condições de normóxia e hipóxia.</b> .....	<b>27</b>

### **CAPÍTULO 1: Artigo publicado na revista Biomedicines:**

<b>Figure 1. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum 25(OH)D3 levels in patients with active tuberculosis (TB), individuals with latent tuberculosis infection (LTBI), and healthy controls.</b> .....	<b>39</b>
<b>Figure 2. Gene expression of A20 and HIF1A in PBMCs of healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB.</b> .....	<b>40</b>
<b>Figure 3. Total and phosphorylated nuclear factor kappa B (NF-<math>\kappa</math>B) levels of healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB.</b> .....	<b>41</b>
<b>Figure 4. TNF-<math>\alpha</math> levels in culture supernatants of PBMCs isolated from healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB.</b> .....	<b>42</b>
<b>Figure 5. Correlation between expression of phosphorylated NF-<math>\kappa</math>B and gene expression of HIF1A in individuals with LTBI.</b> .....	<b>43</b>
<b>Figure 6. Possible mechanisms activated in PBMCs isolated from individuals with LTBI.</b> .....	<b>47</b>

## RESUMO

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é um patógeno intracelular, agente causador da Tuberculose (TB), que infecta grande parte da população mundial. Cerca de 90-95% dos indivíduos infectados pelo Mtb, desenvolvem a infecção latente de tuberculose (ILTb), caracterizada pela formação de uma estrutura chamada de granuloma, que mantém os bacilos do Mtb no interior de um conjunto de células de defesa. O granuloma é considerado hipóxico, e a resposta a hipóxia é regulada pelo fator induzido por hipóxia – HIF-1 $\alpha$ , que tem sido associado a diversas infecções, inclusive bacterianas. Além da resposta a hipóxia, outros mecanismos envolvidos na infecção ativa, podem contribuir para o estabelecimento da infecção latente por Mtb. O presente estudo buscou avaliar como o HIF-1 $\alpha$  interfere na resposta imune inata de indivíduos com infecção ativa ou latente. Portanto, foram recrutados pacientes com TB pulmonar ativa, antes do início do tratamento, indivíduos com infecção latente de tuberculose (ILTb), que possuíam PPD+ e IGRAs+ e indivíduos saudáveis. Foi realizada expressão de citocinas (IL-15, IL-18, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e fatores de transcrição específicos (A20 e HIF-1 $\alpha$ ) que medeiam mecanismos da resposta imunológica em pacientes com TB pulmonar ativa, indivíduos ILTB e controles saudáveis. Além disso, analisou-se a ativação da via antimicrobiana dependente da vitamina D, que é ativa por citocinas pró-inflamatórias. A expressão de IL-15 foi diminuída em indivíduos ILTB e pacientes TB ativa, enquanto que a expressão de IL-18 foi semelhante entre indivíduos ILTB e controles saudáveis, ambas citocinas convergem para a ativação da vitamina D, que não demonstrou diminuição significativa. A expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 também foram menores em indivíduos ILTB. Em relação aos fatores de transcrição analisados, observou-se diminuição de A20 e HIF-1 $\alpha$ . O bloqueio do HIF-1 $\alpha$  nas PBMC de indivíduos com ILTB levou à diminuição da ativação do NF- $\kappa$ B fosforilado e ao aumento da produção de TNF- $\alpha$ , o que pode ser determinante para a condição de latência do indivíduo. A diminuição da produção de citocinas é relevante para manter a infecção latente e influenciar a ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B. Os resultados deste estudo demonstram que a ILTB é multifatorial, e vários fatores contribuem para o seu estabelecimento no hospedeiro.

**Palavras-chave:** Tuberculose; Infecção latente de Tuberculose; A20; Fator induzido por hipóxia – HIF-1 $\alpha$ ; Fator de necrose tumoral – TNF- $\alpha$ .

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is an intracellular pathogen, the causative agent of Tuberculosis (TB), which infects a large part of the world's population. About 90-95% of individuals infected with Mtb develop latent tuberculosis infection (LTBI), characterized by the formation of a structure called a granuloma, which maintains Mtb bacilli within a set of defense cells. The granuloma is considered hypoxic, and the response to hypoxia is regulated by the hypoxia-induced factor - HIF-1 $\alpha$ , which has been associated with several infections, including bacterial ones. In addition to the hypoxia response, other mechanisms involved in active infection may contribute to the establishment of latent Mtb infection. The present study investigated how HIF-1 $\alpha$  interferes in the innate immune response of individuals with active or latent infection. Therefore, patients with active pulmonary TB, before the start of treatment, individuals with latent tuberculosis infection (LTBI), who had PPD+ and IGRAs+ and healthy individuals were recruited. Expression of cytokines (IL-15, IL-18, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and specific transcription factors (A20 and HIF-1 $\alpha$ ) that mediate mechanisms of the immune response in patients with active pulmonary TB, LTBI and healthy controls was performed. In addition, the activation of the vitamin D-dependent antimicrobial pathway, which is active by pro-inflammatory cytokines, was analyzed. IL-15 expression was decreased in LTBI subjects and active TB patients, while IL-18 expression was similar between LTBI subjects and healthy controls, both cytokines converge for vitamin D activation, which did not show a significant decrease. The expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 were also lower in LTBI subjects. Regarding the transcription factors analyzed, there was a decrease in A20 and HIF-1 $\alpha$ . The blockade of HIF-1 $\alpha$  in PBMC of individuals with LTBI led to a decrease in the activation of phosphorylated NF- $\kappa$ B and an increase in the production of TNF- $\alpha$ , which may be determinant for the individual's latency condition. The decrease in cytokine production is relevant to keep the infection latent and influence the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. The results of this study demonstrate that LTBI is multifactorial, and several factors contribute to its establishment in the host.

**Keywords:** Tuberculosis; Latent Tuberculosis Infection; A20; Hypoxia-induced factor – HIF-1 $\alpha$ ; Tumor necrosis factor – TNF- $\alpha$ .

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). O Mtb pode afetar qualquer órgão do corpo humano (tuberculose extrapulmonar), afetando principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar) (OLIVEIRA et al., 2018). Em 2020, a TB obteve cerca de 10 milhões de casos novos notificados, ocasionando a 1,3 milhão de mortes e 214.000 mortes de pessoas co-infectadas com HIV no mundo (ORGANIZATION, 2021).

Cerca de um quarto de toda a população mundial pode ter sido infectado por Mtb em algum momento da vida. A maioria dos infectados (90-95%) gera uma resposta imune efetiva para possivelmente eliminar ou controlar a infecção, contendo os bacilos em uma estrutura chamada de granuloma, permanecendo clinicamente assintomática, esse estado é chamado de infecção latente de tuberculose (ILTb) e não é transmissível. No entanto, uma pequena parte (5-10%) da população desenvolve a TB de forma ativa, manifestando os sinais e sintomas e tornando-se um transmissor da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Doenças micobacterianas e a hipóxia estão intimamente ligadas (ELKS et al., 2013). O granuloma tuberculoso é considerado um ambiente hipóxico e pouco vascularizado, o que dificulta o fornecimento de nutrientes e a oxigenação das células (CARDOSO et al., 2015). De acordo com o estudo anteriores, a hipóxia pode contribuir para o fenótipo da infecção latente e resistência de Mtb devido à baixa oxigenação no granuloma (BELTON et al., 2016).

A hipóxia ocorre por meio da sinalização da célula hospedeira, via estabilização do fator induzido por hipóxia (HIF) (BAAY-GUZMAN et al., 2018). O HIF-1 $\alpha$  tem sido associado a várias doenças, desde o câncer até infecções, e é o principal gerenciador de resposta celular a baixos níveis de oxigênio (DARBY e HEWITSON, 2016). O HIF-1 $\alpha$  pode agir tanto em condições normais de oxigênio (normóxica) quanto em condições baixas de oxigênio (hipóxicas). Nas condições normais o HIF-1 $\alpha$  será hidroxilado e degradado pelo proteassoma, porém em condições hipóxicas, o HIF-1 $\alpha$  é aumentado, regulando uma série de genes induzidos por hipóxia, incluindo aqueles envolvidos na sobrevivência celular, angiogênese, apoptose, eritropoiese e metabolismo da glicose (PALAZON et al., 2014).

Estudos anteriores mostram a relação entre o HIF-1 $\alpha$  com as infecções micobacterianas. Cardoso et al (2015), demonstrou que a falta do HIF-1 $\alpha$  em macrófagos antecipa a necrose de granulomas induzidos pelo *Mycobacterium avium*, evidenciando que os

granulomas tornam-se hipóxicos antes de sofrer necrose, marcando uma evolução da infecção. Outro estudo (BRAVERMAN et al., 2016), mostrou que o HIF-1 $\alpha$  associado ao IFN- $\gamma$  melhora a ativação de macrófagos durante a infecção por Mtb, além disso, confirmou que o HIF-1 $\alpha$  coordena uma mudança metabólica para a glicólise aeróbia em macrófagos ativado com IFN- $\gamma$ .

Em um estudo realizado com camundongos infectados pelo Mtb, o HIF-1 $\alpha$  foi encontrado aumentado durante a TB ativa em macrófagos infectados em associação com o IFN- $\gamma$  melhorando a resposta de macrófagos contra a infecção aguda, concordando com estudos anteriores (BRAVERMAN et al., 2016), enquanto na TB crônica o HIF-1 $\alpha$  apresentou-se ainda mais elevado principalmente no macrófagos localizados no granuloma, e neste caso evitou-se apoptose dos macrófagos infectados, contribuindo para a sobrevivência e proliferação do Mtb (BAAY-GUZMAN et al., 2018).

Sabe-se que a resposta imunológica na TB é de extrema importância para o controle da infecção, assim como os mecanismos realizados pela célula hospedeira para o estabelecimento da ILTB, a qual é ocasionada por um equilíbrio entre a resposta imune eficaz e a capacidade de escape de Mtb. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar se a expressão de HIF-1 $\alpha$  e seus mecanismos adjacentes podem estar associados com a manutenção da infecção latente e ativa por TB.

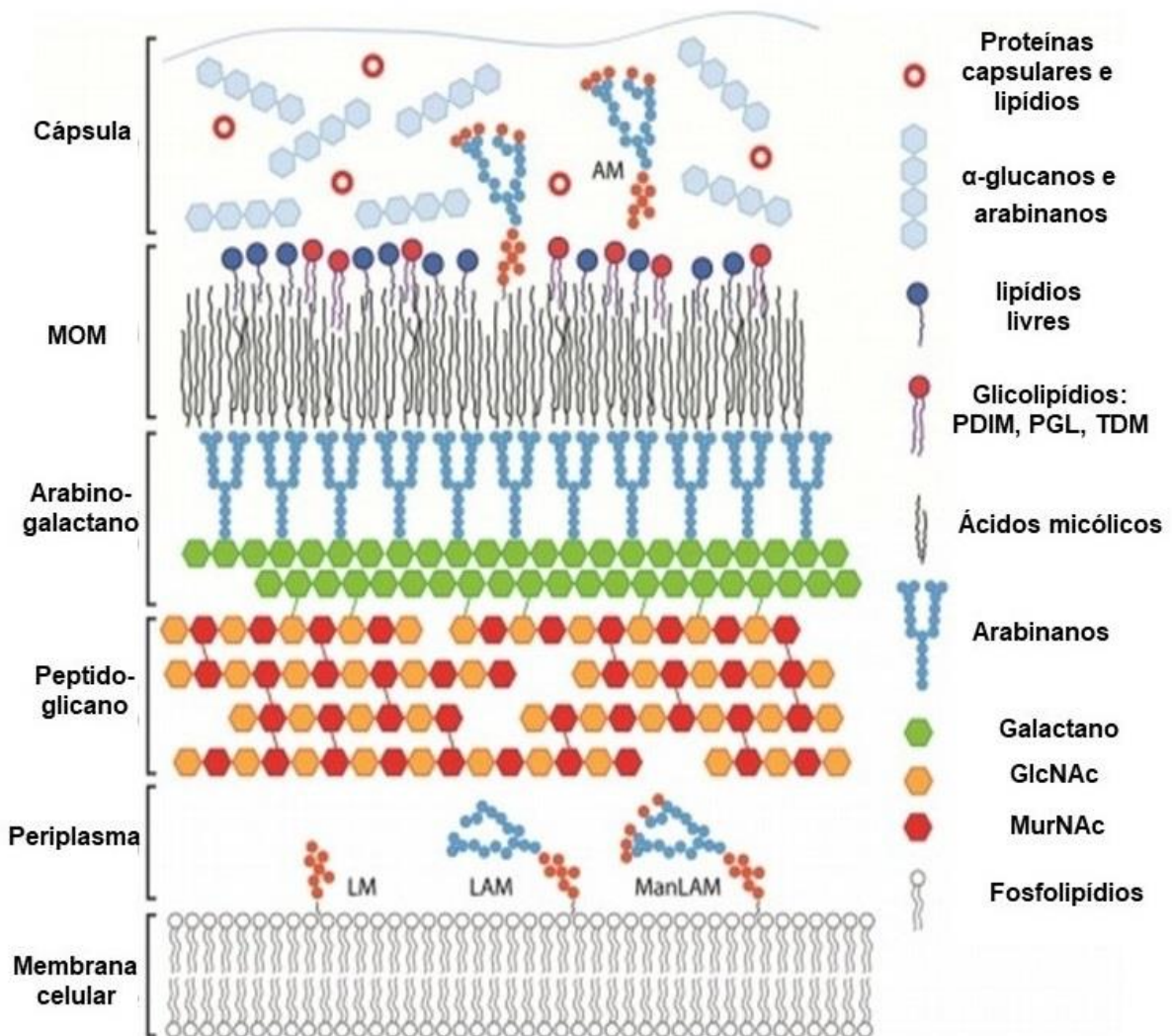
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

O Mtb é também chamado de bacilo de Koch. A composição da parede celular do bacilo é complexa, composta por uma camada interna de membrana plasmática, comum a maioria das bactérias, também possui uma camada interna de parede celular composta por peptídeoglicano covalentemente ligado à um heteropolissacarídeo arabinogalactano (AG) (Figura 1) (HOFFMANN et al., 2008).

Em sua parede celular, apresenta resíduos de arabinano (AM) ligados a ácidos graxos, representando 60% da parede celular micobacteriana e forma um revestimento chamado de micomembrana ou membrana micobacteriana externa (KIESER; RUBIN, 2014) e abaixo possui cadeias de ácido micólicos (HOFFMANN et al., 2008). A parede celular da micobactéria é rígida, e constitui uma barreira importante, permitindo manter a integridade frente a alta pressão osmótica, conforme mostrado na figura 1 (ALDERWICK et al., 2015).





**Figura 1: Representação da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*.** Representação da parede celular micobacteriana. Legenda: MOM= membrana externa micobacteriana; LM= lipomanano; LAM= lipoarabinomanano; AM= arabinano; ManLAM= lipoarabinomanano coberto de manose; GlcNAc= acetil-N-glucosamina; MurNAc= ácido-N-acetil-murâmico. **Fonte:** Raffetseder, 2016.

O Mtb é o agente etiológico da TB pertencente à ordem dos Actinomycetales, família Mycobacteriaceae. O gênero *Mycobacterium* encontra-se presente no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), que podem causar doenças humanas juntamente com: *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium. canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium suricattae* (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; SMITH, 2003).

A resistência do Mtb se dá, principalmente, por sua parede composta por ácidos micólicos e lipídicos, formando uma barreira hidrofóbica resistente, que o caracteriza por ser

álcool-ácido resistente (BAAR) (PAI et al., 2016). O Mtb possui forma de bastonete, é um patógeno intracelular, aeróbio, não capsulado, não formador de esporos, sem flagelos e medem de 1 – 5  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,3 – 0,6  $\mu\text{m}$  de largura (ZUMLA; LAWN, 2011).

## 2.2 Histórico e epidemiologia

A TB é considerada uma das doenças mais antigas do mundo (GUIMARÃES et al., 2018). Até o final do século XIX, acreditava-se também que a TB estava ligada à hereditariedade, devido ao adoecimento de várias pessoas da mesma família ao mesmo tempo. As condições de vida dos doentes eram também, consideradas importantes para a determinação da doença (GONÇALVES, 2000).

Em 1882, o bacilo de Koch foi descoberto, por Hermann Heinrich Robert Koch após isolarem o bacilo (DANIEL, 2006). Após a descoberta, a TB foi considerada uma consequência de várias associações, como as condições de vida e a carga de infecção do bacilo. Portanto, mudou-se a forma de lidar com o indivíduo infectado, retirando dele a responsabilidade da carga genética. Modificaram-se também as políticas de saúde, trazendo responsabilidade ao ministério da saúde em controlar a infecção (GONÇALVES, 2000).

No Brasil, os primeiros casos foram descritos em meados do século XIX, sendo conhecida como “A praga dos pobres”, pois foi observado que as populações mais acometidas possuíam condições de moradias insalubres, falta de higiene e alimentação deficiente (MACIEL et al., 2012). A partir do século XX, a TB foi caracterizada por altas taxas de mortalidade, sobretudo até o final dos anos 40 (ANTUNES; WALDMAN; MORAES, 2000).

Em 2020, foram diagnosticados 66.819 casos novos de TB no Brasil, correspondendo a um coeficiente de incidência de 31,6 casos/100 mil habitantes. Em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes. Na região nordeste, em 2020, foram diagnosticados 17287 casos novos, o Maranhão está em 4º lugar entre os estados da região Nordeste com maiores taxas de TB, apresentando 1955 casos novos no estado e 1785 casos de TB pulmonar. A capital do estado, São Luís, apresentou 656 casos novos de TB, representando 59,2% de incidência por 100.00 hab (COELHO DE BRITO DAIANE ALVES DA SILVA DANIELE GOMES DELL et al., [s.d.]).

