

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DOUTORADO

**A PARTICIPAÇÃO DO GENE SIGIRR NA RESPOSTA IMUNE  
A *Mycobacterium tuberculosis* DEPENDENTE DE TLR E IL18**

KELLY PORTELA SOUSA

São Luís – MA

2023

KELLY PORTELA SOUSA

**A PARTICIPAÇÃO DO GENE SIGIRR NA RESPOSTA IMUNE  
A *Mycobacterium tuberculosis* DEPENDENTE DE TLR E IL18**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira

São Luís – MA

2023

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

Portela Sousa, Kelly.

A PARTICIPAÇÃO DO GENE SIGIRR NA RESPOSTA IMUNE A  
Mycobacterium tuberculosis DEPENDENTE DE TLR E IL18 /  
Kelly Portela Sousa. - 2023.

81 p.

Orientador(a): Paulo Vitor Soeiro Pereira.

Tese (Doutorado) - Gestão em Saúde, Universidade  
Federal do Maranhão, São Luis MA, 2023.

1. Gene. 2. Imunogenética. 3. Resposta imune. 4.  
Tuberculose. I. Soeiro Pereira, Paulo Vitor. II. Título.

KELLY PORTELA SOUSA

**A PARTICIPAÇÃO DO GENE SIGIRR NA RESPOSTA IMUNE  
A *Mycobacterium tuberculosis* DEPENDENTE DE TLR E IL18**

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

Data da defesa: 26 / 10 / 2023

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Vanessa Moreira da Silva Soeiro – UFMA

---

Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto – UFMA

---

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho – PPGCS/UFMA

---

Profa. Dra. Angela Falcai – Universidade CEUMA (memória)

---

Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira – UFMA

*Here comes the sun*  
*Here comes the sun, and I say*  
*It's alright*

(The Beatles)

Dedico este trabalho ao meu orientador Paulo Vitor Soeiro Pereira, meu grande exemplo de profissional, cuja dedicação, incentivo e paciência foram os maiores pilares para a realização deste trabalho; obrigada por tudo!

## **AGRADECIMENTOS**

As realizações são buscas constantes em nossas vidas, mas sabemos que sozinhos não conseguimos nada. Precisamos do próximo para alcançarmos nossos sonhos, pois um simples olhar faz toda diferença. Essa trajetória do doutorado me fez refletir que além de lutar por esse título foi muito importante conhecer novos professores, compartilhar bons e alguns maus momentos, fazer novas amizades, compartilhar experiências, fortalecer relações, buscar sempre o porto seguro na família e desfrutar diariamente da presença de Deus. Sendo assim, gostaria de agradecer em primeiro lugar, a Deus pelo dom da vida; por ter permitido a realização deste trabalho, me dando força e sabedoria para ultrapassar todos os obstáculos encontrados durante os quatro anos de desenvolvimento desta tese.

À minha família que esteve sempre ao meu lado, sempre apoiando minhas lutas e aplaudindo minhas conquistas, sendo meu maior incentivo em vencer na vida pessoal e profissional. Amo vocês!

À minha mãe Fátima Portela, por toda atenção e dedicação para minha educação, sempre compreendendo meus momentos mais difíceis trazendo palavras de carinho e esperança. Sempre me mantendo em todas as suas orações para que eu tivesse sucesso em tudo que eu escolhesse seguir em minha vida. Eu te agradeço, mãe! Você é essencial em minha vida!

Ao meu pai Aguinaldo Sousa, meu maior incentivador a nunca desistir de estudar, pela ajuda incondicional durante todos os dias da minha vida, por toda dedicação a minha educação, pelo carinho e compreensão. Obrigada por sempre estar presente em minha vida!

Ao meu irmão, Kevin Portela, por ser a pessoa mais carinhosa que conheço, por toda a sua parceria e por ser a pessoa que mais me entende. Continuo dizendo que nós estamos envolvidos numa sintonia que vai além dos laços de sangue, e se eu pudesse viver 100 vidas, em todas eu queria ser sua irmã. Obrigada por tudo!

Ao meu querido marido Edvaldo Júnior, pessoa com quem convivo todos os dias aprendendo a respeitar, amar, dividir e acima de tudo a ceder. Sei que essa conquista não é somente minha e que hoje o coração do meu marido se exalta de alegria por mais essa vitória. Não acredito em alma gêmea e sim em pessoas que se

complementam, nesse caso, ele me completa. Obrigada pelo seu amor incondicional, pelo incentivo e por acreditar em minha capacidade, sempre confiante e trazendo palavras de conforto nos momentos em que pensei em desistir. Agradeço ainda, por compreender minha dedicação a este projeto.

Ao meu Orientador, Professor Paulo Vitor Soeiro Pereira. Ter você como meu orientador foi um dos maiores privilégios que a vida me ofertou. És um grande exemplo para mim e eu serei eternamente grata por toda paciência e dedicação que tiveste para transmitir os conhecimentos, por apresentar-se sempre calmo quando tudo parecia estar indo muito mal, pelo entusiasmo nas discussões de resultados, pelas críticas e sugestões que sempre ajudaram no desenvolvimento deste trabalho e também por toda contribuição que tem dado o meu crescimento profissional. Saiba que tenho você como uma referência pessoal, vejo em você um excelente profissional comprometido com o que se propõe a fazer, nunca esquecendo do bem maior, a família, e os amigos. Obrigada por tudo professor!

À profa. Ana Paula, obrigada por compreender as dificuldades enfrentadas para a confecção deste trabalho.

À profa. Ângela Falcai, lembro praticamente todos os dias das palavras que me dissestes de incentivo a construção deste trabalho durante a minha qualificação, você me incentivou e me fez acreditar que era possível concluir este trabalho, mesmo em meio as dificuldades. Obrigada!

Aos meus mestres que, sempre incentivaram e ajudaram nesta longa caminhada, dando apoio e trazendo os melhores ensinamentos.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Imunologia Humana (GPIH), pessoas que fortaleceram esta pesquisa, pelas reuniões presenciais e remotas que, trouxeram ideias, discussões e contribuições valiosas para a construção deste trabalho. Em especial, agradeço ao Éder Fialho, um amigo que contribuiu para meu crescimento profissional desde que entrei no Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde.

Aos amigos do LIF (Laboratório de Imunofisiologia) e LPI (Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia), onde pude vivenciar momentos de muito aprendizado, conquistei amigos e cresci profissionalmente. Em especial agradeço a Dona Sonia, uma amiga maravilhosa que torna os dias mais animados no LPI.



Aos meus colegas do Doutorado em Ciências da Saúde, pela convivência e pelos valiosos momentos especiais durante esses quatro anos de preparo e estudo. Em especial, Benedita Costa, pessoa a qual compartilhei momentos de aflição, angústia e esperança para a conclusão dessa jornada.

À minha querida amiga, Rosana Martins, por todo apoio e incentivo ao longo dos nossos 15 anos de amizade. Você sempre traz os pensamentos positivos e não me deixa desistir de realizar os meus sonhos.

Aos meus amigos de trabalho, Adriana Mafra, Cleide de Fátima, Jocelino Meireles, Paula Sousa, Italini Macêdo, Valéria Sousa e Luciana Araújo por acreditarem no meu potencial, dando um grande incentivo na reta final de construção deste trabalho. Além disso, foram essenciais nos momentos de descontração contribuindo para o bem estar da minha saúde mental.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e à Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade de prosseguir qualificando minha carreira.

À FAPEMA pela bolsa de Doutorado concedida a mim e pelo apoio financeiro a pesquisa no Maranhão.