### 2.3 Tuberculose (TB)

A TB integra-se no quadro de doenças negligenciadas, conhecidas como doenças tropicais causadas por agentes infecciosos ou parasitas, consideradas endêmicas em populações de baixa renda, provocada pela deficiência no saneamento básico e informação à população (SILVA e BIANCHI, 2014). A TB pode afetar vários órgãos, principalmente os pulmões (TB Pulmonar), a maioria das pessoas que desenvolvem a doença (cerca de 90%) são adultos e há mais casos entre homens do que mulheres (ORGANIZATION, 2021). Os pacientes, acometidos pela TB pulmonar, apresentam em geral febre baixa a moderada por mais de 15 dias (vespertina ou noturna), episódios de sudorese noturna, perda de peso, dor torácica, inicialmente tosse seca, podendo ser produtiva acompanhada ou não de escarro hemoptoico (BRASIL, 2019).

O diagnóstico da TB é realizado por meio de exames laboratoriais como a baciloscopia de escarro, que identifica o bacilo pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) (MAIGA; ABAZA; BISHAI, 2012). A cultura microbiológica também é realizada para detectar os bacilos que estão presentes ou não no organismo, e a cultura é considerada o teste padrão-ouro (FLORES et al., 2011). O teste rápido molecular chamado de Xpert MTB/RIF também faz parte dos testes diagnósticos para TB. O Xpert MTB/RIF utiliza a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do Mtb em amostras de escarro, e simultaneamente, as principais mutações em genes responsáveis pela resistência à rifampicina, fármaco utilizado no esquema básico para o tratamento de TB (CHANG et al., 2012).

O tratamento para TB possui a duração de 6 meses e é baseado na administração de Rifampicina, Pirazinamida, Isoniazida e Etambutol por 2 meses, e pela administração de Rifampicina e Isoniazida por mais 4 meses. Este tratamento é disponibilizado pelo governo gratuitamente. No entanto, mesmo sendo gratuito e de fácil acesso, muitos pacientes demoram a procurar auxílio médico, ou abandonam o tratamento, o que levou ao surgimento dos casos de TB multidroga resistente (TBMDR), que são aqueles resistentes a rifampicina e isoniazida, e de TB extensivamente resistente a fármacos (TBXDR), que é usada para a TB resistente a esses dois fármacos, a uma quinolona e a um aminoglicosídeo (ORGANIZATION, 2021; ZUMLA et al., 2015).

## 2.4 Infecção latente de tuberculose (ILTB)

A infecção latente por tuberculose (ILTB) consiste no estado de latência do Mtb, os bacilos permanecem em uma estrutura chamada de granuloma, que possui baixa distribuição de oxigênio e poucos nutrientes. Estima-se que cerca de 25% da população mundial apresenta uma infecção latente por tuberculose (COHEN et al., 2019) e, portanto, estejam em risco de desenvolver TB ativa durante sua vida (ANDERSEN; WOODWORTH, 2014).

Existem atualmente testes com a intenção de diagnosticar a ILTB. O primeiro teste realizado foi o teste cutâneo da tuberculina (TST) ou prova tuberculínica (PT) (TRAJMAN; STEFFEN; MENZIES, 2013). O teste consiste em medir a resposta de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH) pela aplicação intradérmica do derivado proteico purificado (PPD), que possui uma mistura de vários antígenos micobacterianos comuns ao Mtb, *M. bovis* e micobactérias não tuberculosas (MNT). Porém, a PT possui baixa sensibilidade, pois não é capaz de diferenciar entre indivíduos com a infecção por Mtb de forma ativa e indivíduos expostos a MNTs, além disso, pode ocorrer reação cruzada a vacina BCG e podendo e possui baixa sensibilidade em indivíduos com imunossupressão (GUALANO et al., 2019).

Recentemente, foram desenvolvidos os ensaios de liberação de interferon gama (IGRAs), que podem superar algumas das limitações da PT (por exemplo, reatividade cruzada em pessoas vacinadas com BCG e o erro na medição do tamanho da endureção da reação cutânea). Existem dois IGRAs que estão comercialmente disponíveis: o Gold Intube – QuantiFERON-TB Gold (QFT-TB) (Cellestis Ltd. Carnegie, Austrália) e o T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd, Oxford, Reino Unido) (AUGUSTE et al., 2017).

Os dois IGRAs disponíveis, concentram-se na resposta do interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) aos antígenos associados ao complexo específico do Mtb, o ESAT-6 e o CFP-10. O teste IGRA foi introduzido com a intenção de substituir ou auxiliar a PT, pois não possuem reação cruzada com a BCG e possui menor probabilidade de reação cruzada com a MNT, justamente por utilizarem antígenos específicos do próprio Mtb (WILSON; MILLER; STIMPSON, 2016).

## 2.4 Imunopatologia da TB

### 2.4.1 Imunidade Inata

A infecção inicial da TB, ocorre quando um indivíduo bacilífero, expete pequenas gotículas do bacilo por meio da tosse, fala ou espirro, e são inaladas pelo indivíduo saudável. As gotículas de tamanho médio são retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo muco ciliar, já as gotículas menores do bacilo conseguem ultrapassar as barreiras físicas do organismo e entram no corpo humano pelo trato respiratório inferior (DARTOIS, 2014).

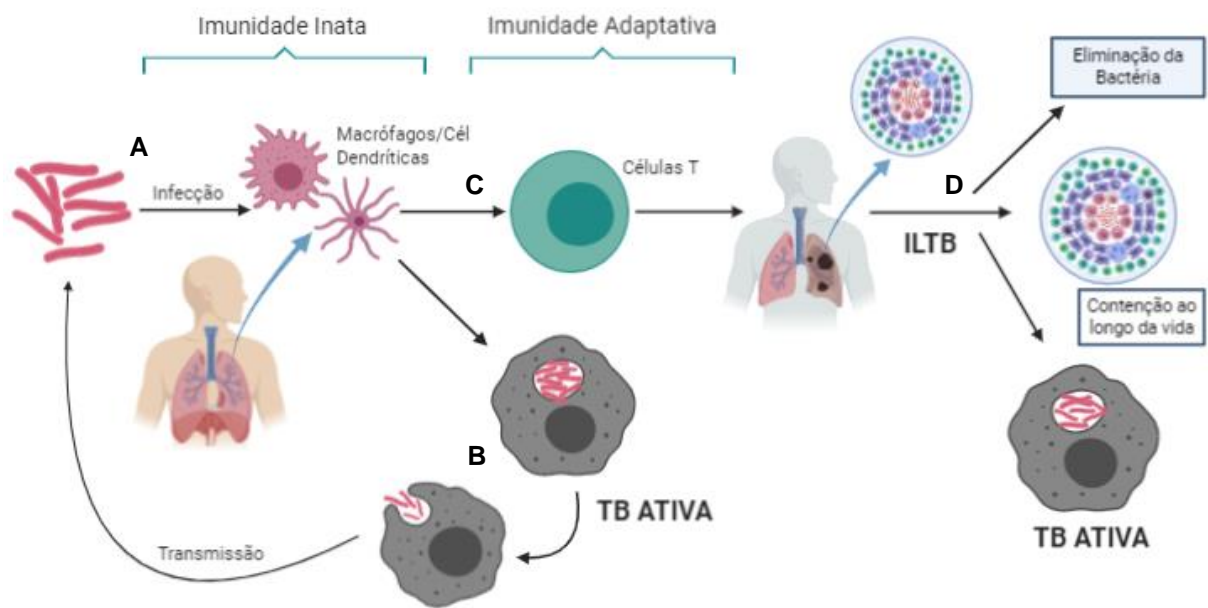
As barreiras físicas constituem a primeira linha de defesa do organismo contra o Mtb composta principalmente de células epiteliais das vias aéreas (FERLUGA et al., 2020). Estas células expressam catelicidina LL-37 após a ativação da infecção por Mtb via ativação de receptores Toll-Like (TLR2, TLR4 e TLR9), representando o papel da catelicidina na resposta imune inata (RIVAS-SANTIAGO et al., 2008).

Os bacilos adentram os pulmões chegando aos alvéolos pulmonares, onde são reconhecidas por macrófagos alveolares, células dendríticas (DC), neutrófilos e células epitelióides alveolares, conforme demonstrado na figura 2A (ERNST, 2012). Os macrófagos alveolares reconhecem os PAMPs (Padrões Moleculares associados a Patógenos) do Mtb por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRR's). Os receptores Toll Like (TLRs) são os mais importantes dentre os PRR's, principalmente, o TLR-2, TLR-4, por serem os mais envolvidos no reconhecimento do Mtb (VAN CREVEL et al., 2011).

Os bacilos são fagocitados pelos macrófagos alveolares e ficam contidos nos fagossomas (vesículas endocíticas) (DELOGU; SALI; FADDA, 2013). Os lisossomas se unem aos fagossomas, formando uma estrutura chamada de fagolisossoma, realizando a resposta imune inata do hospedeiro, que proporciona um ambiente desfavorável para o patógeno, com um pH ácido e grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são considerados tóxicos para o bacilo (SHALER et al., 2012)

Porém, a micobactéria consegue escapar do fagolisossoma, bloqueando a fusão dos fagossomas com os lisossomas, o que facilita a replicação do bacilo e sua evasão para o citoplasma do macrófago (figura 2B) (O'GARRA et al., 2013). Durante a fagocitose os macrófagos e células dendríticas funcionam também como células apresentadoras de antígenos (APCs) para os linfócitos TCD4+ por meio do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC-II) (figura 2C) e produzem citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1) capazes de recrutar outras células imunes para o local de infecção (AHMAD, 2011).

O acúmulo de células de defesa (linfócitos ativados, macrófagos infectados, macrófagos espumosos, células dendríticas, neutrófilos e outros) inicia a formação do granuloma logo após a infecção, este será coordenado pelas células T e aparenta conter a infecção (ORME; ROBINSON; COOPER, 2015). Desta forma, o Mtb permanece no interior do granuloma durante toda a vida do hospedeiro de forma latente, reaparecendo na forma ativa apenas se o indivíduo apresentar imunossupressão, conforme a figura 2D (AHMAD, 2011).

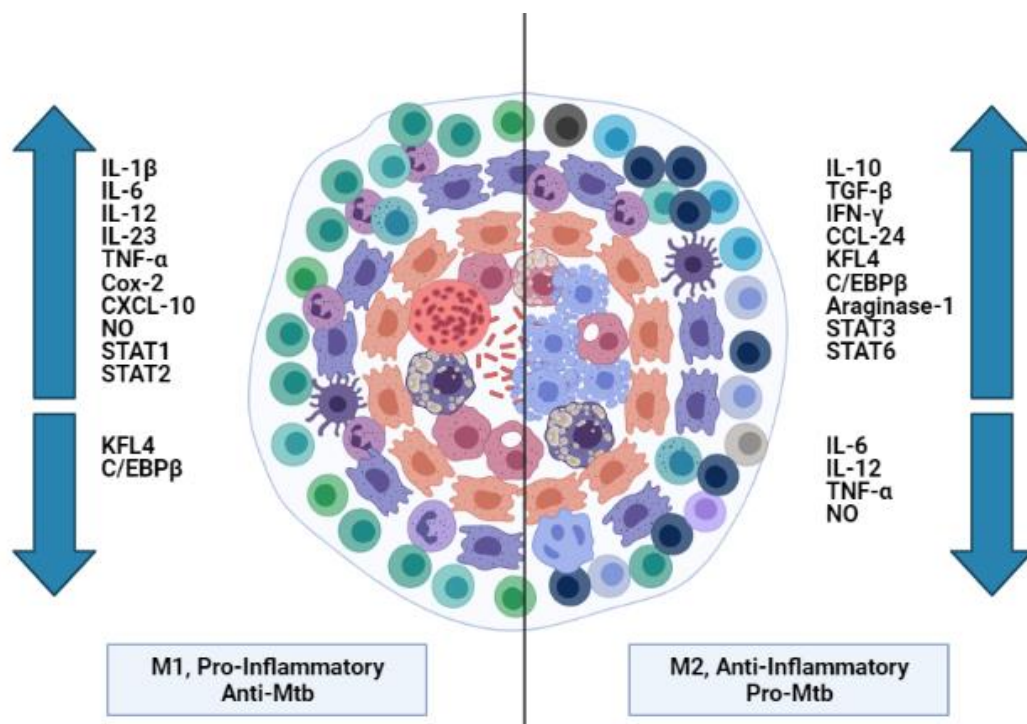


**Figura 2: Imunopatologia da TB.** (A) Bacilos são reconhecidos por macrófagos ou células dendríticas nos pulmões, ocorrendo a fagocitose do Mtb. (B) Os bacilos conseguem evadir dos macrófagos, fazendo com que o indivíduo apresente a infecção de forma ativa (TB ativa) com sinais e sintomas e se torne um transmissor da doença. (C) Macrófagos e células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (APCs), que apresentam antígenos para os linfócitos T, recrutando outras células para o local da infecção. (D) O acúmulo de células de defesa forma o granuloma, estrutura que contém os bacilos. No granuloma, os bacilos podem permanecer de forma latente. **Fonte:** Adaptado de ORME et al, 2015.

#### 2.4.2 Polarização de macrófagos

A polarização inflamatória de macrófago tipo 1 (M1), classicamente ativados e caracterizados por uma resposta pró-inflamatória, e o tipo 2 (M2), alternativamente ativados com resposta anti-inflamatória, constitui uma importante forma de evasão do Mtb. Os macrófagos M1 são mais eficazes no controle da infecção, do que os macrófagos M2, justamente devido a resposta pró-inflamatória (SHI et al., 2019).

O bacilo age direcionando o fenótipo M1 para o fenótipo M2 (expressando IL-10 e TGF- $\beta$ 1). O fenótipo M2 é impulsionado pelo fator de virulência do Mtb, o ESAT-6. O ESAT-6 inibe a maturação do fagossoma, contribuindo para a evasão dos bacilos (RUSSELL et al., 2009). O Mtb direciona a polarização dos macrófagos favorecendo o seu habitat intracelular M2, ou pode utilizar desta condição, para evitar a apoptose dos macrófagos infectados, pois o fenótipo M1 pode induzir a apoptose dos macrófagos infectados por meio da ativação de caspase-3, Bax e citocromo C (LIM et al., 2016). A figura 3 representa as citocinas envolvidas na polarização dos macrófagos.

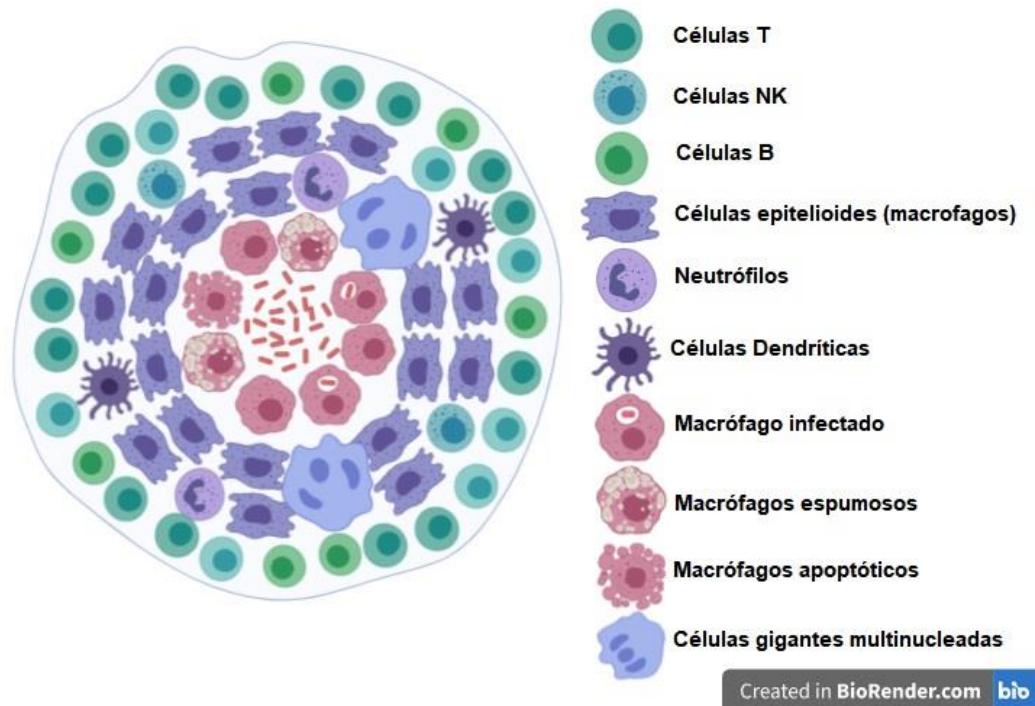


**Figura 3: Polarização de macrófagos na infecção por Mtb.** Os macrófagos são classificados como macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios). As citocinas reguladas positivamente são mostradas com setas para cima e os regulados negativamente são apresentados com as setas para baixo durante a polarização. Legenda: M1: macrófago M1; M2: macrófago M2. **Fonte:** Adaptado de Ferluga et al, 2020.

#### 2.4.3 Formação do granuloma

Os granulomas são estruturas características da infecção por Mtb (HUNTER e ACTOR, 2019). São estruturas bem organizadas com células imunes em vários estágios de diferenciação, composta de macrófagos infectados e não infectados, macrófagos espumosos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas, linfócitos B e T, fibroblastos e outros (figura 4) (RAMAKRISHNAN, 2012; RUSSELL, 2007). O granuloma cria uma interação na

resposta entre linfócitos T e macrófagos ativados pelo IFN- $\gamma$ , que agem efetivamente para impedir a multiplicação do Mtb (ALGOOD; CHAN; FLYNN, 2003).



**Figura 4: Estrutura do granuloma na TB.** O granuloma na TB é dinâmico e composto por células de defesa com a intenção de conter os bacilos e evitar a sua replicação. **Fonte:** Criado com Biorender.com, Autor.

Os granulomas podem amadurecer e exibir necrose caseosa central acumulando células necróticas, ácido micólico da parede celular do Mtb e outros resíduos lipídicos. A necrose surge do ambiente hipóxico central ocasionado pela falta de oxigenação no granuloma (RUSSELL, 2007). Além da tuberculose, doenças autoimunes e inflamatórias também produzem granulomas, incluindo a sarcoidose e doença de Crohn (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2015).

#### 2.4.4 Mecanismos metabólicos na resposta imune ao Mtb

Estudos recentes têm demonstrado o papel essencial da regulação metabólica do hospedeiro na imunidade contra o Mtb. O metabolismo de micronutrientes como vitaminas e metais é um mecanismo que possui papel importante na resposta imune, como exemplo a vitamina D que é considerada benéfica para o tratamento da TB, antes mesmo do uso de antibióticos (CHAI; LU; LIU, 2020). A vitamina D pode exercer simultaneamente efeitos



anti-inflamatórios com potencial para regular a inflamação. O Mtb estimula a ativação de TLR, que regula a expressão de genes que codificam VDR (receptor de vitamina D) e enzima CYP27B1 resultando na produção da catelicidina (LL-37), peptídeo antimicrobiano (CAMPBELL; SPECTOR, 2012).

A catelicidina, peptídeo antimicrobiano, expresso em macrófagos humanos, amplia a resposta antimicrobiana por meio da via antimicrobiana dependente da vitamina D, e por processos como inflamação e autofagia. A autofagia mediada pela catelicidina, tem sido importante na defesa do hospedeiro mediada pela vitamina D durante a infecção por Mtb (CHUNG et al., 2020; YANG et al., 2018).

Algumas citocinas pró-inflamatórias são importantes para a ativação e regulação da via antimicrobiana dependente da vitamina D. O estudo de Yang et al (2018), por exemplo, mostrou que a associação entre as citocinas IL-12/IL-18, aumentou as respostas antimicobacterianas em macrófagos humanos e células epiteliais pulmonares por meio de IFN- $\gamma$  e da via que envolve a catelicidina e consequente autofagia. Portanto, catelicidinas, juntamente com as citocinas, podem funcionar como mediadores críticos para unir as respostas imunes inatas e adaptativas durante a infecção por Mtb (CHUNG et al., 2020).

Outra citocina envolvida na via antimicrobiana dependente da vitamina D é a IL-15, que atua como regulador positivo de CYP27B1, este permite a conversão de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D3], forma inativa, circulante em 1,25-di-hidroxivitamina D [1,25(OH)2D3] biologicamente ativa, também chamada de calcitriol. Além disso, a IL-15 também é capaz de induzir VDR (receptor de vitamina D), que expressa catelicidina e induz o aumento da autofagia, inibindo o crescimento micobacteriano (KRUTZIK et al., 2008).

## **2.5 Fator induzido por hipóxia – HIF - 1 $\alpha$**

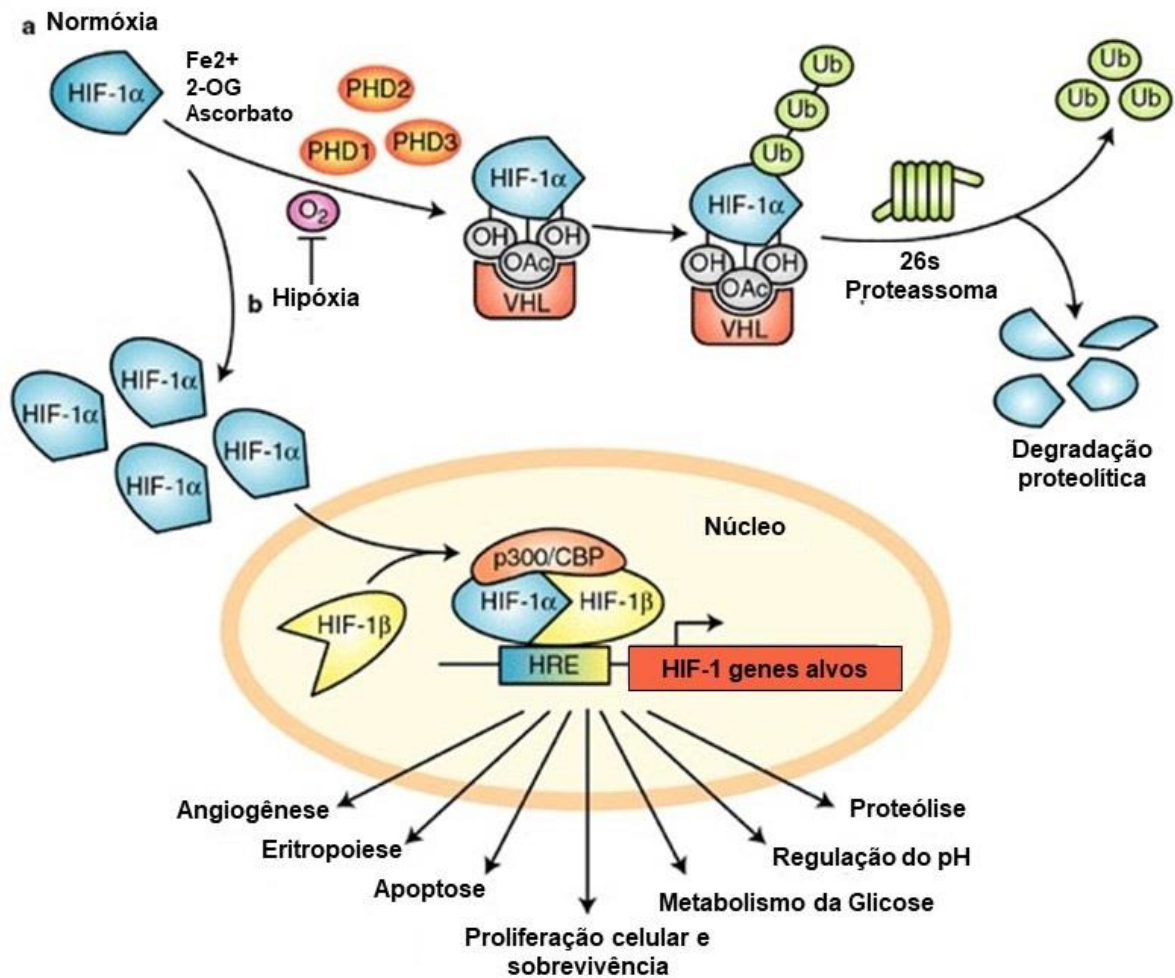
A hipóxia é regulada principalmente pelo fator induzido por hipóxia, o HIF(BAAY-GUZMAN et al., 2018). O HIF é uma proteína heterodimérica que possui subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (EGNERS; ERDEM; CRAMER, 2016). Dentre a subunidade  $\alpha$ , existem três isoformas identificadas em humanos, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ , na qual o HIF-1 $\alpha$  é um regulador chave da função de leucócitos durante a inflamação e de uma variedade de infecções bacterianas (NIZET; JOHNSON, 2009).

O HIF-1 $\alpha$  é amplamente expresso, detectado em praticamente todas as populações imunes inatas e adaptativas, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos (CRAMER et al., 2003; JANTSCH et al., 2008; MCNAMEE et al., 2013; WALMSLEY et al., 2005). A detecção de oxigênio do HIF-1 é mediada por sua subunidade reguladora, HIF1 $\alpha$ , que é degradada pelo proteossoma durante a normoxia e estabilizada na ausência de oxigênio (HUANG et al., 1998).

O HIF-1 $\alpha$  está envolvido na regulação de células imunes inatas. Em macrófagos, o HIF-1 $\alpha$  tem sido associado a regulação da expressão de moléculas de reconhecimento de patógenos, como o receptor Toll-like 4; peptídeos antimicrobianos e óxido nítrico sintase induzível (NOS2) (KIM et al., 2010), além de aumentar a atividade glicolítica dos macrófagos em exposição a hipóxia (TANNAHILL et al., 2013). Nas células dendríticas (DCs), a inibição do HIF-1 $\alpha$  prejudica a capacidade migratória das mesmas (LIU et al., 2019). Nos neutrófilos, a presença do HIF-1 $\alpha$  aumentou a sua sobrevivência e promoveu a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (MCINTURFF et al., 2012; SADIKU et al., 2017).

O HIF-1 $\alpha$  pode agir em condições normóxicas e hipóxicas. Nas condições normóxicas, o HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado por um grupo de enzimas sensíveis ao oxigênio chamadas de prolil-4-hidroxilases (PHD1, PHD2 e PHD3) (ELKS et al., 2013), permitindo a ligação de pVHL (proteína de von Hippel-Lindau), proteína supressora de tumor, responsável em levar o HIF-1 $\alpha$  para a degradação proteossomal, conforme demonstrado na figura 4 (ERLER et al., 2004; ZHANG et al., 2017).

Enquanto nas condições hipóxicas, a atividade das PHDs diminui, levando a acumulação de HIF-1 $\alpha$  e estabilizando o complexo HIF-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), este se liga a regiões promotoras de genes induzidos por hipóxia regulando uma série de genes, incluindo aqueles envolvidos na sobrevivência celular, angiogênese, apoptose, eritropoiese e metabolismo da glicose, demonstrado na figura 5 (KE e COSTA, 2006; WEIDEMANN e JOHNSON, 2008).



**Figura 5: HIF-1 $\alpha$  em condições de normóxia e hipóxia.** (A) Normóxia, em condições normais de oxigênio, o HIF-1 $\alpha$  por meio da ação das PHDs, é levado a degradação proteossomal. (B) Hipóxia, em condições baixas de oxigênio, ocorre a diminuição da ação das PHDs e o HIF-1 $\alpha$  será acumulado, levando-o a formar o complexo HIF-1 (HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ ), o complexo se une a regiões promotoras de genes (HRE), regulando uma série de genes alvo. **Fonte:** Expert Reviews in Molecular Medicine: <http://www.expertreviews.org/>. Accession information: Vol. 7; Issue 6; 15 April 2005.

A ativação do HIF-1 $\alpha$  pode ocorrer em resposta a infecções por diversos patógenos (WERTH et al., 2010). Várias espécies de Enterobacteriaceae, incluindo *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* do grupo A, já demonstraram estabilizar o HIF-1 $\alpha$  em ambas as células epiteliais e imunes (DOS SANTOS; DE ANDRADE JÚNIOR, 2017).

Hipóxia e infecções bacterianas resultam em aumento da atividade do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) em fagócitos, que por sua vez induz a transcrição de mRNA do HIF-1 $\alpha$  (CUMMINS et al., 2006; FITZPATRICK et al., 2011; RIUS et al., 2008). Outros estudos

demonstraram que o NF- $\kappa$ B, que desempenha um papel central na regulação da resposta imune à infecção, também é necessário para a resposta transcricional de mRNA de HIF-1 $\alpha$  induzida por bactérias em macrófagos (RIUS et al., 2008). O NF- $\kappa$ B induzido por HIF-1 $\alpha$  controla as funções pró-inflamatórias dos neutrófilos e sobrevive sob hipóxia (CAMPBELL et al., 2014).

O HIF-1 $\alpha$  também está presente em doenças micobacterianas, devido ao granuloma tuberculoso que é um ambiente hipoxico (PALAZON et al., 2014), tanto em modelos de camundongos quanto em modelo humano como demonstrado em estudos anteriores (BELTON et al., 2016; REECE et al., 2010). Alguns estudos realizados têm sugerido que a hipóxia dos granulomas contribui para o fenótipo da infecção latente e a resistência do Mtb ao hospedeiro (BAAY-GUZMAN et al., 2018; PALAZON et al., 2014).

O estudo realizado por Baay-Guzman et al (2018), demonstrou a presença do HIF-1 $\alpha$  em camundongos infectados pelo Mtb em duas fases importantes. Na infecção inicial pelo Mtb, o HIF-1 $\alpha$  em associação com o IFN- $\gamma$  induziu a ativação de macrófagos, controlando o crescimento do bacilo. O aumento na infecção inicial, demonstrou que o HIF-1 $\alpha$  pode ser utilizado como um marcador de gravidade da doença e da resistência a apoptose.

Na infecção tardia ou crônica, acontece a formação do granuloma, que é um ambiente totalmente hipóxico. Dessa forma, a expressão do HIF-1 $\alpha$  será aumentada nos macrófagos infectados que estão localizados no interior do granuloma, este favorecendo a infecção, evitando a apoptose dos macrófagos, e contribuindo para a proliferação do Mtb (BAAY-GUZMAN et al., 2018). No estudo, os autores utilizaram o 2-metoxiestradiol (2-ME) um metabólito endógeno natural do 17 $\beta$ -estradiol (KUMAR et al., 2016) para bloquear o HIF-1 $\alpha$ , considerado um potente inibidor do HIF-1 $\alpha$ .

A hipóxia aumenta a capacidade de sobrevivência do *M. tuberculosis*, pois o patógeno adapta-se ao ambiente (SHELL et al., 2013), induzindo um estado de dormência e tornando-se menos suscetível ao tratamento anti-micobacteriano. O microambiente hipóxico e necrótico formado pelos granulomas pode fornecer um nicho para a persistência do *M. tuberculosis* e a resistência a antibióticos (WAYNE; HAYES, 1996).

O HIF-1 $\alpha$ , também possui sua importância na via de sinalização do NF- $\kappa$ B. Bandarra et al (2015), mostrou que o HIF-1 $\alpha$  desempenha um papel importante na regulação da via do NF- $\kappa$ B, reduzindo respostas pró-inflamatória excessivas e prejudiciais durante a infecção e inflamação. O HIF-1 $\alpha$  atua restringindo a atividade transcricional do NF- $\kappa$ B, em células de

mamíferos e em *Drosophila* (BANDARRA et al., 2015). O mesmo estudo, mostrou que mesmo na ausência de HIF-1 $\alpha$ , o NF- $\kappa$ B continua sendo ativado, portanto, os pontos de feedback negativo de NF- $\kappa$ B (proteína A20, Cyld, DDX3, IAP1 e XIAP) não apresentaram diminuição significativa. O NF- $\kappa$ B pode regular o HIF-1 $\alpha$ , foi demonstrado que o bloqueio completo da via de ativação do NF- $\kappa$ B evita o HIF-1 $\alpha$  induzido por hipóxia. O estudo sugere que a transcrição de HIF-1 $\alpha$  é mediada por várias subunidades de NF- $\kappa$ B (VAN; KENNETH; ROCHA, 2008).

## 2.6 Gene A20

O gene A20, também conhecido como Proteína Induzida por TNF Alfa 3 (TNFAIP3) é um gene de sinalização anti-inflamatória que restringe várias cascatas de sinalização intracelular (MA e MALYNN, 2012). A20 é uma proteína citoplasmática, cuja expressão é regulada tanto no nível transcricional como no pós-transcricional. A20 restringe NF- $\kappa$ B por meio da modulação de moléculas de ubiquitinas que participam da via de sinalização para a transcrição e degradação de proteínas. O domínio C da proteína codificada pelo A20 permite a interação com a ubiquitina K48, enquanto que o domínio N possui função de deubiquinação (DUB), interagindo com K63 (LI et al., 2012). A20 restringe NF- $\kappa$ B também em linfócitos T via sinalização dos receptores TCR e CD40 (COORNAERT et al., 2008).

O domínio DUB de A20 permite a deubiquinação da poliubiquinação de K63 em proteína de interação com receptor 1 (RIP1), que é uma molécula de transcrição com essencial importância na via de sinalização pelo receptor do fator de necrose tumoral (TNF-RI). E o domínio C possui 7 dedos de zinco (ZF), sendo que o ZF4 possui função de ubiquitina ligase, catalisando a ligação de K48 para RIP1, carreando este para ser degradado no proteossoma. O ZF7 também regula NF- $\kappa$ B restringindo fator de crescimento beta ativador de quinase 1 (TAK1), impedindo ativação de IKK $\gamma$  (SHEMBADE; MA; HARHAJ, 2010).

O A20 também promove sinais para o aumento da sobrevivência celular, aumentando sua capacidade para regular as respostas imunológicas (VENTURA et al., 2018). Em células T, a expressão de A20 inibe a apoptose programada por TNF, no complexo TNF-R1, por meio da interação com RIP1 e da proteína de domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral (TRADD), impedindo o recrutamento da proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD) e caspase 8. (JIN et al., 2009). Em células endoteliais, a expressão de

A20 restringe a apoptose não somente via TNF, mas também pela via de Fas, estando associado com a inibição da clivagem proteolítica das caspases 8 e 2 (MA e MALYNN, 2012).

A regulação do A20 foi demonstrada no estudo de Kumar et al (2015), relacionado com a infecção pelo *M. tuberculosis*. O estudo observou que A20 mediado por miRNA let-7f, executa um papel significativo no controle da resposta imune de macrófagos infectados pelos bacilos. Durante a infecção por *M. tuberculosis* a regulação diminuída do let-7f aumenta a expressão do A20, conseqüentemente diminuindo a ativação do NF- $\kappa$ B facilitando a sobrevivência bacteriana, através da supressão de inúmeros fatores como apoptose, produção de quimiocinas, citocinas, espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (KUMAR et al., 2015).

## **2.7 Via de sinalização NF- $\kappa$ B**

O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é uma família de fatores de transcrição que coordenam as respostas inflamatórias; imunidade inata e adaptativa; a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular em quase todos os organismos multicelulares (HAYDEN; GHOSH, 2012; HOFFMANN; BALTIMORE, 2006). A família NF- $\kappa$ B é composta de cinco monômeros de proteínas (p65/RelA, RelB, cRel, NF $\kappa$ B1/p50 e NF- $\kappa$ B2/p52) (PERKINS, 2012), que formam homodímeros ou heterodímeros que se ligam ao DNA diferencialmente, e são regulados por duas vias: A via canônica, dependente do modulador essencial de NF- $\kappa$ B (NEMO); e a via não canônica, independente de NEMO (SHIH et al., 2011).