À todos que participaram de alguma forma do processo de desenvolvimento e conclusão desse Doutorado e que sempre foram presentes e cientes do sucesso a ser alcançado no final dessa jornada. Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A Tuberculose, causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), constitui um grave problema de saúde pública mundial e milhares de pessoas ainda adoecem e morrem devido à doença e suas complicações. Acredita-se que variações na resposta imunológica podem estar relacionadas com o alto número de casos de tuberculose. Assim, este trabalho visa correlacionar os genes e as vias de sinalização da interleucina 18 e SIGIRR na resposta imune ao *Mtb* por análise *in silico* de transcriptomas. Para isto, foi realizada uma análise integrativa pesquisando o banco de dados NCBI GEO para identificar dados de expressão gênica publicamente disponíveis de infecção por *Mtb*. Inicialmente, definimos vias de sinalização nas plataformas STRING, Reven e Signor 3.0 que forneceram, respectivamente, 54, 26 e 25 genes. Aplicou-se o diagrama de Veen, e a extração dos dados de expressão gênica foi sintetizada ao conjunto de 19 genes/proteínas alvo para avaliação da participação de SIGIRR na via de ativação de TLR/IL18/IFNG. As informações sobre a expressão destes genes, no contexto da infecção por *Mtb*, foram extraídas dos DataSets GSE52819, GSE20050, GSE139871, GSE148731. Na análise do DataSet 52819, monócitos infectados com *Mtb* H37Rv, 7 genes apresentaram alteração na expressão, dentre eles o TLR4 com regulação positiva; para O GSE20050, macrófagos, com exceção de IL-37, todos os genes apresentaram-se diferencialmente expressos; para GSE139871, monócitos de pacientes com tuberculose sendo posteriormente infectados com a cepa UT127, foram encontrados 12 genes com expressão diferencial, dentre eles *IFNG*, *IL18*, *IRAK2*, *TICAM1*, já nos reinfectedos com UT205 foram encontrados 12 genes, dentre eles *IFNG*, *IL18*, *IRAK2*, *IRF7*, *SIGIRR*; no DataSet 148731, macrófagos diferenciados com fenótipos M1 e M2 infectados com cepas de *Mtb* H37Rv, foi observado para o perfil M1 a alteração em todos os 19 genes avaliados em 4 horas de infecção e em 17 genes avaliados em 24 horas de infecção. Os genes *IFNGR2*, *IL18R1*, *IRAK2*, *IRF7* e *TICAM1* apresentaram regulação positiva em todos os DataSets avaliados. Especificamente em relação ao nosso gene e vias de interesse, SIGIRR e IL18 não se mostraram correlatas. Dessa forma, nossa ideia inicial da participação direta de SIGIRR na indução da produção de IL18 não se comprovou. No entanto, SIGIRR apresentou correlações fortemente positivas com TLR4 e proteínas acessórias de sua via de ativação, como CD14, LY96 e IRAK4, comprovando sua significância no reconhecimento do patógeno. Mais importante, SIGIRR apresentou correlação fortemente positiva com IL18BP, IFNGR1 e NOX4. Isto demonstra o potencial de *SIGIRR* em regular negativamente a ação de IL18, mantendo a resposta imune dependente de IFNG pelo aumento da expressão de IFNGR1. Por fim, SIGIRR aumenta a expressão de NOX4, o que potencializa a atividade microbicida. Dessa forma, SIGIRR apresenta potencial de aumento da fagocitose e atividade microbicida, sem um processo inflamatório exacerbado deletério na resposta a *Mtb*. As análises de diferentes contextos de infecção por *Mtb*, proporcionam confiabilidade nos nossos dados que, trazem evidências da importância de moléculas não descritas classicamente na tuberculose, como SIGIRR, IRAK2 e IRF7, abrindo uma gama de possibilidades de biomarcadores para diagnóstico e prognóstico, além de pontos de modulação da resposta inflamatória, que devem ser consideradas nesta patologia.

**Palavras-chave:** Tuberculose; Gene; Imunogenética; Macrófago.

## ABSTRACT

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), constitutes a serious global public health problem and thousands of people still fall ill and die due to the disease and its complications. It is believed that variations in the immune response may be related to the high number of tuberculosis cases. Therefore, this work aims to correlate the genes and signaling pathways of interleukin 18 and SIGIRR in the immune response to *Mtb* through in silico analysis of transcriptomes. To this end, an integrative analysis was performed by searching the NCBI GEO database to identify publicly available gene expression data on *Mtb* infection. Initially, we defined signaling pathways on the STRING, Revenen and Signor 3.0 platforms, which provided 54, 26 and 25 genes, respectively. The Veen diagram was applied and gene expression data extraction was synthesized for the set of 19 target genes/proteins to evaluate the participation of SIGIRR in the TLR/IL18/IFNG activation pathway. Information about the expression of these genes, in the context of *Mtb* infection, was extracted from DataSets GSE52819, GSE20050, GSE139871, GSE148731. In the analysis of DataSet 52819, monocytes infected with *Mtb* H37Rv, 7 genes showed changes in expression, including TLR4 with upregulation; for GSE20050, macrophages, with the exception of IL-37, all genes were differentially expressed; for GSE139871, monocytes from tuberculosis patients subsequently infected with strain UT127, 12 genes with differential expression were found, including IFNG, IL18, IRAK2, TICAM1, while in those reinfected with UT205, 12 genes were found, including IFNG, IL18, IRAK2, IRF7, SIGIRR; in DataSet 148731, differentiated macrophages with M1 and M2 phenotypes infected with *Mtb* H37Rv strains, changes to the M1 profile were observed in all 19 genes evaluated at 4 hours of infection and in 17 genes evaluated at 24 hours of infection. The genes IFNGR2, IL18R1, IRAK2, IRF7 and TICAM1 showed positive regulation in all DataSets evaluated. Specifically in relation to our gene and pathways of interest, SIGIRR and IL18 were not correlated. Therefore, our initial idea of the direct participation of SIGIRR in the induction of IL18 production has not been proven. However, SIGIRR showed strong positive correlations with TLR4 and accessory proteins of its activation pathway, such as CD14, LY96 and IRAK4, proving its importance in pathogen recognition. Most importantly, SIGIRR showed a strong positive correlation with IL18BP, IFNGR1 and NOX4. This demonstrates the potential of SIGIRR to negatively regulate the action of IL18, maintaining the IFNG-dependent immune response by increasing the expression of IFNGR1. Finally, SIGIRR increases NOX4 expression, which increases microbicidal activity. Thus, SIGIRR has the potential to increase phagocytosis and microbicidal activity, without a deleterious exacerbated inflammatory process in the response to *Mtb*. Analyses of different contexts of *Mtb* infection provide reliability in our data, which provide evidence of the importance of molecules not classically described in tuberculosis, such as SIGIRR, IRAK2 and IRF7, opening up a range of biomarker possibilities for diagnosis and prognosis, in addition to points of modulation of the inflammatory response, which must be considered in this pathology.

**Keywords:** Tuberculosis; Gene; Immunogenetics; Macrophage.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Transmissão, disseminação e desenvolvimento da tuberculose .....	21
<b>Figura 2</b> – Resposta imune a <i>Mtb</i> .....	22
<b>Figura 3</b> - Visão geral do fluxo de trabalho de análise para perfil transcricional de microarray e RNA-seq .....	28
<b>Figura 4</b> – Algoritmo de escolha dos DataSets com base nos critérios de inclusão do estudo.....	31
<b>Figura 5</b> – Fluxograma de processamento de dados.....	35
<b>Figura 6</b> – Diagrama de interação proteína/proteína STRING na via de sinalização IL-18 e SIGIRR .....	42
<b>Figura 7</b> - Diagrama Revelen de interação de genes/proteínas envolvidos(as) na via de sinalização IL-18 e SIGIRR .....	43
<b>Figura 8.</b> Diagrama Signor 3.0 de interação de genes/proteínas envolvidos(as) na via de sinalização IL-18 e SIGIRR.....	44
<b>Figura 9.</b> Diagrama de Venn contendo os 19 genes que constam simultaneamente no STRING e no Revelen .....	45
<b>Figura 10.</b> GOplot de vias imunológicas selecionadas e genes associados.....	46
<b>Figura 11.</b> Heatmap com expressão da regulação dos genes em perfil de macrófagos infectados com <i>Mtb</i> .....	49
<b>Figura 12.</b> Heatmap com expressão da regulação dos genes em macrófagos contidos no granuloma .....	51
<b>Figura 13.</b> Heatmap com expressão da regulação dos genes em macrófagos M1 e M2.....	54
<b>Figura 14.</b> Heatmap com expressão da regulação dos genes em monócitos infectados por cepas de <i>Mtb</i> .....	57
<b>Figura 15.</b> Demonstração da regulação dos genes alvo por DataSet.....	59

<b>Figura 16.</b> Genes com regulação positiva em todos os DataSets.....	60
<b>Figura 17.</b> Correlações entre os 19 genes estudados.....	61
<b>Figura 18.</b> Correlações apresentadas para os genes alvo.....	62