As vias de ativação canônica e não canônica, controlam a atividade de NF- $\kappa$ B por meio de múltiplos mecanismos: degradação de proteínas inibidoras de I $\kappa$ B, processamento de proteínas precursoras de NF- $\kappa$ B e expressão de proteínas monoméricas de NF- $\kappa$ B (HUXFORD; HOFFMANN; GHOSH, 2011). Os mecanismos da via de ativação canônica de NF- $\kappa$ B são mediados pelo domínio de ligação de ubiquitina do NEMO, que permite o recrutamento de IKK para as cadeias de ubiquitina K63 que é característica da sinalização inflamatória. NEMO é um substrato de ubiquitinação, de cadeias lineares de ubiquitina produzidas pela enzima LUBAC (NIU et al., 2011).

Citocinas inflamatórias como TNF e IL-1, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e sinais estimuladores imunes podem causar a ativação da fosforilação do complexo IKK dependente de NEMO (LIU et al., 2012). Após esta ativação, o complexo se

liga e fosforila proteínas I $\kappa$ B em serinas específicas no terminal N, levando à ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal (HOFFMANN et al., 2002). A degradação libera dímeros de NF- $\kappa$ B, que resulta em modificações pós-tradução, regulando o controle de expressão gênica (CHEN; GREENE, 2004).

A desregulação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B está ligada ao câncer, inflamação, doenças autoimunes e doenças infecciosas. Por este motivo existem vários mecanismos de feedback negativo e positivo que contribuem para a dinâmica complexa do NF- $\kappa$ B. Um mecanismo de feedback negativo importante é regulado pela expressão do A20 (TNFAIP3), por meio da via do TNF.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o papel do gene HIF-1 $\alpha$  e associar com a resposta imune de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e latente.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar o perfil clínico e sociodemográfico dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, e indivíduos com infecção latente de tuberculose (ILTB);
- Avaliar a associação do HIF-1 $\alpha$  com o desenvolvimento da infecção ativa e/ou ILTB;
- Realizar o bloqueio de HIF-1 $\alpha$  nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, controles saudáveis e indivíduos com ILTB;
- Avaliar a via de sinalização do NF- $\kappa$ B e correlacionar com HIF-1 $\alpha$ ;
- Realizar a dosagem de TNF dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, controles saudáveis e indivíduos com ILTB e correlacionar com HIF-1 $\alpha$ .



## CAPÍTULO 1:

Artigo publicado na revista *Biomedicines*

# Restricted Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway in Individuals with Latent Tuberculosis Infection after HIF-1 $\alpha$ Blockade

Aline de Oliveira Rezende <sup>1</sup>, Rafaela Santos Sabóia <sup>2</sup>, Adeliene Castro da Costa <sup>3</sup>, Diana Messala Pinheiro da Silva Monteiro <sup>4</sup>, Adrielle Zagnignan <sup>4</sup>, Luis Ângelo Macedo Santiago <sup>5</sup>, Rafael Cardoso Carvalho <sup>1</sup>, Paulo Vitor Soeiro Pereira <sup>1</sup>, Ana Paula Junqueira-Kipnis <sup>6</sup> and Eduardo Martins de Sousa <sup>1,2,5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão – UFMA, 65080-805, São Luís, Brazil; aline.rezende@discente.ufma.br (A.d.O.R.); carvalho.rafael@ufma.br (R.C.C.); paulo.soeiro@ufma.br (P.V.S.P.)
  - <sup>2</sup> Graduate Program in Microbial Biology, CEUMA University – UniCEUMA, 65075-120, São Luís, Brazil; rafaella021480@ceuma.com.br (R.S.S)
  - <sup>3</sup> Faculty Estácio de Sá de Goiás, 74055-190 Goiânia, Brazil; adeliene.costa@estacio.br (A.C.C)
  - <sup>4</sup> Graduate Program in Health and Services Management, CEUMA University – UniCEUMA, 65075-120 São Luís, Brazil; diana022247@ceuma.com.br (D.M.P.d.S.M.); adrielle.zagnignan@ceuma.br (A.Z.)
  - <sup>5</sup> Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology, Amazônia-BIONORTE, Federal University of Maranhão – UFMA, 65080-805 São Luís, Brazil; luis.angelo@ufma.br (L.A.M.S)
  - <sup>6</sup> Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, 74605-050, Goiânia, Brazil; ana\_kipnis@ufg.br (A.P.J-K)
- \*Correspondence: eduardo.martins@ceuma.br

**Citation:** Rezende, A.O.; Sabóia, R.S.; Costa, A.C.; Silva Monteiro, D.M.P.; Zagnignan, A.; Santiago, L.Â.M.; Carvalho, R.C.; Pereira, P.V.S.; Junqueira-Kipnis, A.P.; Sousa, E.M. Restricted Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway in Individuals with Latent Tuberculosis Infection after HIF-1 $\alpha$  Blockade. *Biomedicines* **2022**, *10*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Célia F. Rodrigues

Received: 06 February 2022

Accepted: 28 March 2022

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Tuberculous granuloma formation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), and is essential for establishing latent tuberculosis infection (LTBI) and its progression to active tuberculosis (TB). Here, we investigated whether HIF-1 $\alpha$  expression and adjacent mechanisms were associated with latent or active TB infection. Patients with active TB, individuals with LTBI, and healthy controls were recruited, and the expression of cytokine genes *IL15*, *IL18*, *TNFA*, *IL6*, *HIF1A*, and *A20* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum vitamin D (25(OH)D3) levels were evaluated. Additionally, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) levels were analyzed in PBMC lysates and culture supernatants, respectively, after HIF-1 $\alpha$  blockade with 2-methoxyestradiol. We observed that IL-15 expression was higher in individuals with LTBI than in patients with active TB, while IL-18 and TNF- $\alpha$  expression was similar between LTBI and TB groups. Additionally, serum 25(OH)D3 levels and expression of *IL-6*, *HIF1A*, and *A20* were higher in patients with active TB than in individuals with LTBI. Moreover, PBMCs from individuals with LTBI showed decreased NF- $\kappa$ B phosphorylation and increased TNF- $\alpha$  production after HIF-1 $\alpha$  blockade. Together, these results suggest that under hypoxic conditions, TNF- $\alpha$  production and NF- $\kappa$ B pathway downregulation are associated with the LTBI phenotype.

**Keywords:** tuberculosis; latent tuberculosis infection; hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ); tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ); nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). In 2020, approximately 10 million people developed TB, and 1.3 million TB-related deaths were recorded [1]. Most individuals infected with TB are asymptomatic, with the bacteria controlled in a condition called latent tuberculosis infection (LTBI). Approximately 25% of the world population is estimated to have LTBI [2]. Additionally, 5–15% of immunocompetent individuals with LTBI will progress to active TB, with an additional 5% at risk of developing active TB at some point in the infected host's life due to a natural decline in immunity [3]. TB infection is spread by the airborne transmission of Mtb bacilli; Mtb bacteria spread to the alveoli, where they are phagocytosed by alveolar macrophages. These phagocytes recognize Mtb through pattern-recognition receptors, such as toll-like receptor 2 (TLR-2), and engulf the bacteria [4].

Mtb bacilli express a wide range of virulence factors that help them survive intracellularly, including the early secretory antigen target 6 (ESAT-6) protein, which inhibits phagosome maturation [5]. ESAT-6 directly interacts with and inhibits TLR-2 [6], thereby inhibiting the production of important cytokines, including interleukin-15 (IL-15), which is responsible for mediating the activation of vitamin-D-dependent antimicrobial pathways. Inhibition of IL-15 production results in decreased activation of vitamin D, which promotes the survival of Mtb in macrophages [7,8]. Furthermore, ESAT-6 upregulates the expression in leukocytes of the A20 protein, which is a negative regulator of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) that inhibits NF- $\kappa$  signaling by blocking signaling pathways involving various receptors, including the tumor necrosis factor 1 receptor, CD40 receptor, TLR-2, neural retina leucine zipper, and IL-1 receptor (IL-1R). This blockade also results in decreased secretion of proinflammatory cytokines, chemokines, and nitric oxide, thereby promoting the survival of intracellular Mtb [9–11]. A20 is highly expressed in macrophages, as well as in mice following Mtb infection [9].

The NF- $\kappa$ B family consists of five protein monomers—p65/RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1/p50, and NF- $\kappa$ B2/p52—which form homodimers or heterodimers that differentially bind deoxyribonucleic acid (DNA). These dimers are regulated in two ways: the noncanonical pathway, which is primarily activated by developmental cues; and the canonical pathway, which is primarily activated by pathogens and inflammatory mediators. The p65:p50 heterodimer is the most abundant form of NF- $\kappa$ B that is activated via the canonical pathway through pathogen stimulation [12–15]. The canonical NF- $\kappa$ B pathway is activated by various signals, including proinflammatory signals, such as those induced by IL-1R, tumor necrosis factor (TNF)-receptor family, TLRs, and T- and B-cell receptors [16]. After cellular exposure to inflammatory agents, extracellular and intracellular receptors trigger signal transduction events that activate the IKK complex by recruiting various enzymes, including kinases involved in ubiquitin chain formation [13]. NF- $\kappa$ B signaling is responsible for the activation of several proinflammatory cytokines, such as (TNF- $\alpha$ ), IL-6, and IL-18, which are important for infection control. Excessive NF- $\kappa$ B responses are mediated by different stimuli; for instance, they can be regulated by the hypoxic response mediated by hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ). Both HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B play key roles in inflammatory responses and mycobacterial infections [17].

Mycobacterial diseases and hypoxia are closely associated due to the hypoxic nature of tuberculous granulomas, which are poorly vascularized, hindering the supply of nutrients and oxygenation of cells [18,19]. Hypoxia stabilizes HIF, which is a heterodimer composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. The HIF-1 $\alpha$  subunit is an important regulator of leukocytes during inflammation and various bacterial

infections [20–22]. The dual role of HIF-1 $\alpha$  in mycobacterial infections has been demonstrated in previous studies. According to Braverman et al. [23], HIF-1 $\alpha$  enhanced interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-mediated activation of macrophages in mice at the onset of Mtb infection. In contrast, it has also been reported that an increase in HIF-1 $\alpha$  expression promoted the survival of Mtb in a mouse model of chronic Mtb infection [20].

In addition to host-cell mechanisms that establish LTBI, immune response to Mtb is crucial for the control of Mtb infection; LTBI depends on the balance between an effective immune response and the ability of Mtb to evade immune cells. Thus, in the present study, we evaluated proinflammatory cytokines, including IL-15, IL-18, IL-6, and TNF- $\alpha$ , which are activated by the TLR-2 receptor and mediate important pathways involved in infection control, such as the vitamin-D-dependent antimicrobial pathway, in individuals with different status of TB infection; i.e., active TB, LTBI, or healthy controls. We also evaluated the expression of the NF- $\kappa$ B signaling pathway, as well as A20 and HIF-1 $\alpha$ , which are associated with the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Therefore, the present study aimed to assess whether HIF-1 $\alpha$  expression and associated mechanisms were associated with the manifestation of latent or active TB infection.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethical Statements

The present study was conducted under Resolution 466/12 of the National Health Council of Brazil, Declaration of Helsinki II (2000), and approved by the Research Ethics Committee of Universidade CEUMA, São Luís, Brazil (Protocol No. 1.803.034). Written informed consent was obtained from all study participants.

### 2.2. Chemicals and Reagents

The QuantiFERON®–TB Gold Plus, RNeasy Mini Kit, and SYBR Green PCR kit were purchased from Qiagen® (Hilden, Germany). The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and NF- $\kappa$ B p65 (Total/Phospho) Human InstantOne™ ELISA Kit were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The 2-methoxyestradiol (2-ME) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), and the BD OptEIA Human TNF Set Kit was purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA).

### 2.3. Study Population

Patients diagnosed with active pulmonary TB were recruited at Hospital Presidente Vargas, located in São Luís, Maranhão, Brazil, from March 2019 to March 2020. We used the following inclusion criteria: positive diagnosis of pulmonary TB (characteristic symptoms, suggestive radiography, positive bacilloscopy, sputum, or bronchoalveolar lavage), written consent for participation, and correct completion of a structured questionnaire.

Intrahousehold contacts of TB patients were recruited for the LTBI and healthy control groups. Participants who tested positive in the IFN- $\gamma$  release assay (IGRA) or tuberculin skin tests (TST) were considered to have LTBI. Volunteers with negative results for both IGRA and TST were included in the healthy control group, and individuals at risk of active TB were excluded.

### 2.4. Tuberculin Skin Test

For LTBI screening, 0.1 mL of tuberculin PPD RT 23 SSI (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) was intradermally administered to the left

forearm of all healthy control candidates. The skin induration reading was performed 72 h after administration. The results were based on the parameters established by the World Health Organization for positive TST (skin induration greater than or equal to 5 mm) and negative TST (skin induration lower than 5 mm).

#### 2.5. *IFN- $\gamma$ Release Assay*

For LTBI screening, 1 mL of blood was drawn into each of the following collection tubes: TB antigen tube (to evaluate the IFN- $\gamma$  response to highly specific TB antigens), mitogen tube (positive control), and control tube (negative control). The tubes were incubated at 37 °C for 16–24 h. The plasma concentration of IFN- $\gamma$  was determined using an ELISA method. The results were based on the parameters established by the test (QuantiFERON®–TB Gold) [24] and were classified as positive when the response to specific TB antigens (IU/mL) was  $\geq 0.35\%$  and  $\geq 25\%$  of nil value. Results showing a nil value of  $>8.0$  IU/mL or a mitogen value of  $<0.5$  UI/mL were considered indeterminate. The test was performed according to the manufacturer's recommendations.

#### 2.6. *Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells*

Venous blood (15 mL) was collected from patients with active TB, their household contacts, and healthy controls in heparinized tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Histopaque®-1077 density gradient centrifugation (Sigma-Aldrich) [25]. Briefly, whole blood samples were added to a conical tube with Histopaque®-1077 (3 mL) and centrifuged at  $900\times g$  for 30 min at 20 °C. Subsequently, the buffy coat containing the PBMCs was collected. PBMCs were washed twice with a phosphate buffer solution and resuspended in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complete medium (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). The cells were counted in a Neubauer chamber, and the concentration was adjusted to  $1 \times 10^7$  cells/mL. After washing, the cells were resuspended in RPMI medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and stored at  $-80$  °C.

#### 2.7. *Gene Expression Analysis*

RNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the SYBER Green PCR kit (Qiagen) to determine the expression of *HIF1A*, *A20*, *IL18*, *IL15*, *IL6*, *TNFA*, and the housekeeping gene *GAPDH*. The final reaction volume of 20  $\mu$ L contained 10  $\mu$ L of master mix (SYBR Green), 7  $\mu$ L of RNase-free water, 0.5  $\mu$ L each of the forward and reverse primers, and 2  $\mu$ L of cDNA. The primers used in the present study were purchased from DNA Express Biotecnologia LTDA (São Paulo, Brazil) and are listed below:

GAPDH:

Forward: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3',

Reverse: 5'-CTTCTACTGGTTCAGCAGCCATCT-3';

A20:

Forward: 5'-CGTCCAGGTTCCAGAACACCATTC-3',

Reverse: 5'-TGCGCTGGCTCGATCTCAGTTG -3';

IL15:

Forward: 5'-GGA ATGTAACAGAATCTGGATG-3',

Reverse: 5'-GTT ATGTCTAAGCAGCAGAG-3';

IL18:

Forward: 5'-ATCGCTTCCTCTCGCAACAA-3',

Reverse: 5'-CTTCTACTGGTTCAGCAGCCATCT-3';

HIF1A:

Forward: 5'-CATAAAGTCTGCAACATGGAAGGT-3',

Reverse: 5'-ATTTGATGGGTGAGGAATGGGTT-3';

TNFA:

Forward: 5'-CACACTCAGATCATCTTCTCAA-3',

Reverse: 5'-TTGAAGAGAACCTGGGAGTAG -3';

IL6:

Forward: 5'-ATTACACATGTTCTCTGGGAAG-3',

Reverse: 5'-TTTTACCTCTTGGTTGAAGATATG-3'.

RT-PCR was performed using QuantStudio 6 (Thermo Fisher Scientific) using the following PCR reaction conditions: initial denaturation at 95 °C for 5 min; 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. The 2- $\Delta\Delta$ CT method was used for gene-expression analysis [26]. For each sample, the  $\Delta$ Ct was calculated by subtracting the threshold cycle (Ct) values of the housekeeping gene (*GAPDH*) from those of the target genes. Then, the following formula was used to calculate  $\Delta\Delta$ Ct values:  $\Delta$ Ct (target gene) –  $\Delta$ Ct (control gene). After determining the  $\Delta\Delta$ Ct values, the formula 2- $\Delta\Delta$ CT was applied to obtain the relative gene expression.

### 2.8. 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) Levels

The serum levels of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) were evaluated using the chemiluminescence method-based Siemens Advia Centaur Classic kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA), as per the manufacturer's instructions [27]. The following reference values were used to assess vitamin D status: deficiency (<10 ng/mL), insufficiency (10–30 ng/mL), sufficiency (30–40 ng/mL), and toxicity (>100 ng/mL).

### 2.9. Cell Culture and Treatment Conditions

PBMCs stored at –80 °C were thawed, transferred to a 96-well plate, and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 3 h. Thereafter, the cells were incubated with 33 mmol/L of either DMSO or HIF-1 $\alpha$  blocker, 2-ME (Sigma-Aldrich) for 1 h [28,29]. Then, the following stimuli were added: 0.5  $\mu$ g/mL culture filtrate protein (CFP) from bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine and 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). After incubating for 1 h, the culture plates were centrifuged (800 $\times$  g for 10 min) to collect the culture supernatant, which was used for the measurement of TNF- $\alpha$  levels.

### 2.10. ELISA for NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ Production

A Total/Phospho NF- $\kappa$ B p65 (Total/Phospho) Human InstantOne™ ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific), which is a sandwich ELISA-based kit, was used to measure the levels of total and phosphorylated NF- $\kappa$ B, as per the manufacturer's instructions [30]. We used cell lysates of blood samples collected from individuals with LTBI ( $n = 10$ ) and patients with active TB ( $n = 12$ ) to measure the levels of total and phosphorylated NF- $\kappa$ B. The absorbance was read using an ELISA reader

(Multiskan RC/MS/EX Microplate Reader, Thermo LabSystems, Thermo Fisher Scientific) at a wavelength of 450 nm.