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização dos 4 DataSets encontrados no NCBI GEO DataSets .....	39
--	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Expressão gênica diferencial em macrófagos derivados de THP-1 infectados com *Mtb* (GSE52819) .....47
- Tabela 2** - Expressão gênica diferencial em macrófagos provenientes de granulomas de pacientes infectados com *Mtb* (GSE50020) .....50
- Tabela 2** - Expressão gênica diferencial em macrófagos dos perfis M1 e M2 infectados por *Mtb* por 4 e 24 horas (GSE148731) .....52
- Tabela 3** - Expressão gênica diferencial em monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com tuberculose infectados com duas cepas de *Mtb* (GSE139871) .....55

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Células Apresentadores de antígenos, do inglês <i>Antigen Presenting Cells</i>
CD4+	Linfócito T auxiliar
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	DNA complementar
Células NK	Natural Killer
DEG	Genes diferencialmente expressos, do Inglês <i>Differentially expressed gene</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EII	Erros Inatos da Imunidade
ESAT-6	Early secreted antigenic target-6kDa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IDPs	Imunodeficiências Primárias
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-8	Interleucina-8
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
IL18R	Receptor de interleucina-18
IL-37	Interleucina-37
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	ácido lipotecóico
LTB	Tuberculose latente
MA	Macrófago alveolar
Macrófagos M1	Macrófago com padrão de resposta M1 (resposta agressiva)
Macrófagos M2	Macrófago com padrão de resposta M2 (reparo tecidual)
MHCII	Complexo de histocompatibilidade II
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88, do inglês <i>myeloid differentiation factor 88</i>



NLR	Ligante de nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBMC	Células polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões, do inglês <i>Pattern Recognizing Receptors</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAseq	RNA sequencial
scRNA-seq	RNA sequencial de célula individual
SIDA/AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
SIGIRR	receptor único relacionado a Ig IL-1, do inglês <i>single Ig IL-1-related receptor</i>
TB	Tuberculose
TIR	receptor tollinterleucina 1
TLR 2	Receptor do tipo Toll 2, do inglês <i>Toll-like receptor do tipo 2</i>
TLR 4	Receptor do tipo Toll 4, do inglês <i>Toll-like receptor do tipo 4</i>
TLR 6	Receptor do tipo Toll 6, do inglês <i>Toll-like receptor do tipo 6</i>
TLR 9	Receptor do tipo Toll 9, do inglês <i>Toll-like receptor do tipo 9</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 Tuberculose.....	21
2.2 Resposta Imune a <i>Mtb</i> .....	23
2.3 IL-18 e SIGIRR no contexto da tuberculose .....	27
2.4 Expressão gênica por RNA-Seq e microarranjo.....	28
2.5 Dados de expressão gênica e metanálise.....	31
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Obtenção de dados.....	34
4.2 Determinação do interactoma dos genes-alvo <i>TLR/IFNG/IL18/SIGIRR</i> .....	35
4.3 Análise dos processos biológicos.....	36
4.4 Análise de expressão diferencial de dados em massa de RNA-seq e microarray.....	36
4.5 Determinação de correlação entre as expressões gênicas.....	36
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
5.1 DataSets selecionados para a análise .....	38
5.2 Identificação <i>in silico</i> do interactoma de genes relevantes para a resposta imunológica na tuberculose com base na relação TLR/IL18.....	41
5.3 Processos biológicos associados aos genes relevantes na tuberculose com base na relação TLR/IL18.....	45
5.4 Expressão dos genes relacionados a TLR/IL18 envolvidos na resposta a <i>Mtb</i> .....	47

5.5 Expressão e regulação do core principal de genes-alvos – <i>TLR</i> , <i>IL18</i> , <i>IFNG</i> e <i>SIGIRR</i> .....	58
5.6 Regulação positiva de genes relacionados ao core principal de genes-alvos.....	60
5.7 Correlações.....	61
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>70</b>
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	81



WWW.PHDCOMICS.COM

## INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

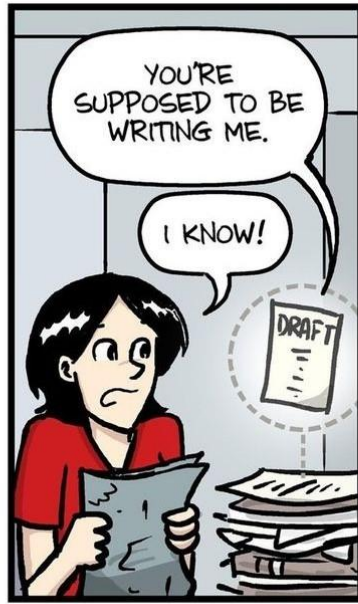
A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta a humanidade a um longo período de sua história. Constitui um grave problema de saúde pública mundial, uma vez que milhares de pessoas ainda adoecem e morrem em todo o globo devido a essa patologia e suas complicações (BARBIER, 2016, WHO, 2022). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2021 houve cerca de 10,6 milhões de casos no mundo, e destes, 1,6 milhões pacientes foram a óbito. O Brasil é um dos 22 países priorizados pela OMS para o controle da TB. Anualmente, são registrados cerca de 85 mil casos de TB com coeficiente de incidência de aproximadamente 37,2% para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2021). Em relação ao estado do Maranhão, região historicamente afetada por infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, o Ministério da Saúde estima que houve 2.194 novos casos da doença no ano de 2021, com uma frequência calculada de 30,7 casos por 100 mil habitantes, acompanhado de 150 óbitos (WHO, 2022; MACÊDO JÚNIOR et al, 2022).

Estes dados nos fazem refletir sobre as possíveis causas que podem levar à sustentação desses números expressivos da TB. Sabe-se que pessoas que vivem em situação de pobreza ou falta de saneamento básico apresentam maior risco de desenvolver a TB, como moradores de rua e pessoas privadas de liberdade (MACEDO, 2018). Além das condições socioeconômicas e ambiente no qual o indivíduo se encontra, o sistema imunológico também exibe um papel fundamental no desenvolvimento e evolução da doença. O comprometimento de apenas um dos componentes do sistema imunológico pode predispor a infecções graves e recorrentes por *Mtb*. Essas situações clínicas são conhecidas como Imunodeficiências Primárias (IDPs) ou Erros Inatos da Imunidade (EII), nas quais falhas intrínsecas na resposta imune levam ao quadro de susceptibilidade crônica a infecções (PICARD et al., 2015; TAVARES et al, 2020).

Pesquisas têm demonstrado como algumas variações genéticas individuais e populacionais levam a susceptibilidade às infecções. Existem condições como polimorfismos nos receptores semelhantes ao *Toll* (TLR) 2 e 4 estão relacionados a maior risco de desenvolver TB pulmonar, aumentando a gravidade da doença em algumas populações. Ainda, estudos tem demonstrado como a ausência de interleucina (IL) 18 ou a proteína SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related*

*molecule*) podem tornar o indivíduo mais suscetível a TB (SCHNEIDER et al, 2010; RIVA, 2012; MCHENRY *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o presente estudo parte da hipótese que a proteína SIGIRR participa da sinalização necessária para a produção da interleucina 18, após ativação por TLR, no contexto da resposta à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Para investigar essa hipótese, realizou-se uma metanálise com foco nessas moléculas, com o objetivo de aprofundar o entendimento das vias de sinalização e dos fatores reguladores da resposta imunológica relacionados à reação ao *Mtb*.



JORGE CHAM © 2015

WWW.PHDCOMICS.COM

REFERENCIAL TEÓRICO

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma antiga enfermidade que pode ser causada por qualquer uma das sete espécies que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*. Porém, em saúde pública, a espécie mais importante é a *M. tuberculosis* (*Mtb*), também conhecido como bacilo de Koch (BK) (BRASIL, 2022).

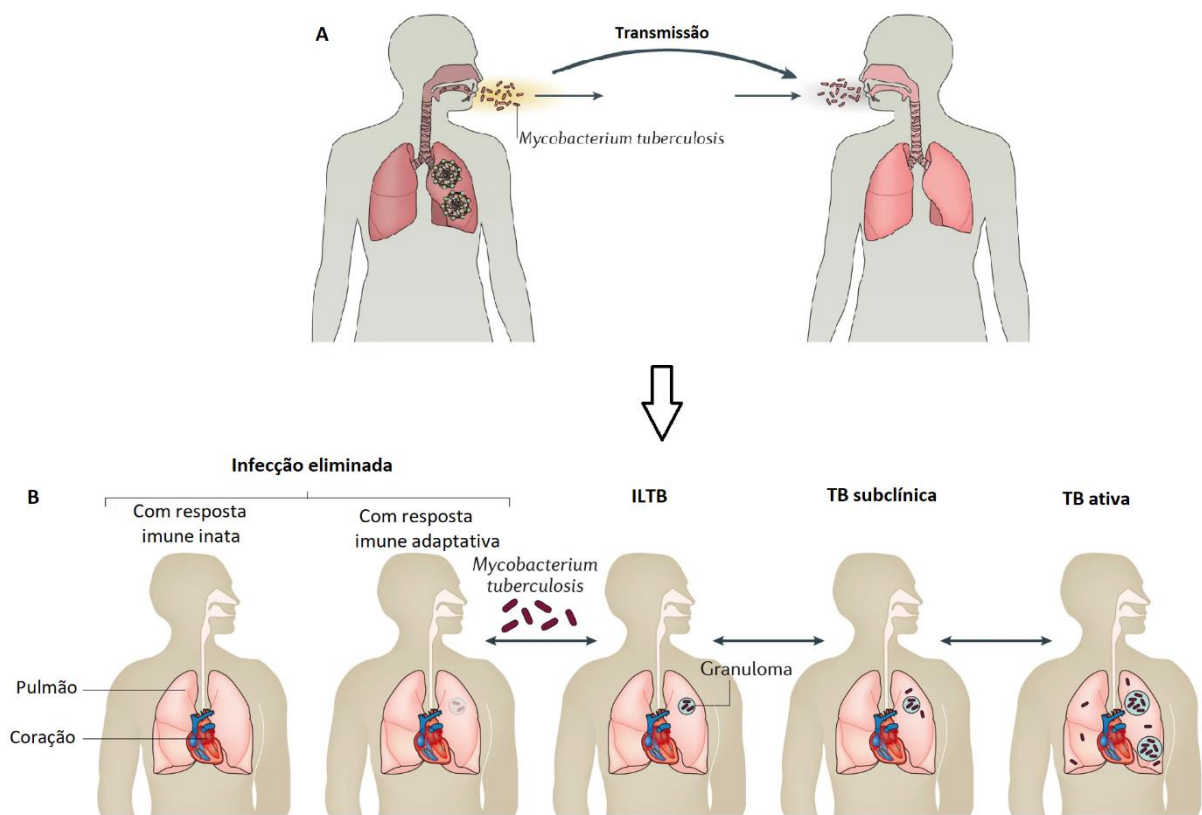
O *Mtb* é uma micobactéria estritamente aeróbica, com transmissão por gotículas e aerossóis, não esporulada, sem cápsula e flagelos em sua estrutura, é intracelular facultativa com tamanho variando entre 1 a 10 µm em comprimento, não se cora pelo método Gram devido a existência do ácido micólico na composição da sua superfície celular, ou seja, álcool-ácido resistente (BAAR), sendo utilizado o método de Ziehl-Neelsen, tem boa especificidade e boa distribuição, sendo adequado para diagnóstico e monitoramento da tuberculose (MONTEIRO et al., 2013; TAVARES et al., 2020)

Sua transmissão se dá por meio da inalação de aerossóis contendo o *Mtb* em sua forma ativa (Figura 1A). Afeta prioritariamente os pulmões, mas não exclusivamente, podendo acometer outros órgãos e sistemas. Após a exposição a este patógeno, a maioria dos casos é assintomático, outros apresentam sintomas leves, como tosse seca e contínua, posteriormente com secreção e com duração de mais de quatro semanas, sudorese noturna, cansaço excessivo, palidez, falta de apetite e rouquidão (WHO, 2015; BARBIER, 2016; BOSQUI, 2017).

A TB pode apresentar diversas manifestações e desfechos clínicos, que dependem de fatores, como: o grau de infecção e tempo de exposição ao *Mtb*; o estado do sistema imunológico do hospedeiro, onde a homeostase do corpo se faz fundamental; a presença de comorbidades associadas, com maior atenção para a coinfeção HIV-Tuberculose; as características genéticas do indivíduo, como a presença de erros inatos no sistema imune; entre outros fatores que tem sido descobertos e estudados com afinco pela comunidade científica (MÖLLER, 2018; BRASIL, 2019).



Esses fatores podem acarretar a TB manifestando-se com sintomas mais intensos como por exemplo, dificuldade na respiração, eliminação de sangue e acúmulo de pus na pleura pulmonar; manifestações atípicas, como tuberculose extrapulmonar, resistência ao tratamento e achados diferenciados em exames laboratoriais e de imagem; e ainda os casos de pacientes que apresentam recidiva, definida como um novo episódio de TB, comprovada por baciloscopia ou cultura, em um paciente previamente tratado com êxito para essa doença (WHO, 2006; ROCHA et al, 2009; BRASIL, 2019).



Fonte: adaptado de PAI et al, 2016; Chandra et al, 2022.

**Figura 1. Transmissão, disseminação e desenvolvimento da tuberculose.** (A) A transmissão por via aérea de *Mtb* é muito eficiente, mas a maioria das pessoas não desenvolve uma forma agressiva da doença. (B) desfechos que a infecção por *Mtb* pode apresentar.

Para todos os casos, o sistema imunológico será o responsável por determinar o rumo que a infecção irá tomar, dando origem a quatro possíveis

desfechos. Na primeira possibilidade, temos a ação efetiva e equilibrada do sistema imune, onde todos os bacilos infecciosos são eliminados. A segunda, e mais frequente opção, é o desenvolvimento de uma forma latente de tuberculose (ILTb), onde há a formação de um granuloma constituído, majoritariamente, por linfócitos T ativados e macrófagos, isolando uma área com várias micobactérias e células infectadas. Essa forma de contingenciamento bacteriano, na maioria das vezes, é bem eficiente e consegue suprimir a reativação da tuberculose. Entretanto, 5% a 10% dos indivíduos imunocompetentes podem desenvolver a forma ativa da doença em algum momento de sua vida. A terceira possibilidade de desfecho é a apresentação de uma forma subclínica da doença, com sintomas que variam de leves a moderados. A quarta, e última, possibilidade de apresentação clínica é o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose, sem a formação prévia de granulomas, onde o indivíduo tem uma rápida evolução da doença (Figura 1B) (CHURCHYARD, 2017; MÖLLER, 2018; PAI, 2016).

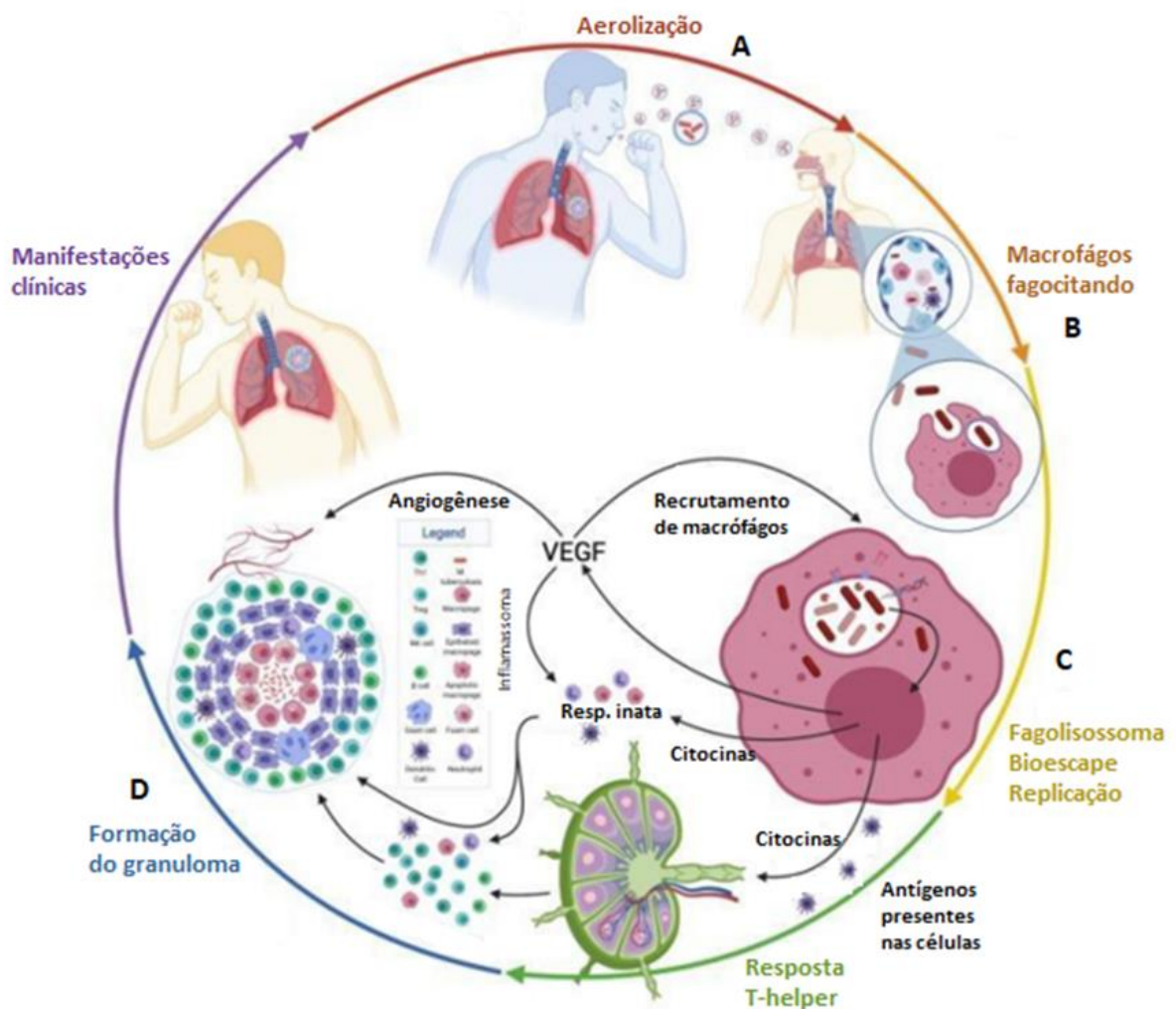
Dentre os fatores relacionados à reativação e progressão para TB ativa estão a infecção por HIV, a má nutrição, o uso excessivo de álcool, o diabetes mellitus, o tabagismo, a deficiência de vitamina D, a terapia anti-TNF, entre outros (SCRIBA et al., 2017). Além disso, diferentes estudos têm demonstrado que a genética do indivíduo também pode influenciar nas manifestações da TB (PETRUCCIOLI et al., 2016).