To determine the levels of TNF- $\alpha$ , we used culture supernatants collected after blockade and stimulation with CFP + PMA. TNF- $\alpha$  levels were determined in samples from the patients' samples (9 LTBI and 11 TB) using the BD OptEIA Human TNF Set Kit [28], as per the manufacturer's instructions. The optical density (OD) was measured at 450 nm using an ELISA reader (Multiskan RC/MS/EX Microplate Reader, Thermo LabSystems, Thermo Fisher Scientific). The standard curve was calculated from the readings of different concentrations of recombinant cytokines provided in commercial kits (500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 65.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, 15.6 pg/mL, 7.8 pg/mL, and 3.9 pg/mL). The actual concentrations were calculated from the standard curve ( $r^2 = 0.997$ ) using the obtained OD values.

### 2.11. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. ANOVA and post hoc *t*-test were used for statistical analysis, which was performed using GraphPad Prism version 6 software (San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

The demographic and clinical characteristics of the study participants are shown in Table 1. A total of 78 participants were recruited for this study and were distributed into three groups: 42 patients with active TB (mean age of  $35.1 \pm 13.8$  years), 17 individuals with LTBI (mean age of  $33.0 \pm 13.6$  years), and 19 healthy controls (mean age of  $31.6 \pm 10.7$  years).

**Table 1.** Clinical profile of healthy control, latent tuberculosis infection (LTBI), and active tuberculosis (TB) groups recruited at Hospital Presidente Vargas (São Luís, Brazil) from 2019 to 2020.

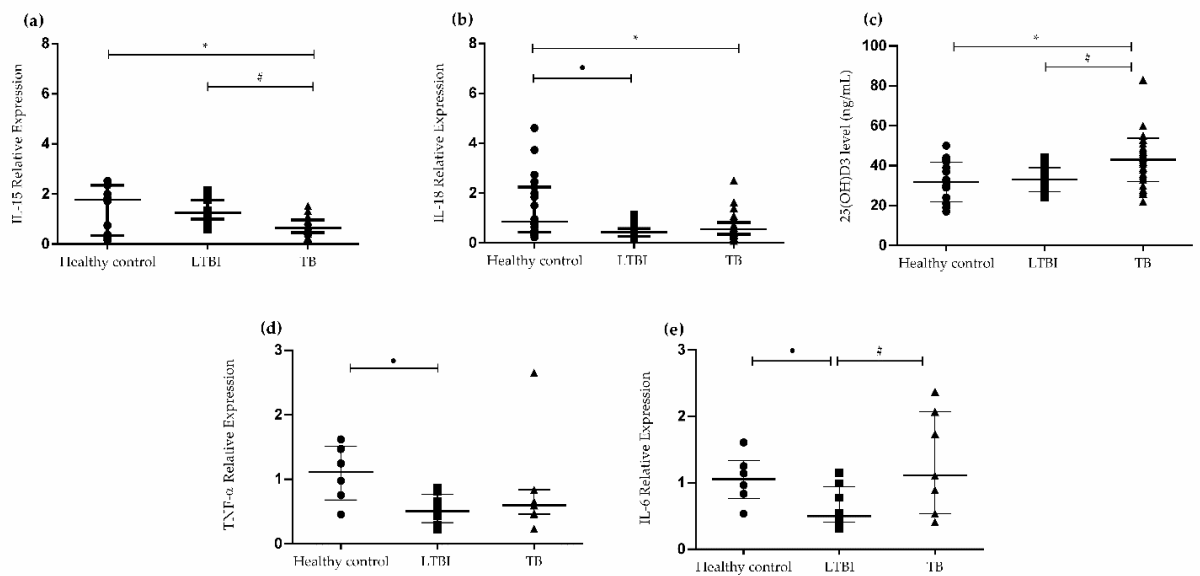
	Healthy Control	LTBI	TB
	N = 19	N = 17	N = 42
Gender (M/F)	6/13	4/13	30/12
Age (mean $\pm$ SD)	$31.6 \pm 10.7$	$33.0 \pm 13.6$	$35.1 \pm 13.8$
TST+ (>5 mm)	7	12	–
IGRAs+	0	17	–
BAAR+	–	–	42
Culture+	–	–	12
Xpert TB/RIF+	–	–	28
X-Ray+	–	–	39

–, unrealized. Abbreviations: BAAR, acid-alcohol-resistant bacillus; F, female; IGRAs, interferon-gamma release assays; LTBI, latent tuberculosis infection; M, male; SD, standard deviation; TB, tuberculosis; TST, tuberculin skin test.

### 3.1. Cytokine Gene Expression Levels in PBMCs and Levels of 25(OH)D<sub>3</sub>

To evaluate the involvement of inflammatory cytokines and 25(OH)D<sub>3</sub> in LTBI, gene expression of inflammatory cytokines and serum 25(OH)D<sub>3</sub> levels were analyzed using RT-PCR and chemiluminescence, respectively. As shown in Figure 1a, the expression of *IL-15* was significantly lower in patients with TB ( $0.70 \pm 0.06$ ) than in individuals with LTBI ( $1.3 \pm 0.13$ ;  $p < 0.0001$ ) and healthy controls ( $p =$

0.0016). However, the expression of *IL-18* was significantly lower in the LTBI ( $0.49 \pm 0.08$ ;  $p = 0.0202$ ) and active TB ( $0.65 \pm 0.08$ ;  $p = 0.0021$ ) groups than in the control group (Figure 1b). As shown in Figure 1c, serum levels of 25(OH)D<sub>3</sub> were significantly higher in patients with active TB ( $43.00 \pm 1.7$ ) than in individuals with LTBI ( $33.00 \pm 1.8$ ;  $p = 0.0052$ ) and healthy controls ( $p = 0.0006$ ). We also analyzed the expression of other important cytokines involved in the regulation of the immune response against *Mtb* infection. The expression of *TNF- $\alpha$*  was significantly lower in individuals with LTBI than in the healthy controls ( $-0.55 \pm 0.18$ ;  $p = 0.0104$ ) (Figure 1d). Similarly, the expression of *IL-6* was significantly lower in individuals with LTBI than in the healthy controls ( $0.42 \pm 0.17$ ;  $p = 0.0371$ ) and patients with active TB ( $0.66 \pm 0.29$ ;  $p = 0.0397$ ) (Figure 1e).

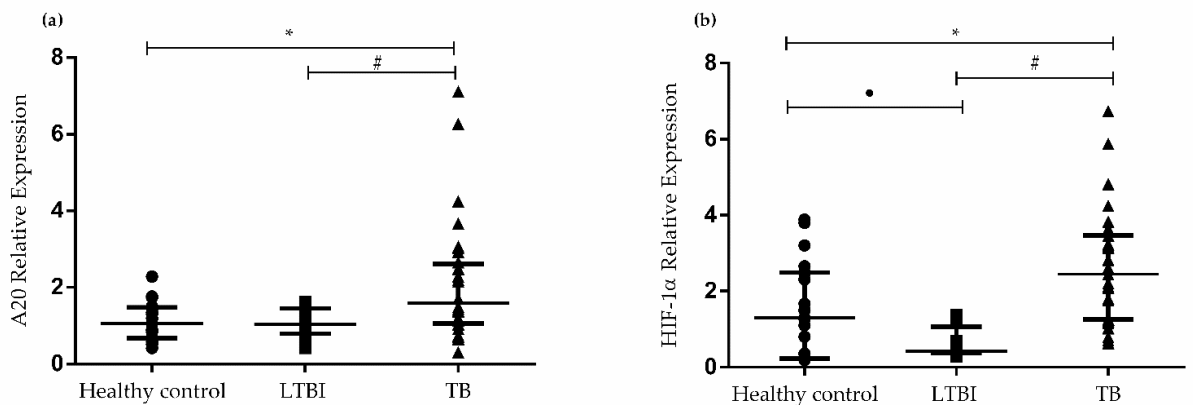


**Figure 1.** Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum 25(OH)D<sub>3</sub> levels in patients with active tuberculosis (TB), individuals with latent tuberculosis infection (LTBI), and healthy controls. (a) *IL-15* mRNA expression levels in PBMCs of patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls. \*  $p = 0.0016$  for healthy control versus TB; #  $p < 0.0001$  for LTBI versus TB. (b) *IL-18* mRNA expression levels in PBMCs of patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls. •  $p = 0.0202$  for healthy control versus LTBI; \*  $p = 0.0021$  for TB versus healthy control. (c) Vitamin D levels were assessed for patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls. \*  $p = 0.0006$  for TB versus healthy control; #  $p = 0.0052$  for TB versus LTBI. (d) Expression levels of *TNF- $\alpha$*  mRNA in PBMCs of patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls. •  $p = 0.0104$  for LTBI versus healthy control. (e) Expression levels of *IL-6* mRNA in PBMCs of patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls. •  $p = 0.0371$  for LTBI versus healthy control; #  $p = 0.0397$  for TB versus LTBI. Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) and represent one of three independent experiments. No statistically significant difference was observed between LTBI versus TB for *IL-18* and *TNF- $\alpha$* ; and healthy control versus LTBI for *IL-15* and vitamin D. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and post hoc *t*-test, with a significance of  $p < 0.05$ . Abbreviations: LTBI, latent tuberculosis infection; TB, tuberculosis.

### 3.2. Gene Expression of *A20* and *HIF1A* in PBMCs

We analyzed the relationship between gene expression of *A20* and *HIF1A* in PBMCs and Mtb infection. We evaluated the level of gene expression of *A20* in PBMCs of healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB. As shown in Figure 2a, *A20* mRNA expression was significantly higher in patients with TB ( $2.11 \pm 0.27$ ) than in healthy controls ( $1.11 \pm 0.11$ ;  $p = 0.0083$ ) and individuals with LTBI ( $1.08 \pm 0.10$ ;  $p = 0.02$ ).

Figure 2b shows the gene expression of *HIF1A* in PBMCs of healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB. The expression of *HIF1A* was significantly higher in patients with TB than in healthy controls ( $p = 0.01$ ). In contrast, *HIF1A* mRNA expression was significantly lower in individuals with LTBI ( $0.62 \pm 0.11$ ) than in patients with TB ( $2.66 \pm 0.26$ ;  $p < 0.0001$ ) and healthy controls ( $1.57 \pm 0.28$ ;  $p = 0.01$ ).



**Figure 2.** Gene expression of *A20* and *HIF1A* in PBMCs of healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB. (a) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to analyze the gene expression of *A20* in patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls. \*  $p = 0.0083$  for healthy control versus TB; #  $p = 0.0271$  for TB versus LTBI. (b) RT-PCR was performed to quantify the gene expression of *HIF1A* patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls. #  $p < 0.0001$  for TB versus LTBI; \*  $p = 0.0135$  for TB versus healthy control; •  $p = 0.0171$  for LTBI versus healthy control. Data are presented as the mean  $\pm$  (SD) and represent one of three independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA and post hoc *t*-test, with a significance of  $p < 0.05$ . Abbreviations: LTBI, latent tuberculosis infection; TB, tuberculosis.

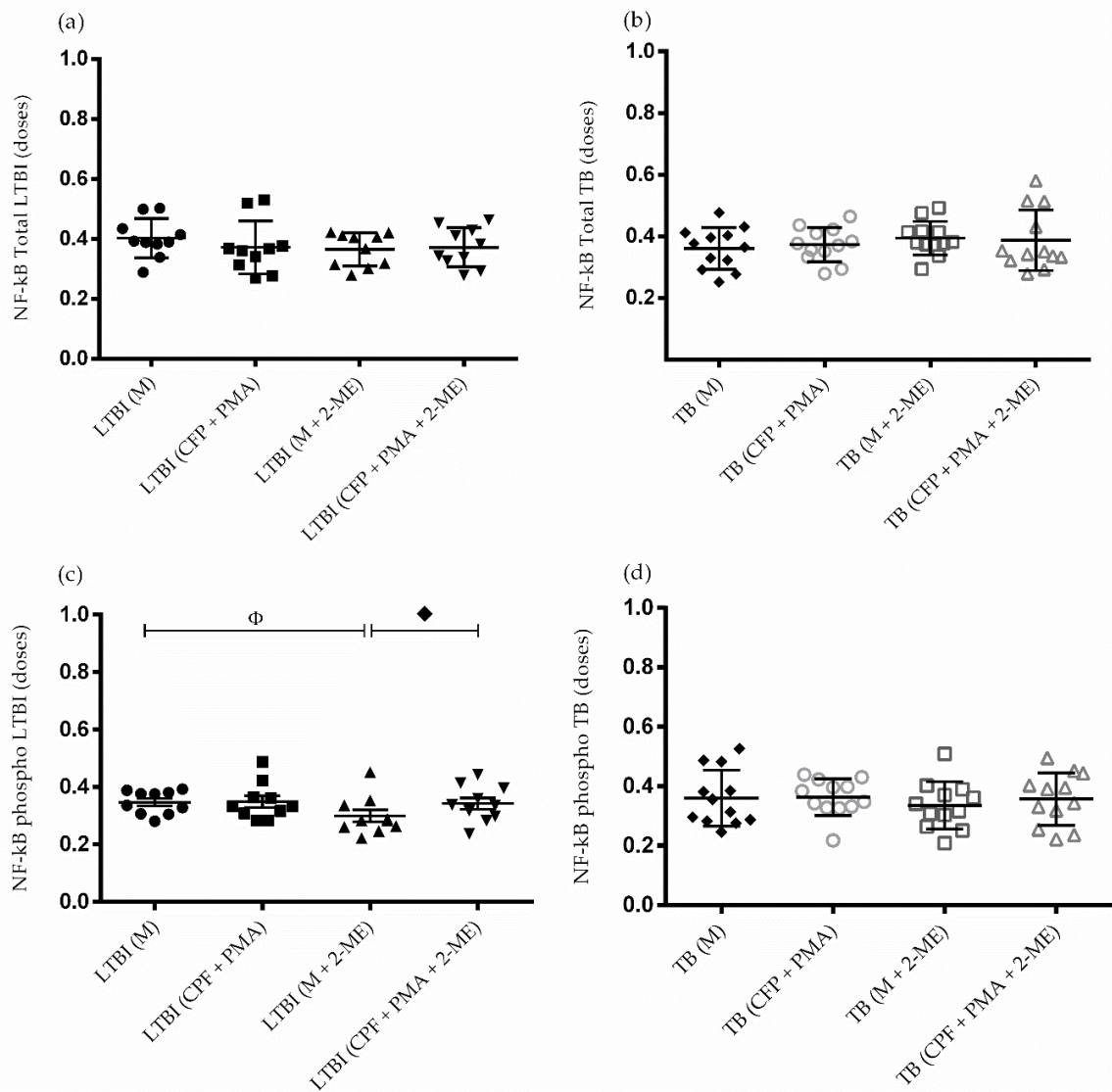
### 3.3. Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway in the Absence of HIF-1 $\alpha$

To analyze the role of the NF- $\kappa$ B pathway in LTBI, we evaluated the levels of total and phosphorylated NF- $\kappa$ B in cell lysates of PBMCs isolated from individuals with LTBI and patients with active TB before and after HIF-1 $\alpha$  blockade with 2-ME, an estradiol metabolite that inhibits the nuclear accumulation and transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  [15]. Additionally, the PBMCs were also stimulated with CFP + PMA.

No difference was observed in the expression of total NF- $\kappa$ B in cell lysates of PBMCs isolated from patients with active TB, individuals with LTBI, and healthy controls, regardless of stimulation with CFP + PMA or blockade with 2-ME (Figure 3a,b). However, expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B was statistically different between cell lysates of PBMCs from individuals with LTBI cultured without (medium alone) or with (medium + 2-ME) HIF-1 $\alpha$  inhibitor ( $p = 0.0081$ ); HIF-1 $\alpha$



blockade resulted in decreased phosphorylation of NF- $\kappa$ B. Additionally, there was a statistical difference in the expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B between cell lysates of PBMCs from individuals with LTBI treated with HIF-1 $\alpha$  inhibitor and cultured without (medium + 2-ME) and with (CFP + PMA + 2-ME) CFP + PMA ( $p = 0.0225$ ); stimulation with CFP + PMA increased phosphorylation of NF- $\kappa$ B despite HIF-1 $\alpha$  blockade (Figure 3c). However, no statistical difference was observed in the levels of phosphorylated NF- $\kappa$ B in patients with TB (Figure 3d).