A tuberculose pode permanecer latente no organismo infectado, podendo durar várias décadas sem vir a progredir para uma tuberculose ativa. O controle e manejo desta patologia ainda carregam muitas variáveis que requerem estudos constantes, uma vez que o perfil do paciente com TB não é estático em relação às mudanças vividas no organismo e na sociedade como um todo (COSTA et al, 2022; OLIVEIRA et al, 2023).

## **2.2 Resposta Imune ao *Mtb***

A exposição do indivíduo ao *Mtb* possibilita diferentes cursos da infecção que dependem de vários fatores, como já citados neste trabalho. Sendo assim, nem todas as micropartículas que chegam aos alvéolos pulmonares resultam numa infecção sustentada. Mas quando o indivíduo desenvolve uma infecção, significa que o *Mtb* foi inalado e superou as primeiras barreiras de proteção do hospedeiro (epitélio, cílios e

muco) (Figura 2A). A primeira linha de defesa do hospedeiro compreende os tecidos linfoides associados à superfície mucosa do trato respiratório. As células epiteliais da mucosa desempenham um papel crucial na proteção contra o *Mtb*, pois produzem muitos tipos de substâncias antimicrobianas e atuam como barreiras físicas que limitam a entrada do bacilo no espaço alveolar (de MARTINO et al, 2019; FERLUGA et al, 2020).



Fonte: MAISON, 2022

**Figura 2. Resposta Imune ao *Mtb*.** Ciclo do *Mtb* no organismo humano, (A) aerolização e mecanismo de transmissão; (B) primeira resposta celular, macrófagos fagocitando; (C) formação do fagolisossoma, replicação do patógeno, sinalização celular e produção mediadores imunológicos e; (D) formação do granuloma pulmonar.

Após superar estas barreiras, o *Mtb* chega aos pulmões, onde encontra os macrófagos residentes do tecido, chamados de macrófagos alveolares – MA (Figura 2), quando então se inicia a resposta imune. Macrófagos alveolares exercem um papel importante no reconhecimento, fagocitose e liberação de citocinas pró-inflamatórias que resultam na eliminação do *Mtb*. Estas células, fagocitam o bacilo por meio de Receptores de Reconhecimento Padrão, do inglês *Pattern Recognizing Receptors* (PRR) que se ligam a estruturas denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) (Figura 2B) (PAI et al, 2016; KHAN et al., 201; de MARTINO et al, 2019)

Dentre os PRR relacionados à infecção por *Mtb* temos maior destaque aos receptores do tipo Toll, do inglês *toll-like receptors* (TLR). O bacilo é reconhecido pelo TLR4, TLR9 e pelos heterodímeros TLR2/1 e TLR2/6, que interagem com a proteína adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e o domínio do receptor toll-interleucina 1 (TIR) contendo a proteína adaptadora (TIRAP), capazes de ativar macrófagos e células dendríticas. A ativação do TLR por seu ligante específico pode resultar em vários desfechos biológicos possíveis, que vão desde a secreção de citocinas, modulação da resposta imune adaptativa, rápida diferenciação celular, apoptose e atividade antimicrobiana direta (LIU et al, 2010, SCHURZ et al, 2015).

O TLR4 composto por 839 aminoácidos, é ativado por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA). Tanto o LPS quanto o LTA se ligam primeiro ao receptor do cluster de diferenciação 14 (CD14), que os transfere para o TLR4. Ele homodimeriza e forma um complexo com a proteína MD2, e esse complexo é então transportado para a superfície celular (THADA et al, 2013)

Há ainda outros receptores envolvidos no reconhecimento de micobactérias, como do tipo-domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLR), lectinas tipo-C, receptores *scavenger*, entre outros. Vale mencionar que suas funções vão além da fagocitose, sendo responsáveis também pela ativação de outros mecanismos celulares, como a autofagia e apoptose e a montagem do inflamassoma, que medeia a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 através da ativação de caspases inflamatórias, contribuindo com a modulação da resposta imune inata durante a infecção do *Mtb*. (KILLICK et al, 2013; LIU et al, 2017; MA et al, 2021)

Após a fagocitose, os bacilos inalados ficam alocados em fagolisossomos, que produzem enzimas lisossômicas e formam radicais livres, responsáveis pela eliminação do bacilo (Figura 2C). Porém, a depender da virulência, a *Mtb* consegue escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e continuam vivas. Estes mecanismos de escape ainda não estão bem esclarecidos. Um dos mais conhecidos é a produção de alvo antigênico secretado primariamente de 6kDa, do inglês *early secreted antigenic target-6kDa* (ESAT-6), capaz de inibir a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ . A inibição tanto do apoptose de macrófagos infectados e quanto da fusão do fagócito ao lisossomo favorece a sobrevivência e a multiplicação dos bacilos no interior do fagossomo (MOUTINHO, 2011; JAMWAL et al, 2016).

Uma vez infectados, macrófagos alveolares e células dendríticas – células apresentadoras de antígenos, do inglês *antigen presenting cells* (APC) – liberam citocinas (L-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-18, IL-23, IL-17, IFN- $\gamma$ ) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL10) recrutando monócitos, linfócitos e neutrófilos para o pulmão. A partir de então, pode ocorrer a formação do granuloma, que se trata de um microambiente constituído de várias células que suprimem e policiam a replicação bacteriana, por um período de tempo indeterminado (Figura 2D). Além disso, as APC processam peptídeos oriundos da proteólise do *Mtb* no fagolisossomo, que se ligam ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), migram em direção ao linfonodo regional e apresentam antígenos presentes em sua superfície aos linfócitos TCD4+ (PAI, 2016; SIA et al., 2019).

A resposta imune mediada por linfócitos Th1 *Mtb*-específico está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- $\gamma$ . Esta citocina é classicamente descrita na literatura como chave no controle da infecção (ALVES et al, 2022). Apresenta capacidade de ativar macrófagos, estimulando a fagocitose, maturação do fagossomo, produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, e apresentação de antígenos, buscando eliminar ou restringir a multiplicação da *Mtb* no meio celular. Células como, linfócitos T CD4+ do perfil Th1, linfócitos T CD8+ e células NK produzem IFN- $\gamma$  em resposta à IL-12 produzida pelas APC (FERLUGA et al, 2020)

Por outro lado, existem citocinas não clássicas, como a IL-18, que desempenham papéis importantes na resposta imune ao *Mtb*. A função da IL-18 na

infecção por *Mtb* ainda não está bem esclarecida. Porém, levando em conta que a IL-18 contribui para a polarização dos linfócitos T CD4+ em células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , esta citocina atua junto com a IL-12 na indução da resposta mediada por IFN- $\gamma$ , exercendo um papel importante nesta resposta. (WAWROCKI et al, 2020).