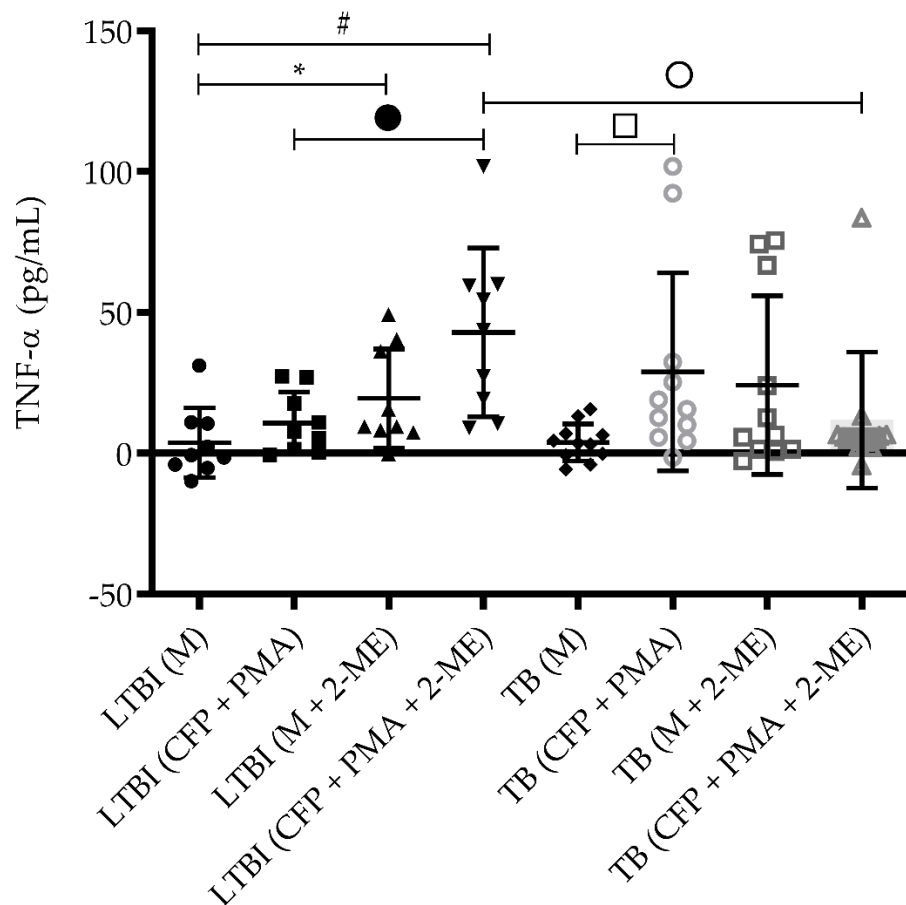


**Figure 3.** Total and phosphorylated nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) levels of healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB. Total and phosphorylated NF- $\kappa$ B levels in lysates of PBMCs were evaluated using a sandwich ELISA-based kit after stimulation with culture filtrate protein (CFP) + (phorbol 12-myristate 13-acetate) PMA, under normal conditions and HIF-1 $\alpha$  blockade with 2-methoxyestradiol (2-ME). Levels of total NF- $\kappa$ B in (a) individuals with LTBI and (b) patients with TB; there was no statistical difference between the groups after HIF-1 $\alpha$  blockade. (c) Levels of phosphorylated NF- $\kappa$ B in cell lysates of PBMCs from individuals with LTBI cultured under different conditions.  $\Phi$   $p = 0.0469$  for medium + 2-ME versus medium alone;  $\star$   $p = 0.0371$  for CFP + PMA + 2-ME versus medium + 2-ME. (d) Levels of phosphorylated NF- $\kappa$ B in cell lysates of PBMCs from patients with TB cultured under different conditions; there was no statistical difference between the

groups after HIF-1 $\alpha$  blockade. Data are presented as the mean  $\pm$  (SD) and represent one of three independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA and post hoc *t*-test, with a significance of  $p < 0.05$ . Abbreviations: pNF- $\kappa$ B, phosphorylated NF- $\kappa$ B; M, medium; CFP, culture filtrate protein; PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate; 2-ME, 2-methoxyestradiol.

### 3.4. TNF- $\alpha$ Levels in the Absence of HIF-1 $\alpha$

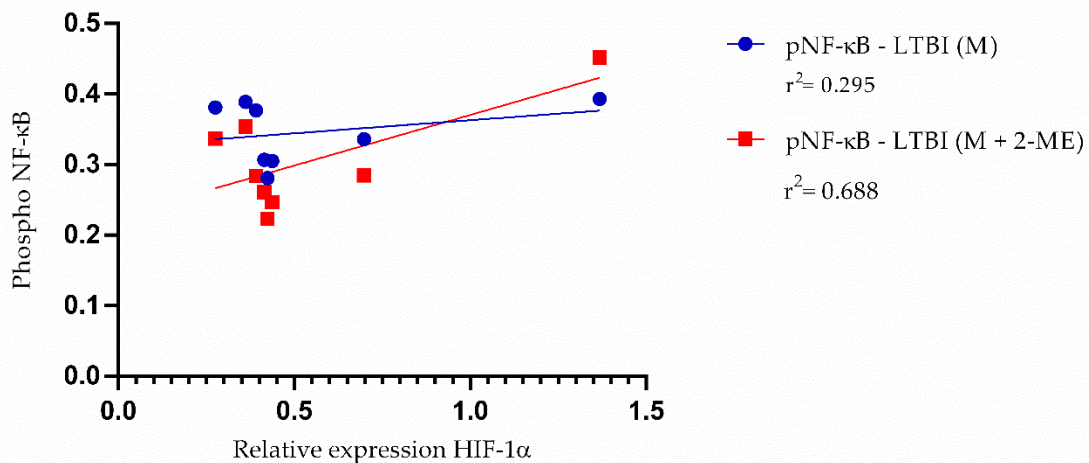
To evaluate the effect of HIF-1 $\alpha$  blockade on TNF- $\alpha$  production, we collected culture supernatants from PBMCs cultured under the same conditions used for the evaluation of NF- $\kappa$ B levels. Figure 4 shows the levels of TNF- $\alpha$  released by PBMCs isolated from individuals with LTBI and patients with TB, prior and subsequent to CFP + PMA stimulation and HIF-1 $\alpha$  blockade. The following groups showed statistically significant differences: The LTBI group showed statistically significant differences under the following conditions: medium + 2-ME versus medium alone ( $p = 0.0436$ ), CFP + PMA + 2-ME versus medium alone ( $p = 0.0023$ ), and CFP + PMA + 2-ME versus CFP + PMA ( $p = 0.0081$ ). In the TB group, there was a statistically significant difference between CFP + PMA stimulation and medium alone ( $p = 0.0307$ ). Furthermore, a statistically significant difference was noted between the LTBI and TB groups stimulated with CFP + PMA + 2-ME ( $p = 0.0190$ ).



**Figure 4.** TNF- $\alpha$  levels in culture supernatants of PBMCs isolated from healthy controls, individuals with LTBI, and patients with active TB. TNF- $\alpha$  levels in PBMC culture supernatants was determined using sandwich ELISA to determine cytokine levels in

individuals with LTBI and patients with TB. PBMCs were treated with 2-ME for HIF-1 $\alpha$  blockade and stimulated with CFP + PMA. \*  $p = 0.0436$  for LTBI (medium + 2-ME) versus LTBI (medium alone); #  $p = 0.0023$  for LTBI (CFP + PMA + 2-ME) versus LTBI (medium alone); •  $p = 0.0081$  for LTBI (CFP + PMA + 2-ME) versus LTBI (CFP + PMA); □  $p = 0.0307$  for TB (CFP + PMA) versus TB (medium alone); °  $p = 0.0190$  for TB (CFP + PMA + 2-ME) versus LTBI (CFP + PMA + 2-ME). Data are presented as the mean  $\pm$  (SD) and represent one of three independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA and post hoc t-test, with a significance of  $p < 0.05$ . Abbreviations: pNF- $\kappa$ B, phosphorylated NF- $\kappa$ B; M, medium; CFP, culture filtrate protein; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; 2-ME, 2-methoxyestradiol.

We analyzed the correlation between NF- $\kappa$ B expression and HIF1A expression in individuals with LTBI (Figure 5). Gene expression of HIF1A and expression of NF- $\kappa$ B were inversely correlated prior to HIF-1 $\alpha$  blockade ( $r^2 = 0.2951$ ) and positively correlated following HIF-1 $\alpha$  blockade ( $r^2 = 0.6889$ ).



**Figure 5.** Correlation between expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B and gene expression of *HIF1A* in individuals with LTBI. Significant correlations between gene expression of *HIF1A* and expression of phosphorylated NF- $\kappa$ B were represented by Pearson's correlation:  $r^2 = 0.2951$  for pNF- $\kappa$ B-LTBI (medium alone), with 95% confidence interval (-0.5171 to 0.8276); and  $r^2 = 0.6889$  for pNF- $\kappa$ B-LTBI (medium + 2-ME), with 95% confidence interval (-0.03070 to 0.9381). Abbreviations: pNF- $\kappa$ B, phosphorylated NF- $\kappa$ B; LTBI, latent tuberculosis infection; M, medium; 2-ME, 2-methoxyestradiol.

#### 4. Discussion

During active TB, *Mtb* uses virulence mechanisms to manipulate endogenous genes in infected cells (e.g., macrophages), thereby modifying essential cellular functions involved in microbicidal activity; this enhances the survival and replication of *Mtb* in the cells [31].

HIF-1 $\alpha$ , the main regulator of hypoxic response, plays an important role in immune responses against several pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, and mycobacteria [21]. In addition, activation of HIF mediates various metabolic processes and the expression of antimicrobial peptides, nitric oxide, and various cytokines, such as TNF $\alpha$ , IL-6, and IL-12 [19,32]. In the present study, we evaluated how HIF-1 $\alpha$  regulated the

immune response and activates cellular pathways in PBMCs of patients with active TB, individuals with LTBI, and healthy controls.

IL-15 is a cytokine produced by several immune cells, such as macrophages, monocytes, and dendritic cells, and has immunoregulatory properties [33]. We observed that *IL15* expression decreased in patients with active TB, but no significant variation was observed in individuals with LTBI compared with healthy controls. The low levels of *IL-15* in patients with active TB, but not in individuals with LTBI, observed in the present study were consistent with the findings of Chandrashekhara et al. [34], suggesting that *Mtb* infection decreased cytokine levels to survive in host cells [35].

In the present study, the observed decrease in IL-15 expression in the TB group may be attributed to the expression of ESAT-6, which directly inhibits the TLR-2 receptor responsible for the activation of IL-15. Furthermore, impairment in IL-15 expression can hinder the formation of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, as IL-15 mediates the conversion of the inactive form of vitamin D (25(OH) 2D<sub>3</sub>) to the active form (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). This conversion further activates the vitamin D receptor (VDR), which induces the production of cathelicidin [7]. Herein, we observed a significant increase in levels of 25(OH)2D<sub>3</sub> in patients with TB, which was previously reported by Owolabi et al. [27]. VDR induces the expression of antimicrobial peptides, including cathelicidin, autophagy-inducing peptides, and peptides involved in phagolysosomal fusion. This mechanism occurs through the activation of IL-15 via TLR-2 in monocytes, which in turn mediates the induction of *CYP27b1* [7].

Additionally, we analyzed the expression of *IL-18* in patients with TB, individuals with LTBI, and healthy controls, and found decreased levels of *IL-18* expression in individuals with LTBI. It was previously reported that the association of IL-18 with IL-12 can result in the production of cathelicidin, which is an antimicrobial peptide that activates the vitamin D-dependent antimicrobial pathway [36]. Moreover, other studies have shown that 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> can modulate the functions of IL-18 and suppress its production [37]. Low levels of IL-18 are suggestive of a decreased adaptive immune response, as IL-18 plays an important role in the induction of IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  is associated with the T-helper type 1 profile, which is involved in the immune response against *Mtb*; thus, a decrease in IL-18 supports the proliferation of *Mtb* [38–42].

We also evaluated other cytokines involved in the control of active and latent TB infections. TNF- $\alpha$  enhances the inflammatory response, resulting in the secretion of other cytokines, including IL-1 and IL-6, and migration of immune cells to sites of inflammation; this promotes the production of chemokines and adhesion molecules [43]. TNF- $\alpha$  expression is important for the maintenance of tuberculous granulomas and protection against reactivation of latent TB [44]. In the present study, we observed decreased *TNFA* expression in individuals with LTBI compared with that in healthy controls. In contrast, patients with active TB exhibited increased *TNFA* expression; however, the expression was lower than that in healthy controls. The increased expression of TNF- $\alpha$  in PBMCs of patients with active TB compared with that in healthy individuals was also reported by Buha et al. [39]. These results highlight the importance of TNF- $\alpha$  in the defense against mycobacteria.

IL-6 has proinflammatory roles that may contribute to the pathogenesis of TB. In the present study, the IL-6 expression level was lower in individuals with LTBI compared to that in healthy controls and patients with active TB. Additionally, IL-6 expression was higher in patients with TB than in healthy controls. High expression of cytokine IL-6 is a hallmark of inflammatory diseases, including TB [39,45].

The regulation of infection through proteins and transcription factors is another mechanism involved in the activation of macrophages during Mtb infection. A20 is an important immunoregulator that promotes Mtb survival in mouse infection models of TB [9]. Previous studies have reported a relationship between A20 protein levels and hypoxic conditions [46]. Hypoxia enhances Mtb survival and contributes to the LTBI phenotype owing to low oxygenation in tuberculous granulomas as the pathogen adapts to the environment [47–49]. Therefore, we analyzed the relationship between A20 protein and the transcription factor HIF-1 $\alpha$  expression and Mtb infection. We observed increased *A20* expression in PBMCs of patients with active TB compared with those of healthy controls and individuals with LTBI. Previous studies reported that increased expression of A20 inhibited the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Kumar et al. [9] used Mtb-infected mice and observed that let-7f miRNA-mediated regulation of A20 played a significant role in controlling the immune response of Mtb-infected macrophages. Therefore, the difference in A20 expression between individuals with LTBI and patients with active TB suggests that individuals with increased A20 expression have increased survival of Mtb bacteria.

During Mtb infection, ESAT-6 downregulates the expression of let-7f, which increases the expression of *A20*. Consequentially, this decreases the activation of NF- $\kappa$ B and facilitates bacterial survival through the suppression of numerous mechanisms, including apoptosis, and the production of chemokines, cytokines, and reactive nitrogen and oxygen species [9]. The observed increase in the expression of A20 in PBMCs of patients with active TB, as well as maintenance of its levels in individuals with LTBI, suggests the importance of immune-response regulators in the outcome of Mtb infection. In this context, the hypoxic microenvironment enhances Mtb survival and contributes to the LTBI phenotype due to low oxygenation in the granulomas; under hypoxic conditions, a dormant state is induced, and Mtb becomes less susceptible to antimycobacterial treatment [47,48].

HIF-1 $\alpha$  acts in response to systemic oxygenation by regulating the expression of more than 60 genes and is also implicated in macrophage function. HIF-1 $\alpha$  contributes to the expression of genes associated with M1 macrophage polarization, mediating the transition from a proinflammatory to an immunosuppressive phenotype while preserving the antimicrobial and protective functions of macrophages [50,51]. Our results demonstrated that the expression of *HIF1A* was decreased in individuals with LTBI and increased in patients with active TB. Consistent with our findings, previous studies have also demonstrated increased levels of HIF-1 $\alpha$  mRNA in patients with active TB [52].

Human TB lesions are severely hypoxic, and hypoxia upregulates the expression of matrix metalloproteinase-1, a collagenase central to cavity formation and infection spread [48]. Therefore, hypoxia can contribute to the worsening of infection depending on the degree of infection. In contrast, other researchers, including Braverman et al. [23], have reported that HIF-1 $\alpha$  expression was positively associated with IFN- $\gamma$  expression at the onset of Mtb infection, which could improve the activation of macrophages. These findings suggested that HIF-1 $\alpha$  may have a dual role in the progression of Mtb infection.

HIF-1 $\alpha$  is associated with the NF- $\kappa$ B inflammatory signaling pathway [53]. In the present study, patients with active TB had higher expression of *HIF1A* than individuals with LTBI; therefore, considering the existing link between HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B expression, we questioned the mechanism through which HIF-1 $\alpha$  could regulate the NF- $\kappa$ B signaling pathway in active TB. For the same, we used 2-ME, a metabolite of 17- $\beta$  estradiol that inhibits the nuclear accumulation and

transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$ , as a tool to explore HIF-1 $\alpha$ -mediated activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in PBMCs isolated from patients with active TB and individuals with LTBI [20]. We observed that HIF-1 $\alpha$  blockade decreased NF- $\kappa$ B phosphorylation in individuals with LTBI, without CFP + PMA stimulation. Additionally, decreased NF- $\kappa$ B phosphorylation was also observed in both the LTBI and active TB groups after HIF-1 $\alpha$  blockade and stimulation with CFP + PMA. However, stimulation with CFP + PMA increased NF- $\kappa$ B phosphorylation in individuals with LTBI, suggesting that the presence of mycobacterial components increased NF- $\kappa$ B phosphorylation. No significant decrease in phosphorylation was observed in patients with TB, which may be attributed to the increase in *HIF1A* expression.

Moreover, we observed a positive correlation between *HIF1A* gene expression and NF- $\kappa$ B levels after HIF-1 $\alpha$  blockade with 2-ME. These results suggested that the activation of NF- $\kappa$ B is not only related to HIF-1 $\alpha$ , but other nuclear factors may also be associated with this activation during latent infection, favoring the LTBI phenotype. Bandarra et al. [17] reported a possible mechanism by which NF- $\kappa$ B could be activated in the absence of HIF- $\alpha$ , through the increased production of intracellular reactive oxygen species.

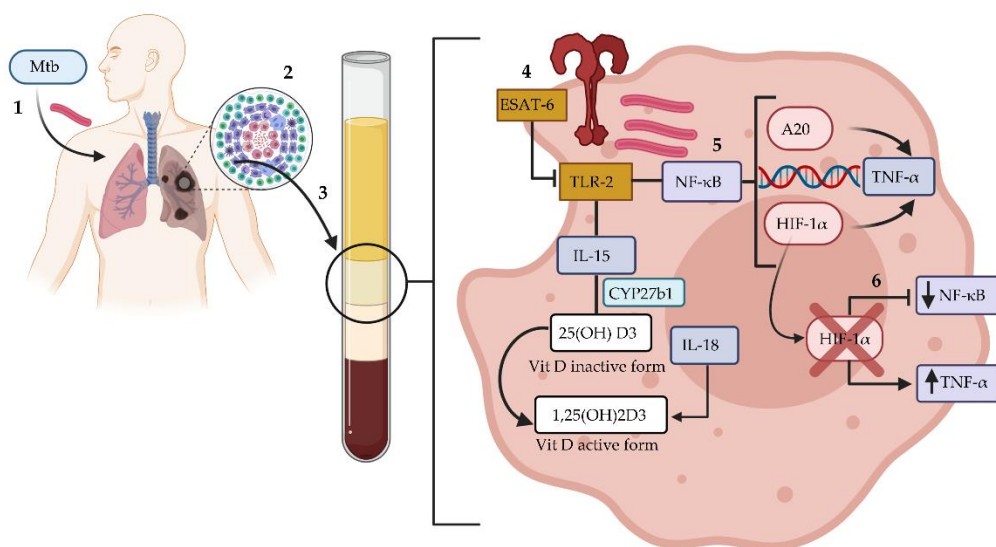
The NF- $\kappa$ B pathway can be activated by TNF- $\alpha$ -family receptors, and TNF- $\alpha$  is an important cytokine in the regulation of Mtb infection. Therefore, we analyzed the levels of TNF- $\alpha$  after HIF-1 $\alpha$  blockade, and observed that the release of TNF- $\alpha$  increased in PBMCs from individuals with LTBI after blockade. However, no significant difference in TNF- $\alpha$  levels was observed in patients with active TB. These results suggested that both the activation of the NF- $\kappa$ B pathway and TNF- $\alpha$  production are associated with LTBI and not active TB. Hypoxia can modulate the effector functions of macrophages, which are key cells involved in the immune response against TB infection. Under hypoxic conditions, mononuclear cells and macrophages secrete large amounts of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . In contrast, the absence of HIF-1 $\alpha$  reduces inflammatory responses, phagocytic capacity of macrophages, and bacterial death [54,55].