Além das citocinas já citadas, não podemos deixar de mencionar o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), que apresenta importante papel na formação e manutenção do granuloma, influenciando na migração de leucócitos para a região da infecção. Embora outras citocinas e quimiocinas influenciem o recrutamento de leucócitos, o TNF- $\alpha$  parece ter um papel preponderante na manutenção da integridade estrutural do granuloma (ANTON et al, 2019).

De fato, a resposta imune é essencial para determinar o rumo que a infecção pelo *Mtb* irá tomar, isso torna os estudos nessa área de extrema relevância para a população que há tanto tempo vem enfrentando este problema.

### **2.3. IL-18 e SIGIRR no contexto da Tuberculose**

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória da família IL-1 que desempenha um papel importante na inflamação. Anteriormente era conhecida como fator indutor de IFN- $\gamma$ , possui funções imunorreguladoras pleiotrópicas, incluindo aumento da produção de IFN- $\gamma$  e regulação do desenvolvimento de linfócito T auxiliar tipo I. Está envolvida principalmente no reparo da barreira epitelial, celular T-helper 1 polarizadas e resposta imune de células Natural Killer (NK). Além disso, ao se ligar a IL-18R1 e IL-18RAP, forma um complexo terciário de sinalização que ativa o NF-kappa-B, desencadeando uma síntese de mediadores inflamatórios (TOMINAGAS et al, 2000; KATO et al, 2003; TSUTSUMI et al, 2014).

Estudos vem demonstrando que pacientes diagnosticados com TB ativa apresentam níveis séricos de IL-18 aumentados quando comparados a indivíduos saudáveis, e que pacientes com TB latente apresentam aumento na expressão de genes IL-18 e IL-18BP, evidenciando que tais moléculas apresentam um papel importante na regulação da resposta ao *Mtb* (WAWROCKI, et al, 2020a; WAWROCKI et al, 2020b).

Em relação a molécula SIGIRR, esta é menos descrita na literatura que a IL-18, mas tem por função atuar como um regulador negativo das vias de sinalização dos receptores Toll-like e IL-1R, inibindo as respostas inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) em macrófagos alveolares. Atenua o recrutamento de componentes de sinalização próximos ao receptor para o receptor TLR4, provavelmente por meio de uma interação do domínio TIR-TIR com TLR4 (WALD et al, 2003; TIAN et al, 2020).

Apesar de pouco descritas, as duas moléculas se mostram como reguladoras importantes nas vias de ativação na resposta imune a infecções por *Mtb*, tornando-se necessário mais estudos que expliquem suas respectivas relevâncias no contexto da resposta imune a tuberculose (WAWROCKI, et al, 2020a; TIAN et al, 2022). Uma das alternativas de maior exploração destas moléculas é a busca por estudos e *in silico* analisando a expressão gênica das mesmas em bancos de dados de domínio público.

#### **2.4 Expressão gênica por RNA-seq e microarranjo**

A genética trata-se de uma ciência relativamente nova que se transformou completamente na segunda metade do século XX, após a redescoberta dos trabalhos de Gregor Mendel. A descoberta da molécula do DNA e a criação de métodos capazes de analisá-la em escala microscópica fizeram emergir uma promissora área da biologia moderna, a biologia molecular. Os mistérios envolvidos na transmissão de características hereditárias, as diferenças mais sutis entre espécies semelhantes, o porquê de muitas bactérias conseguirem resistir a antimicrobianos de alta eficiência, são só algumas das perguntas resolvidas pelo advento da biologia molecular. Com mais estudos e a criação e o aprimoramento das técnicas e metodologias analíticas, o novo objetivo passou a ser catalogar todos os genes presentes no ser humano e nas espécies de interesse científico, através do sequenciamento de seus genomas (LEANDRO, 2015).

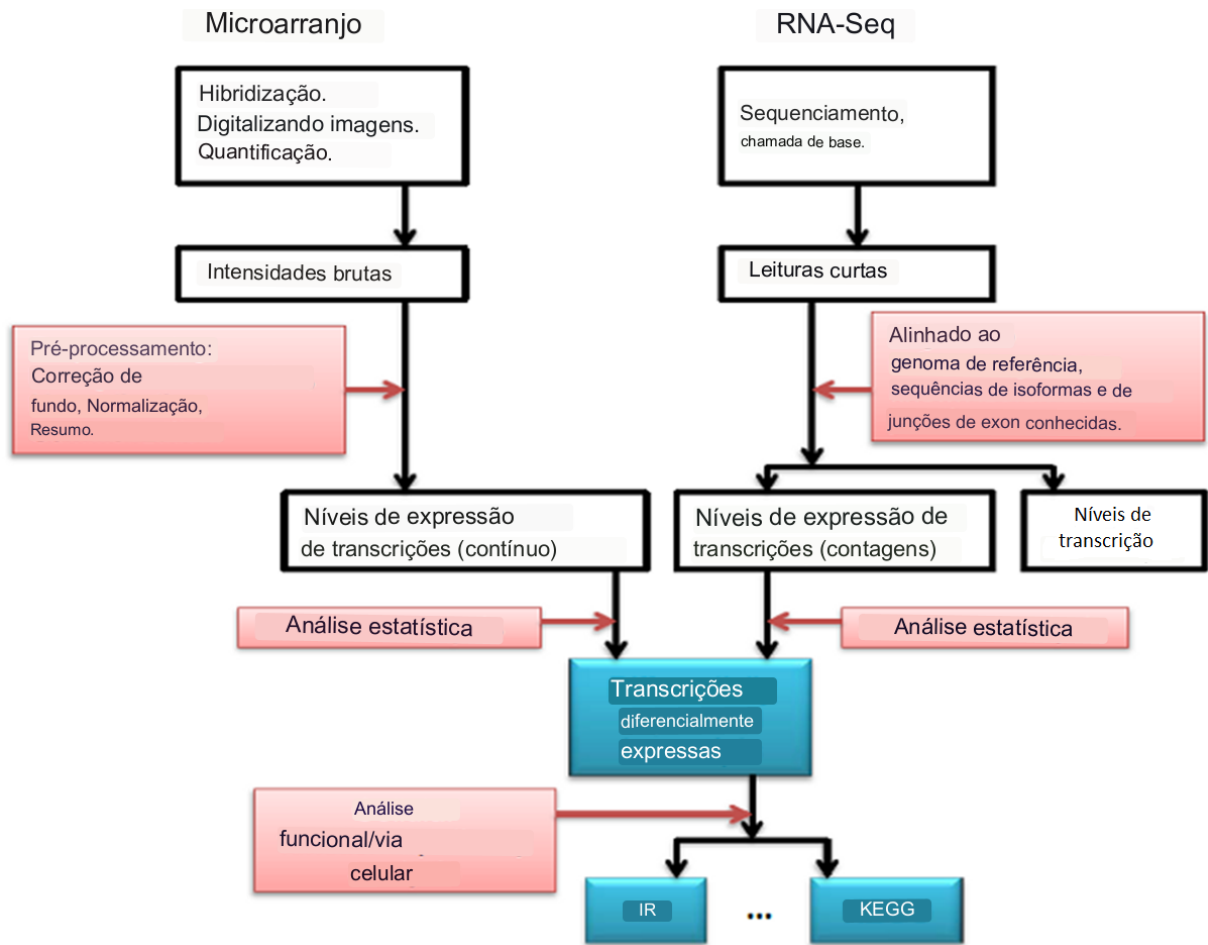
O genoma do ser humano identifica todos os genes responsáveis por nossas características normais e patológicas, porém, este ainda não é suficiente para entendermos a dinâmica de funcionamento do nosso genótipo. Estudos da informação genética humana frente a ataques de microrganismos invasores veem se tornando uma nova vertente da biologia molecular, no momento em que os cientistas

perceberam que em situações de estresse biológico alguns genes tendem a ser expressos enquanto outros se mantêm silenciados, mesmo quando se espera que sigam uma sistemática de funcionamento que mantenha o status quo daquilo presente na literatura científica (GOES & OLIVEIRA, 2014).