HIF-1 $\alpha$  plays an important role in the regulation of the NF- $\kappa$ B pathway, which is important in preventing excessive and harmful proinflammatory responses during infection and inflammation [17]. According to the same study, Bandarra et al. reported that HIF-1 $\alpha$  acted by restricting the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in mammalian cells and *Drosophila*. Additionally, HIF-1 $\alpha$ -mediated repression of NF- $\kappa$ B was observed when the mRNA and protein levels of A20, Cyld, DDX3, IAP1, and XIAP were measured; however, an NF- $\kappa$ B response was noted even in the absence of HIF-1 $\alpha$ . NF- $\kappa$ B negative-feedback points showed no significant decrease [17].

The present study had some limitations; hence, further studies are needed to better understand the functions of HIF-1 $\alpha$  in latent and active TB. For instance, the levels of the active form of Vitamin D (1,25(OH) $_2$ D $_3$ ) were not evaluated in the present study. Differences in the levels of 1,25(OH) $_2$ D $_3$  between patients with active TB and individuals with LTBI could perhaps explain the enhanced expression of IL-15 observed in individuals with LTBI; and the impossibility of carrying out the culture PBMC under hypoxic conditions using a hypoxia chamber in this study did not allow for conclusions regarding the main environments in which HIF-1 $\alpha$  was originally expressed. Moreover, future work should address the functions of the *A20* gene in PBMCs in patients with active TB and individuals with LTBI.

## 5. Conclusions

In summary, we observed that individuals with LTBI had lower expression of *A20* and *HIF1A* and diminished levels of Vitamin D and IL-6 compared to patients with active TB. Further analysis of PBMCs revealed that blockade of HIF-1 $\alpha$  resulted in decreased phosphorylation of NF- $\kappa$ B in individuals with LTBI subjects compared to the levels of phosphorylated NF- $\kappa$ B in patients with active TB; however, this response did not result in a decrease in TNF- $\alpha$  levels. These data suggested that individuals with LTBI had a higher production of TNF- $\alpha$  due to bypassing of the NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  pathways (Figure 6). Furthermore, HIF-1 $\alpha$  inhibition could be a therapeutic alternative for the treatment of tuberculosis, as it increased the immune response against Mtb.



**Figure 6.** Possible mechanisms activated in PBMCs isolated from individuals with LTBI. (1) After the initial infection, the bacilli reach the lungs and are recognized by alveolar macrophages. (2) In most infected individuals, the bacilli are contained in structures called granulomas. (3) PBMCs are recruited to the site of infection. (4) *Mycobacterium tuberculosis* produces several virulence factors for cell survival, including ESAT-6, which interacts with toll-like receptor 2, activates proinflammatory cytokines, and modulates IL-15-mediated activation of vitamin-D-dependent antimicrobial pathways. (5) The NF- $\kappa$ B pathway activates transcription factors, such as A20, which is involved in negative feedback inhibition of NF- $\kappa$ B, and HIF-1 $\alpha$ , the central regulator of the hypoxic response. (6) Inhibition of HIF-1 $\alpha$  results in decreased phosphorylation of NF- $\kappa$ B but increased production of TNF- $\alpha$ , bypassing NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$  pathways. The figure was created using Biorender.com. Abbreviations: ESAT-6, early secretory antigen target; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor 1 alpha; IL, interleukin; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; TLR-2, toll-like receptor 2; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; Vit, vitamin.

**Author Contributions:** Conceptualization: A.O.R., A.C.C., A.P.J.-K., and E.M.S.; methodology: A.O.R., A.C.C., R.S.S., D.M.P.S.M., A.Z., L.Â.M.S., and R.C.C.; formal analysis: R.C.C., P.V.S.P., A.P.J.-K., and E.M.S.; investigation: A.O.R. and A.C.C.; writing—original draft preparation: A.O.R., A.C.C., R.C.C., P.V.S.P., A.P.J.-K., and E.M.S.; writing—review and editing: A.C.C., R.C.C., P.V.S.P., A.P.J.-K., and E.M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) under grant numbers FAPEMA—INFRA-02012/21, CIDADES-05255/18, UNIVERSAL-01317/18 and BEPP-01906/21; Universidade CEUMA; Universidade Federal do Maranhão and Universidade Federal de Goiás. This work was partially funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)—Finance Code 001. CNPq (Process number 421867/2018-3; 303671/2019-0) and Faculdade Estácio de Sá de Goiás—FESGO (Process number - DPE—CI 042/2021).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted under Resolution 466/12 of the National Health Council of Brazil, Declaration of Helsinki II (2000), and approved by the Research Ethics Committee of Universidade CEUMA (protocol no. 1.803.034), São Luís, Maranhão, Brazil.

**Informed Consent Statement:** Written informed consent was obtained from the patient(s) to publish this paper.

**Data Availability Statement:** Not applicable

**Acknowledgments:** We are grateful to the technical team of the Presidente Vargas Hospital, São Luís, Maranhão, for helping with patient recruitment.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. Available online: <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021/tb-diagnosis-treatment/notifications> (accessed on 20 December 2021).
2. Cohen, A.; Mathiasen, V.D.; Schön, T.; Wejse, C. The global prevalence of latent tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* **2019**, *54*, 1900655. <https://doi.org/10.1183/13993003.00655-2019>.
3. Petruccioli, E.; Scriba, T.J.; Petrone, L.; Hatherill, M.; Cirillo, D.M.; Joosten, S.A.; Ottenhoff, T.H.; Denkinger, C.M.; Goletti, D. Correlates of tuberculosis risk: Predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *Eur. Respir. J.* **2016**, *48*, 1751–1763. <https://doi.org/10.1183/13993003.01012-2016>.
4. Shi, L.; Jiang, Q.; Bushkin, Y.; Subbian, S.; Tyagi, S. Biphasic Dynamics of Macrophage Immunometabolism during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *mBio* **2019**, *10*, e02550-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.02550-18>.
5. Peng, X.; Sun, J. Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxicon* **2016**, *116*, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.003>.
6. Pathak, S.K.; Basu, S.; Basu, K.K.; Banerjee, A.; Pathak, S.; Bhattacharyya, A.; Kaisho, T.; Kundu, M.; Basu, J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 610–618. <https://doi.org/10.1038/ni1468>.
7. Krutzik, S.R.; Hewison, M.; Liu, P.T.; Robles, J.A.; Stenger, S.; Adams, J.S.; Modlin, R.L. IL-15 Links TLR2/1-Induced Macrophage Differentiation to the Vitamin D-Dependent Antimicrobial Pathway. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 7115–7120. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7115>.
8. Selvaraj, P.; Harishankar, M.; Afsal, K. Vitamin D: Immuno-modulation and tuberculosis treatment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *93*, 377–384. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0386>.
9. Kumar, M.; Sahu, S.K.; Kumar, R.; Subuddhi, A.; Maji, R.K.; Jana, K.; Gupta, P.; Raffetseder, J.; Lerm, M.; Ghosh, Z.; et al. MicroRNA let-7 Modulates the Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection via Control of A20, an Inhibitor of the NF- $\kappa$ B Pathway. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.007>.
10. Ma, A.; Malynn, B.A. A20: Linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 774–785. <https://doi.org/10.1038/nri3313>.
11. Chu, Y.; Vahl, J.C.; Kumar, D.; Heger, K.; Bertossi, A.; Wójtowicz, E.; Soberon, V.; Schenten, D.; Mack, B.; Reutelshöfer, M.; et al. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation



- and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood* **2011**, *117*, 2227–2236. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-306019>.
12. Perkins, N.D. The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrc3204>.
  13. Shih, V.F.-S.; Tsui, R.; Caldwell, A.; Single, A. Hoffmann, A. A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* **2011**, *21*, 86–102. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.161>.
  14. O’Dea, E.; Hoffmann, A. The Regulatory Logic of the NF-Kappa B Signaling System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000216. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000216>.
  15. Huxford, T.; Hoffmann, A.; Ghosh, G. Understanding the Logic of I $\kappa$ B:NF- $\kappa$ B Regulation in Structural Terms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2011**, *349*, 1–24. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_99](https://doi.org/10.1007/82_2010_99).
  16. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
  17. Bandarra, D.; Biddlestone, J.; Mudie, S.; Muller, H.-A.; Rocha, S. HIF-1 $\alpha$  restricts NF- $\kappa$ B dependent gene expression to control innate immunity signals. *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 169–181. <https://doi.org/10.1242/dmm.017285>.
  18. Cardoso, M.S.; Silva, T.M.; Resende, M.; Appelberg, R.; Borges, M. Lack of the Transcription Factor Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in Macrophages Accelerates the Necrosis of *Mycobacterium avium*-Induced Granulomas. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 3534–3544. <https://doi.org/10.1128/iai.00144-15>.
  19. Elks, P.M.; Brizee, S.; Van Der Vaart, M.; Walmsley, S.R.; Van Eeden, F.J.; Renshaw, S.A.; Meijer, A.H. Hypoxia Inducible Factor Signaling Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection via a Nitric Oxide Dependent Mechanism. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003789. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003789>.
  20. Baay-Guzman, G.J.; Duran-Padilla, M.A.; Rangel-Santiago, J.; Tirado-Rodriguez, B.; Antonio-Andres, G.; Barrios-Payan, J.; Mata-Espinosa, D.; Klunder-Klunder, M.; Vega, M.I.; Hernandez-Pando, R.; et al. Dual role of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  in experimental pulmonary tuberculosis: Its implication as a new therapeutic target. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 785–798. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0168>.
  21. Nizet, V.; Johnson, R.S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 609–617. <https://doi.org/10.1038/nri2607>.
  22. Egners, A.; Erdem, M.; Cramer, T. The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 2053646. <https://doi.org/10.1155/2016/2053646>.
  23. Braverman, J.; Sogi, K.M.; Benjamin, D.; Nomura, D.K.; Stanley, S.A. HIF-1 $\alpha$  Is an Essential Mediator of IFN- $\gamma$ -Dependent Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **2016**, *197*, 1287–1297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600266>.
  24. Won, D.; Park, J.Y.; Kim, H.-S.; Park, Y. Comparative Results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and QuantiFERON-TB Gold Plus Assays for Detection of Tuberculosis Infection in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01854-19. <https://doi.org/10.1128/jcm.01854-19>.
  25. Riedhammer, C.; Halbritter, D.; Weissert, R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1304*, 53–61. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2014\\_99](https://doi.org/10.1007/7651_2014_99).
  26. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
  27. Owolabi, O.; Agbla, S.; Owiafe, P.K.; Donkor, S.; Togun, T.; Sillah, A.K.; Ota, M.O.C.; Sutherland, J.S. Elevated serum 25-hydroxy (OH) vitamin D levels are associated with risk of TB progression in Gambian adults. *Tuberculosis* **2016**, *98*, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.007>.
  28. Luc, J.G.Y.; Paulin, R.; Zhao, J.Y.; Freed, D.H.; Michelakis, E.D.; Nagendran, J. 2-Methoxyestradiol: A Hormonal Metabolite Modulates Stimulated T-Cells Function and proliferation. *Transplant. Proc.* **2015**, *47*, 2057–2066. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.05.021>.
  29. Duncan, G.S.; Brenner, D.; Tusche, M.W.; Brüstle, A.; Knobbe, C.B.; Elia, A.J.; Mock, T.; Bray, M.R.; Krammer, P.H.; Mak, T.W. 2-Methoxyestradiol inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis through suppression of immune cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 21034–21039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215558110>.
  30. Chaiprasongsuk, A.; Janjetovic, Z.; Kim, T.-K.; Schwartz, C.J.; Tuckey, R.C.; Tang, E.K.Y.; Raman, C.; Panich, U.; Slominski, A.T. Hydroxylumisterols, Photoproducts of Pre-Vitamin D<sub>3</sub>, Protect Human Keratinocytes against UVB-Induced Damage. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9374. <https://doi.org/10.3390/ijms21249374>.

31. Forrellad, M.A.; Klepp, L.I.; Gioffré, A.; Sabio y García, J.; Morbidoni, H.R.; de la Paz Santangelo, M.; Cataldi, A.A.; Bigi, F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **2013**, *4*, 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.22329>.
32. Peyssonnaud, C.; Datta, V.; Cramer, T.; Doedens, A.; Theodorakis, E.A.; Gallo, R.L.; Hurtado-Ziola, N.; Nizet, V.; Johnson, R.S. HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 1806–1815. <https://doi.org/10.1172/jci23865>.
33. Patidar, M.; Yadav, N.; Dalai, S.K. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2016**, *31*, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.06.001>.
34. Chandrashekara, S.; Anupama, K.R.; Sambarey, A.; Chandra, N. High IL-6 and low IL-15 levels mark the presence of TB infection: A preliminary study. *Cytokine* **2016**, *81*, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.02.003>.
35. Meraviglia, S.; Caccamo, N.R.; Salerno, A.; Sireci, G.; Dieli, F. Partial and Ineffective Activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells by *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 1770–1776. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000966>.
36. Yang, R.; Yang, E.; Shen, L.; Modlin, R.L.; Shen, H.; Chen, Z.W. IL-12+IL-18 Cosignaling in Human Macrophages and Lung Epithelial Cells Activates Cathelicidin and Autophagy, Inhibiting Intracellular Mycobacterial Growth. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2405–2417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701073>.
37. Kong, J.; Grando, S.A.; Li, Y.C. Regulation of IL-1 Family Cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 Receptor Antagonist, and IL-18 by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Primary Keratinocytes. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 3780–3787. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3780>.
38. Dinarello, C.A.; Novick, D.; Kim, S.; Kaplanski, G. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 289. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00289>.
39. Buha, I.; Škodrić-Trifunović, V.; Adžić-Vukičević, T.; Ilić, A.; Blanka-Protić, A.B.; Stjepanovic, M.; Anđelković, M.; Vreća, M.; Lazovic, J.M.; Spasovski, V.; et al. Relevance of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IRAK1 gene expression for assessing disease severity and therapy effects in tuberculosis patients. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2019**, *13*, 419–425. <https://doi.org/10.3855/jidc.10949>.
40. Fabri, M.; Modlin, R.L. A Vitamin for Autophagy. *Cell Host Microbe* **2009**, *6*, 201–203. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.08.008>.
41. White, J.H. Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: Past, present and future. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.034>.
42. Liu, P.T.; Stenger, S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B.H.; Krutzik, S.R.; Ochoa, M.T.; Schaubert, J.; Wu, K.; Meinken, C.; et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* **2006**, *311*, 1770–1773. <https://doi.org/10.1126/science.1123933>.
43. Cavalcanti, Y.V.N.; Brelaz, M.C.A.; Neves, J.K.D.A.L.; Ferraz, J.C.; Pereira, V.R.A. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulm. Med.* **2012**, *2012*, 745483. <https://doi.org/10.1155/2012/745483>.
44. Da Silva, D.A.A.; Da Silva, M.V.; Barros, C.C.O.; Alexandre, P.B.D.; Timóteo, R.P.; Catarino, J.S.; Sales-Campos, H.; Machado, J.R.; Rodrigues, D.B.R.; Oliveira, C.J.; et al. TNF- $\alpha$  blockade impairs in vitro tuberculous granuloma formation and down modulate Th1, Th17 and Treg cytokines. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194430>.
45. Martinez, A.N.; Mehra, S.; Kaushal, D. Role of Interleukin 6 in Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 1253–1261. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit037>.
46. Li, J.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Zhang, H.; Wei, L.; Shen, T.; Jiang, C.; Zhu, D. A20 deficiency leads to angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells through stronger NF- $\kappa$ B activation under hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 1319–1328. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12816>.
47. Shell, S.S.; Prestwich, E.G.; Baek, S.-H.; Shah, R.R.; Sasseti, C.M.; Dedon, P.C.; Fortune, S.M. DNA Methylation Impacts Gene Expression and Ensures Hypoxic Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003419. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003419>.
48. Belton, M.; Brilha, S.; Manavaki, R.; Mauri, F.; Nijran, K.; Hong, Y.T.; Patel, N.H.; Dembek, M.; Tezera, L.; Green, J.; et al. Hypoxia and Tissue Destruction in Pulmonary TB. *Thorax* **2016**, *71*, 1145–1153. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207402>.
49. Martens, A.; Van Loo, G. A20 at the Crossroads of Cell Death, Inflammation, and Autoimmunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2020**, *12*, a036418. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036418>.

50. Tannahill, G.M.; Curtis, A.M.; Adamik, J.; Palsson-McDermott, E.M.; McGettrick, A.F.; Goel, G.; Frezza, C.; Bernard, N.J.; Kelly, B.; Foley, N.H.; et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* **2013**, *496*, 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>.
51. Shalova, I.N.; Lim, J.Y.; Chittechath, M.; Zinkernagel, A.S.; Beasley, F.; Hernández-Jiménez, E.; Toledano, V.; Cubillos-Zapata, C.; Rapisarda, A.; Chen, J.; et al. Human Monocytes Undergo Functional Re-programming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ . *Immunity* **2015**, *42*, 484–498. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.001>.
52. Domingo-Gonzalez, R.; Das, S.; Griffiths, K.L.; Ahmed, M.; Bambouskova, M.; Gopal, R.; Gondi, S.; Muñoz-Torrico, M.; Salazar-Lezama, M.A.; Cruz-Lagunas, A.; et al. Interleukin-17 limits hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and development of hypoxic granulomas during tuberculosis. *JCI Insight* **2017**, *2*, e92973. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92973>.
53. Rius, J.; Guma, M.; Schachtrup, C.; Akassoglou, K.; Zinkernagel, A.S.; Nizet, V.; Johnson, R.S.; Haddad, G.G.; Karin, M. NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nature* **2008**, *453*, 807–811. <https://doi.org/10.1038/nature06905>.
54. Anand, R.J.; Gribar, S.C.; Li, J.; Kohler, J.W.; Branca, M.F.; Dubowski, T.; Sodhi, C.P.; Hackam, D.J. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *82*, 1257–1265. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307195>.
55. Prosser, G.; Brandenburg, J.; Reiling, N.; Barry, C.E.; Wilkinson, R.J.; Wilkinson, K.A. The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition. *Microbes Infect.* **2017**, *19*, 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.001>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou analisar os mecanismos de interação entre o Mtb e a célula infectada, em um modelo de células mononucleares, como citocinas e fatores de transcrição que podem contribuir para que a condição de latência continue bem estabelecida no hospedeiro.

O presente estudo mostrou que a via do NF- $\kappa$ B pode ser dependente do HIF-1 $\alpha$  nos indivíduos latentes de Tuberculose (ILTb), o que não influencia na produção de TNF- $\alpha$  nos mesmos. Portanto, pode-se perceber que, o HIF-1 $\alpha$ , juntamente com a produção de citocinas e ativação da via antimicrobiana dependente da vitamina D, também podem influenciar na manutenção da infecção latente.

## 6 CONCLUSÃO

Indivíduos ILTB apresentaram baixa expressão gênica de *A20* e *HIF1A* comparados aos pacientes com TB ativa. Além disso, os mesmos também apresentam diminuição na expressão de da citocina IL-15, que contribui para a ativação da via antimicrobiana dependente da vitamina D. Bem como, foi demonstrado que houve diminuição na produção da forma inativa da vitamina D – 25(OH)D3 nestes indivíduos em comparação aos pacientes com TB ativa.

Após o bloqueio de HIF-1 $\alpha$ , observou-se que há diminuição da fosforilação de NF- $\kappa$ B, porém essa diminuição não resultou na diminuição da produção de TNF- $\alpha$ . Portanto, após o bloqueio de HIF-1 $\alpha$ , indivíduos ILTB apresentaram maior produção de TNF- $\alpha$  independentemente das vias NF- $\kappa$ B e HIF-1 $\alpha$ .

Os fatores observados no interior de células mononucleares neste estudo, levam ao melhor entendimento de como o *Mycobacterium tuberculosis*, consegue modificar as funções originais da célula hospedeira em seu benefício para sobrevivência de forma latente no organismo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.
- ALDERWICK, L. J. et al. The mycobacterial cell wall—peptidoglycan and arabinogalactan. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 8, 2015.
- ALGOOD, H. M. S.; CHAN, J.; FLYNN, J. A. L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2003.
- ANDERSEN, P.; WOODWORTH, J. S. Tuberculosis vaccines - rethinking the current paradigm. **Trends in Immunology**, 2014.
- ANTUNES, J. L. F.; WALDMAN, E. A.; MORAES, M. DE. A tuberculose através do século: ícones canônicos e signos do combate à enfermidade. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, n. 2, 2000.
- AUGUSTE, P. et al. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: Systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2017.
- BAAY-GUZMAN, G. J. et al. Dual role of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  in experimental pulmonary tuberculosis: Its implication as a new therapeutic target. **Future Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 785–798, 2018.
- BANDARRA, D. et al. HIF-1 $\alpha$  restricts NF- $\kappa$ B-dependent gene expression to control innate immunity signals. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 8, n. 2, 2015.
- BELTON, M. et al. Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB. **Thorax**, v. 71, n. 12, 2016.
- BRASIL. **Manual de recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. [s.l.: s.n.].
- BRAVERMAN, J. et al. HIF-1 $\alpha$  Is an Essential Mediator of IFN- $\gamma$ -Dependent Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 4, 2016.
- CAMPBELL, E. L. et al. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, 2014.
- CAMPBELL, G. R.; SPECTOR, S. A. Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages through the induction of autophagy. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.
- CARDOSO, M. S. et al. Lack of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in macrophages accelerates the necrosis of *Mycobacterium avium*-induced granulomas. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 9, 2015.
- CHAI, Q.; LU, Z.; LIU, C. H. Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2020.

CHANG, K. et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 64, n. 6, 2012.

CHEN, L. F.; GREENE, W. C. Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2004.

CHUNG, C. et al. Vitamin D-cathelicidin axis: At the crossroads between protective immunity and pathological inflammation during infection. **Immune Network**, v. 20, n. 2, 2020.

COELHO DE BRITO DAIANE ALVES DA SILVA DANIELE GOMES DELL, A. et al. **Organização e colaboração: Editora MS/CGDI 1. Tuberculose 2. Epidemiologia 3. Vigilância Títulos para indexação: Epidemiological Report-Tuberculosis 2021.** [s.l.: s.n.].

COHEN, A. et al. The global prevalence of latent tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, 2019.

COORNAERT, B. et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase - Mediated cleavage of the NF- $\kappa$ B inhibitor A20. **Nature Immunology**, v. 9, n. 3, p. 263–271, mar. 2008.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Seminars in Immunology**, 2014.

CRAMER, T. et al. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. **Cell**, v. 112, n. 5, 2003.

CUMMINS, E. P. et al. **Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IB kinase-, giving insight into hypoxia-induced NFB activity.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602235103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602235103)>.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, nov. 2006.

DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. **Cell and Tissue Research**, 2016.

DARTOIS, V. The path of anti-tuberculosis drugs: From blood to lesions to mycobacterial cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, 2014.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, 2013.

DOS SANTOS, S. A.; DE ANDRADE JÚNIOR, D. R. HIF-1 $\alpha$  and infectious diseases: A new frontier for the development of new therapies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 2017.

EGNERS, A.; ERDEM, M.; CRAMER, T. The response of macrophages and neutrophils to hypoxia in the context of cancer and other inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

- ELKS, P. M. et al. Hypoxia Inducible Factor Signaling Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection via a Nitric Oxide Dependent Mechanism. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, 2013.
- ERLER, J. T. et al. Hypoxia-Mediated Down-Regulation of Bid and Bax in Tumors Occurs via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 7, 2004.
- ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, 2012.
- FERLUGA, J. et al. Natural and trained innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunobiology**, 2020.
- FITZPATRICK, S. F. et al. An Intact Canonical NF- $\kappa$ B Pathway Is Required for Inflammatory Gene Expression in Response to Hypoxia. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 1091–1096, 15 jan. 2011.
- FLORES, L. L. et al. Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, 2011.
- GONÇALVES, H. A tuberculose ao longo dos tempos. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 7, n. 2, 2000.
- GUALANO, G. et al. Tuberculin skin test – Outdated or still useful for Latent TB infection screening? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 80, 2019.
- GUIMARÃES, A. B. G. et al. a História Da Tuberculose Associada Ao Perfil Socioeconomico No Brasil: Uma Revisão Da Literatura. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - FACIPE**, v. 3, n. 3, 2018.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. **Genes and Development**, v. 26, n. 3, 2012.
- HOFFMANN, A. et al. The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signaling module: Temporal control and selective gene activation. **Science**, v. 298, n. 5596, 2002.
- HOFFMANN, A.; BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor  $\kappa$ B signaling. **Immunological Reviews**, 2006.
- HOFFMANN, C. et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 10, 2008.
- HUANG, L. E. et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, 1998.
- HUNTER, R.; ACTOR, J. The pathogenesis of post-primary tuberculosis. A game changer for vaccine development. **Tuberculosis**, 2019.



- HUXFORD, T.; HOFFMANN, A.; GHOSH, G. Understanding the logic of I $\kappa$ B:NF- $\kappa$ B regulation in structural terms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 349, 2011.
- JANTSCH, J. et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4697–4705, 1 abr. 2008.
- JIN, Z. et al. Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. **Cell**, v. 137, n. 4, 2009.
- KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Molecular Pharmacology**, 2006.
- KIESER, K. J.; RUBIN, E. J. How sisters grow apart: Mycobacterial growth and Division. **Nature Reviews Microbiology**, 2014.
- KIM, S. Y. et al. Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. **Immunology**, v. 129, n. 4, 2010.
- KRUTZIK, S. R. et al. IL-15 Links TLR2/1-Induced Macrophage Differentiation to the Vitamin D-Dependent Antimicrobial Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, 2008.
- KUMAR, B. S. et al. Recent Advances in chemistry and pharmacology of 2-methoxyestradiol: An anticancer investigational drug. **Steroids**, 2016.
- KUMAR, M. et al. MicroRNA let-7 modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection via control of A20, an inhibitor of the NF- $\kappa$ B pathway. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 3, 2015.
- LI, D. et al. Down-regulation of A20 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 6, 2012.
- LIU, F. et al. IKK biology. **Immunological Reviews**, 2012.
- MA, A.; MALYNN, B. A. A20: Linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. **Nature Reviews Immunology**, 2012.
- MACIEL, M. DE S. et al. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, 2012.
- MAIGA, M.; ABAZA, A.; BISHAI, W. R. Current tuberculosis diagnostic tools & role of urease breath test. **Indian Journal of Medical Research**, 2012.
- MCINTURFF, A. M. et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . **Blood**, v. 120, n. 15, 2012.
- MCNAMEE, E. N. et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. **Immunologic Research**, v. 55, n. 1–3, 2013.
- NIU, J. et al. LUBAC regulates NF- $\kappa$ B activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. **EMBO Journal**, v. 30, n. 18, p. 3741–3753, set. 2011.

NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, 2009.

O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, 2013.

OLIVEIRA, M. S. R. et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE TUBERCULOSE NO ESTADO DO MARANHÃO NOS ANOS DE 2012 A 2016. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, 2018.

ORGANIZATION, W. H. Global Tuberculosis Report 2021. **World Health Organization**, 2021.

ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. **Nature Immunology**, 2015.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. Immunity and immunopathology in the tuberculous granuloma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 9, 2015.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**. Nature Publishing Group, , 27 out. 2016.

PALAZON, A. et al. HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. **Immunity**, 2014.

PERKINS, N. D. **The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer** **Nature Reviews Cancer**, 2012.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, 2012.

REECE, S. T. et al. Serine protease activity contributes to control of *Mycobacterium tuberculosis* in hypoxic lung granulomas in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 9, 2010.

RIUS, J. et al. NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ . **Nature**, v. 453, n. 7196, 2008.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, 2008.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, 2007.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature Immunology**, 2009.

SADIKU, P. et al. Prolyl hydroxylase 2 inactivation enhances glycogen storage and promotes excessive neutrophilic responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 9, 2017.

- SHALER, C. R. et al. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.
- SHELL, S. S. et al. DNA Methylation Impacts Gene Expression and Ensures Hypoxic Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, 2013.
- SHEMBADE, N.; MA, A.; HARHAJ, E. W. Inhibition of nf-kb signaling by a20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. **Science**, v. 327, n. 5969, p. 1135–1139, 26 fev. 2010.
- SHI, L. et al. Biphasic dynamics of macrophage immunometabolism during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **mBio**, v. 10, n. 2, 2019.
- SHIH, V. F. S. et al. A single NFκB system for both canonical and non-canonical signaling. **Cell Research**, jan. 2011.
- SILVA, P. H. L. DA; BIANCHI, C. D. S. A ABORDAGEM DE DUAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: HANSENÍASE E TUBERCULOSE NOS LIVROS DIDÁTICOS DE ENSINO MÉDIO APROVADOS PELO PROGRAMA NACIONAL DO LIVRO DIDÁTICO PARA O ENSINO MÉDIO (PNLDEM). **Ensino, Saude e Ambiente**, v. 7, n. 3, 2014.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, 2003.
- TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. **Nature**, v. 496, n. 7444, 2013.
- TRAJMAN, A.; STEFFEN, R. E.; MENZIES, D. Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin testing for the diagnosis of latent tuberculosis infection: An overview of the evidence. **Pulmonary Medicine**, 2013.
- VAN CREVEL, R. et al. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.
- VAN, U. P.; KENNETH, N. S.; ROCHA, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. **Biochem.J.**, v. 412, n. 1470- 8728 (Electronic), 2008.
- VENTURA, S. et al. A20-binding inhibitor of NF-κB (ABIN) 2 negatively regulates allergic airway inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 11, p. 2737–2747, 1 nov. 2018.
- WALMSLEY, S. R. et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1α-dependent NF-κB activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 1, p. 105–115, 3 jan. 2005.
- WAYNE, L. G.; HAYES, L. G. An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, 1996.
- WEIDEMANN, A.; JOHNSON, R. S. Biology of HIF-1α. **Cell Death and Differentiation**, 2008.

WERTH, N. et al. Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010.

WILSON, F. A.; MILLER, T. L.; STIMPSON, J. P. *Mycobacterium tuberculosis* infection, immigration status, and diagnostic discordance: A comparison of tuberculin skin test and quantiFERON®-TB gold in-tube test among immigrants to the U.S. **Public Health Reports**, v. 131, n. 2, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2018. World Health Organization. World Health Organization**, 2018.

YANG, R. et al. IL-12+IL-18 Cosignaling in Human Macrophages and Lung Epithelial Cells Activates Cathelicidin and Autophagy, Inhibiting Intracellular Mycobacterial Growth. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 7, p. 2405–2417, 1 abr. 2018.

ZHANG, G. et al. Correlation between liver cancer pain and the HIF-1 and VEGF expression levels. **Oncology Letters**, v. 13, n. 1, 2017.

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2015.

ZUMLA, A. I.; LAWN, S. D. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, p. 57–72, 2011.

## ANEXO A: Artigo publicado na Revista Biomedicines



biomedicines



Article

**Restricted Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway in Individuals with Latent Tuberculosis Infection after HIF-1 $\alpha$  Blockade**

Aline de Oliveira Rezende <sup>1</sup>, Rafaela Santos Sabóia <sup>2</sup>, Adeliane Castro da Costa <sup>3</sup>,  
 Diana Messala Pinheiro da Silva Monteiro <sup>4</sup>, Adrielle Zagnignan <sup>4</sup>, Luis Ângelo Macedo Santiago <sup>5</sup>,  
 Rafael Cardoso Carvalho <sup>1</sup>, Paulo Vitor Soeiro Pereira <sup>1</sup>, Ana Paula Junqueira-Kipnis <sup>6</sup>,  
 and Eduardo Martins de Sousa <sup>1,2,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luis 65080-805, Brazil; aline.rezende@discente.ufma.br (A.d.O.R.); carvalho.rafael@ufma.br (R.C.C.); paulo.soeiro@ufma.br (P.V.S.P.); rafaela021480@ceuma.com.br

<sup>2</sup> Graduate Program in Microbial Biology, CEUMA University—UniCEUMA, São Luis 65075-120, Brazil; rafaella021480@ceuma.com.br

<sup>3</sup> Faculty Estácio de Sá de Goiás, Goiânia 74055-190, Brazil; adeliane.costa@estacio.br

<sup>4</sup> Graduate Program in Health and Services Management, CEUMA University—UniCEUMA, São Luis 65075-120, Brazil; diana022247@ceuma.com.br (D.M.P.d.S.M.); adrielle.zagnignan@ceuma.br (A.Z.)

<sup>5</sup> Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology, Amazônia-BIONORTE, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luis 65080-805, Brazil; luis.angelo@ufma.br

<sup>6</sup> Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia 74605-050, Brazil; ana\_kipnis@ufg.br

\* Correspondence: eduardo.martins@ceuma.br



**Citation:** de Oliveira Rezende, A.; Sabóia, R.S.; da Costa, A.C.; da Silva Monteiro, D.M.P.; Zagnignan, A.; Santiago, L.Â.M.; Carvalho, R.C.; Pereira, P.V.S.; Junqueira-Kipnis, A.P.; de Sousa, E.M. Restricted Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway in Individuals with Latent Tuberculosis Infection after HIF-1 $\alpha$  Blockade. *Biomedicines* **2022**, *10*, 817. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040817>

Academic Editor: Célia F. Rodrigues

Received: 6 February 2022

Accepted: 28 March 2022

Published: 31 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral

**Abstract:** Tuberculous granuloma formation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), and is essential for establishing latent tuberculosis infection (LTBI) and its progression to active tuberculosis (TB). Here, we investigated whether HIF-1 $\alpha$  expression and adjacent mechanisms were associated with latent or active TB infection. Patients with active TB, individuals with LTBI, and healthy controls were recruited, and the expression of cytokine genes *IL15*, *IL18*, *TNFA*, *IL6*, *HIF1A*, and *A20* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum vitamin D (25(OH)D3) levels were evaluated. Additionally, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) levels were analyzed in PBMC lysates and culture supernatants, respectively, after HIF-1 $\alpha$  blockade with 2-methoxyestradiol. We observed that IL-15 expression was higher in individuals with LTBI than in patients with active TB, while IL-18 and TNF- $\alpha$  expression was similar between LTBI and TB groups. Additionally, serum 25(OH)D3 levels and expression of *IL-6*, *HIF1A*, and *A20* were higher in patients with active TB than in individuals with LTBI. Moreover, PBMCs from individuals with LTBI showed decreased NF- $\kappa$ B phosphorylation and increased TNF- $\alpha$  production after HIF-1 $\alpha$  blockade. Together, these results suggest that under hypoxic conditions, TNF- $\alpha$  production and NF- $\kappa$ B pathway downregulation are associated with the LTBI phenotype.

**Keywords:** tuberculosis; latent tuberculosis infection; hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ); tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ); nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)