Tais questionamentos fez surgir o transcriptoma, que se baseia no estudo de transcritos de RNA, em suas mais variadas formas, quantificando-os e classificando-os de forma a entender como o organismo funciona frente a uma situação pré-estabelecida. Com isso, surge também a bioinformática, responsável por organizar e estudar essa grande quantidade de dados complexos oriundos da biologia molecular, preparando-os para serem estudados e esquematizados em bases de dados, de forma a resolver hipóteses e perguntas de interesse técnico-científico (WANG, 2009).

Dentre as técnicas mais utilizadas para análise de expressão gênica destacam-se o RNA-seq e o Microarranjo (Figura 3). A técnica de microarranjo, ou *microarray*, consiste em substratos sólidos, sobre os quais são fixados fragmentos específicos de DNA (sondas) capazes de reconhecer regiões específicas do material genético de uma amostra., sendo a metodologia mais antiga entre as duas. Inovou, pois permitiu o estudo simultâneo de vários genes, apesar de não conseguir avaliar duas espécies ao mesmo tempo e ser um método de baixa reprodutibilidade (MILLER & TANG, 2009).





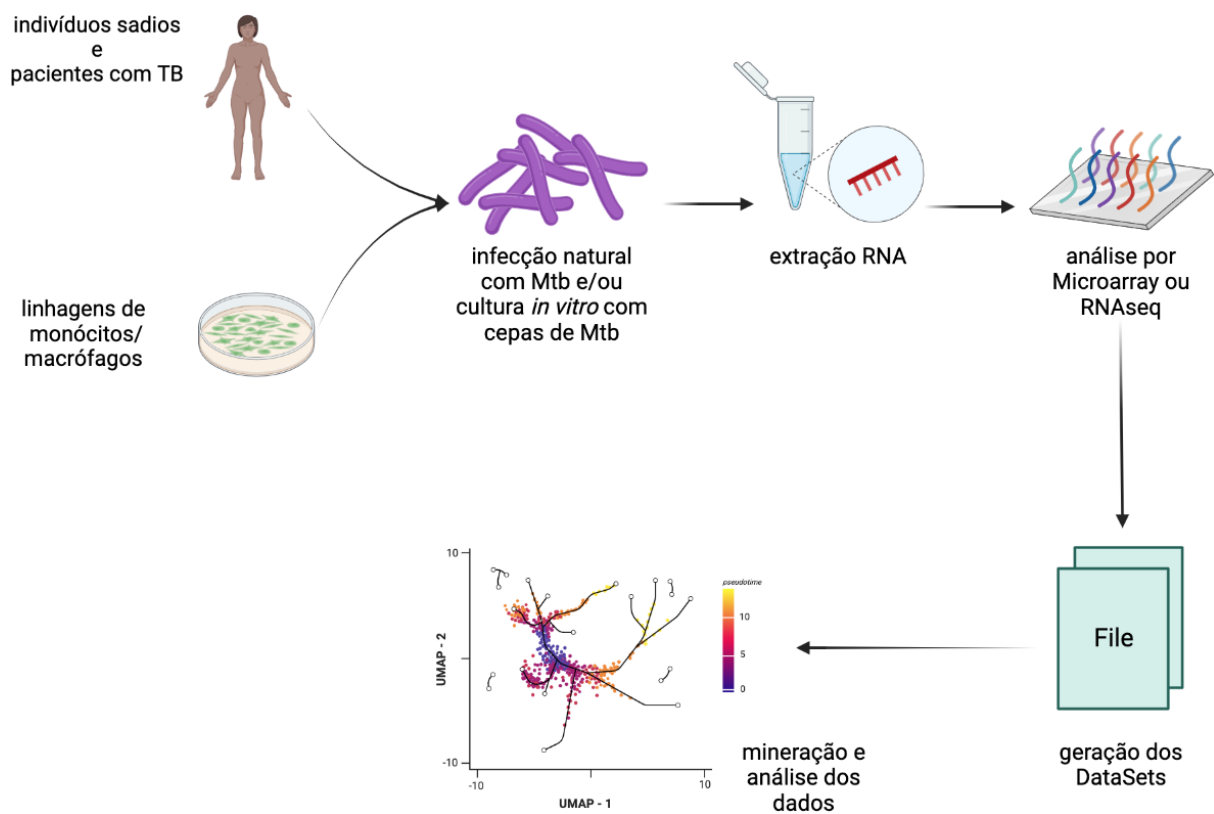
Fonte: Adaptada de Fang et al, 2012

**Figura 3: Visão geral do fluxo de trabalho de análise para perfil transcricional de microarray e RNA-seq.**

Por outro lado, a metodologia do RNA-seq, consegue analisar várias seqüências por amostra, não se limitando a apenas uma espécie por vez, além de ser capaz de identificar transcritos com baixo nível de expressão. Todos esses benefícios encarecem a técnica, já que ela se limita a pequenas quantidades de amostras. Geralmente, nas duas técnicas necessita-se transformar RNA em cDNA, com o intuito de deixar a seqüência que abrigará o gene de interesse mais estável. Acompanhando o ritmo do progresso, a imunologia buscou incorporar tais inovações ao seu campo de estudo, utilizando o transcriptoma como ferramenta complementar no estudo do comportamento de linhagens celulares no contexto de infecções, bem como o perfil de resposta desempenhando nessas situações de estresse celular (MALONE, 2006; MOITINHO JUNIOR, 2019).

## 2.5 Dados de expressão gênica e desenvolvimento de metanálises

Meta análise trata-se de um método quantitativo e científico que objetiva combinar os resultados de pesquisa realizados de forma independente, normalmente extraídos de pesquisas publicadas, são realizadas quando um autor necessita compilar uma grande quantidade de estudos ou informações em um só trabalho, criando sua própria base de dados e submetendo-a a uma análise que objetiva extrair o máximo de informações possíveis dentro de uma nova roupagem experimental (GUREVITCH et al., 2018) (Figura 4).



**Figura 4 – Algoritmo de escolha dos DataSets com base nos critérios de inclusão dos estudos.**

Os estudos com metanálise veem sendo muito utilizados no campo da transcriptômica, tendo em vista a imensa quantidade de transcritos de RNA que precisam ser analisadas, fazendo uma busca sistematizada em conjuntos de dados dispersos e com temáticas muitas vezes dissonantes, mas que mantêm em seu cerne um ponto em comum. Dentro desse cenário metodológico é comum que se busque

identificar, quando se trata de estudos na área da saúde, genes com padrão de transcrição alterados ou diferenciados, o que fez com que se cunhasse o termo “genes diferencialmente expressos”, ou DEGs, do inglês *differentially expressed genes*. A utilidade dos DEGs varia muito do enfoque que o autor busca dar à alteração da expressão gênica, entretanto, a maior parte sempre utiliza essas informações para entender o comportamento celular frente a um certo estímulo, já que a produção proteica de um organismo costuma variar à medida que é exposto a diferentes condições ambientais e de tempo (FILHO, 2014; ZHAO, 2018).

Cada trabalho determina de forma particular o que caracteriza um gene como diferencialmente expresso, contudo, o meio científico tem predileção por utilizar os valores de *Fold change* como parâmetro de referência no momento de classificar os DEGs. De maneira sucinta, o *fold change* expressa o quanto determinado gene é transcrito em uma rodada de análises experimentais, adotando um valor que pode variar muito de trabalho para trabalho, mas geralmente os valores perpassam de um a dois. A escala utilizada na determinação do valor numérico é um pouco diferente do comumente adotado na matemática, elevando-se o valor de *fold change* em uma unidade quando o resultado da contagem de transcritos contabilizados for equivalente ao dobro do valor inicial. Por exemplo: o valor basal de transcrição é 30, logo uma população celular que exprime um valor de 60 terá um *fold change* de 1. (JUNG, 2015; ZHAO, 2018).

Independentemente do enfoque da metanálise, esse tipo de trabalho está se tornando cada vez mais frequente, seja pelo seu caráter de pesquisa holística, seja pelos seus mais variados usos e formas de adaptar metodologias. Essa tendência no meio científico, principalmente na área da saúde, permite tornar o estudo e investigação de doenças um processo mais dinâmico e completo, possibilitando aos autores que empreguem os mais diversos métodos de busca e reunião de informações, com vistas a responder perguntas instigantes e complexa (HAIDICH, 2010; AKOBENG, 2005).



JORGE CHAM © 2014

WWW.PHDCOMICS.COM

**OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Avaliar a participação do gene *SIGIRR* na resposta imune a *Mycobacterium tuberculosis* no contexto da expressão de IL18 dependente de TLR.

#### 3.2 Específicos:

- Procurar, pela análise de banco de dados públicos, um conjunto de genes relevantes para a resposta imune a tuberculose, no contexto das vias de TLR, IL18 e SIGIRR;
- Avaliar as alterações na expressão desses genes em diferentes contextos de infecção por *Mtb* disponíveis em bancos de dados de RNA;
- Estabelecer a relevância e correlação entre as variações nos genes das vias de TLR, IFNG, SIGIRR e IL18 no desenvolvimento da tuberculose.



WWW.PHDCOMICS.COM

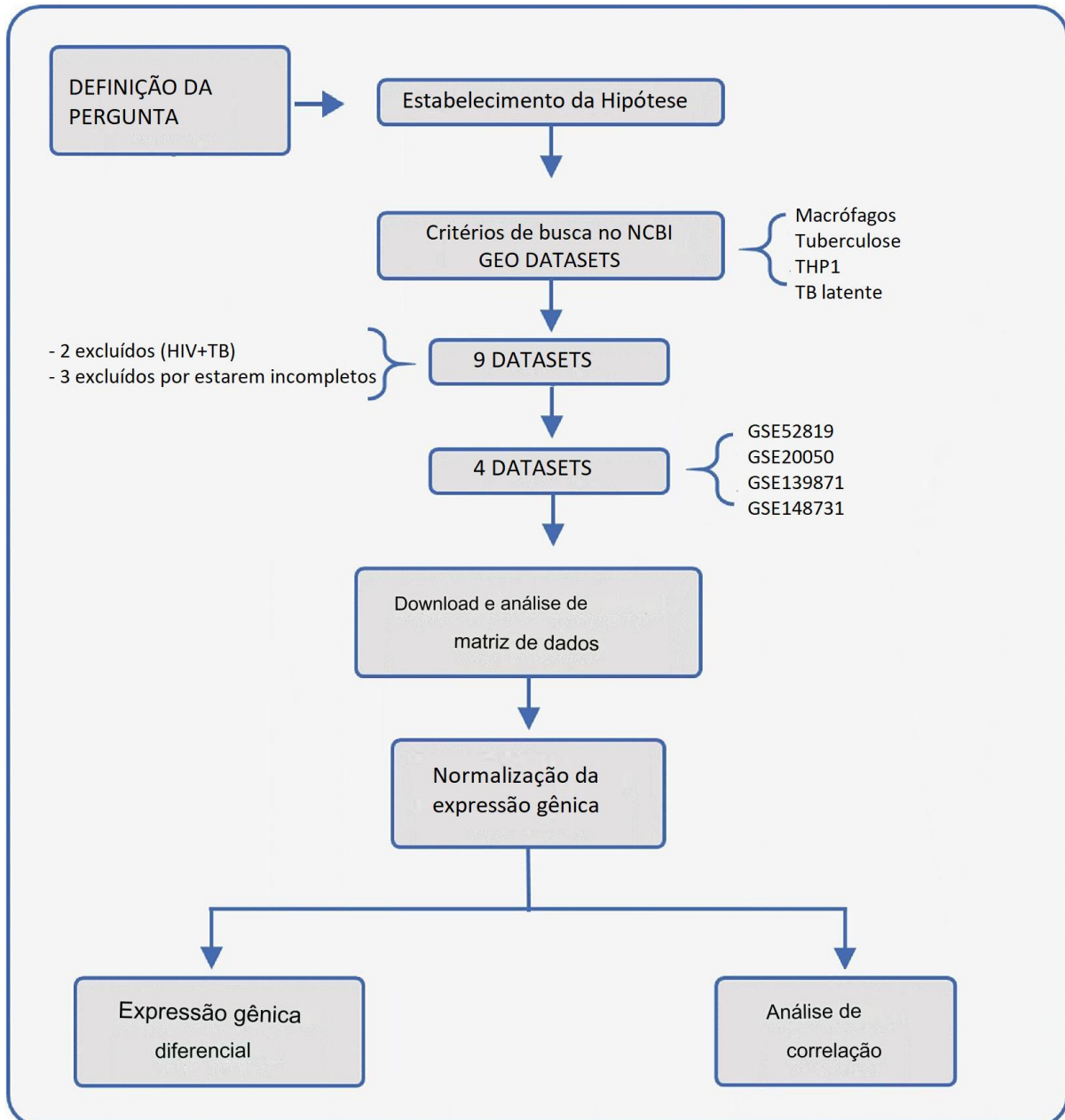
# MATERIAL E MÉTODOS

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção de dados

O primeiro passo para execução do trabalho consistiu na realização de um levantamento, nos bancos de dados do NCBI GEO DataSets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>), para identificação de conjuntos robustos de informações de expressão gênica publicamente disponíveis no contexto da infecção por tuberculose. Nesse sentido foram buscados trabalhos com os descritores tuberculose e *Mycobacterium tuberculosis* associados a: expressão gênica; tecido pulmonar; granuloma; células THP-1; monócitos; macrófagos; PBMC (células mononucleares do sangue periférico); humanos; infecção *in vitro* com a *Mtb*; tuberculose ativa; tuberculose latente; e RNA mensageiro. Ainda, foram considerados os DataSets com mais de duas amostras por grupo e grupos de controle para comparação (Figura 5). Além dos termos comuns para busca, como PBMC, tuberculose, entre outros, foram utilizados termos com relação histórica com o tema, como imunossupressão, HIV e AIDS.

Foram pré-selecionados 9 DataSets, 2 destes foram excluídos por tratarem de análises com pacientes em coinfeção de TB e HIV, e mais 3 por não apresentarem os dados completos. Para seleção dos DataSets também foram excluídos estudos com pacientes com comorbidades (e.g. diabetes, autoimunidades) ou em tratamento medicamentoso para tuberculose e gestantes.



**Figura 5 – Fluxograma para processamento de dados.** Foram selecionados trabalhos com análise de transcriptomas em humanos no contexto da tuberculose. Posteriormente, realizamos a exclusão de DataSets que incluíam a infecção por HIV. Em seguida, foi feita a seleção de DataSets com amostras de RNA extraídas de tecido pulmonar com presença de granuloma, macrófagos, monócitos e PBMC. As amostras foram colhidas de pacientes com infecção por Mtb ou esta foi realizada in vitro com células de linhagem humana, por exemplo THP-1. Todos os estudos selecionados também apresentaram grupos controle para comparação.

Em relação ao sequenciamento genético foram selecionados artigos com protocolos realizados nas plataformas: Illumina HiSeq 2500, Illumina HiSeq 2000, Illumina HiSeq 4000 (*Homo sapiens*), Illumina MiSeq (*Homo sapiens*), Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip, Agilent-072363 SurePrint G3 Human GE v3



8x60K Microarray, Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip, Affymetrix Human Clariom D Assay, Agilent-026652 Whole Human Genome Microarray 4x44K v2 e Ion Torrent Proton (*Homo sapiens*).

#### **4.2 Determinação do interactoma dos genes-alvo TLR/IFNG/IL18/SIGIRR**

Os DataSets foram selecionados e então delimitou-se os dados a serem analisados, optando pela via IL-18/SIGIRR (via pouco estuda, mas que vem se mostrando bastante promissora no desenvolvimento e progressão da TB), e dentro desta via delimitou-se 4 genes-alvo para estudo, *IL18*, *TLR4*, *IFNG*, *SIGIRR*.

As análises de interação entre os genes/proteínas foram realizadas nas plataformas STRING (<https://string-db.org/>), Revelen (<https://zs-revelen.com/>) e o SIGNOR3.0 (<https://signor.uniroma2.it/>). Para todas as plataformas, foi utilizado o escore de interação de 0,4, apresentando as interações mais significativas. Ainda, o “tamanho” do interactoma foi limitado ao máximo de 50 genes/proteínas. Após obtenção destes, para maior confiabilidade de dados restringimos o estudo àqueles que eram presentes em todas as plataformas através da montagem de um diagrama de Venn.

#### **4.3 Análise dos processos biológicos**

Foram obtidos 19 genes envolvidos na via *IL18/SIGIRR*, estes foram aplicados plataforma Enrichr, (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), para determinar os processos biológicos envolvidos com estes genes. Obteve-se uma tabela com 424 processos biológicos, destes foram selecionados 18, considerando aqueles que estavam relacionados aos genes alvo do estudo (*IFNG*, *TLR4*, *IL18* e *SIGIRR*). Dentre os 18 processos biológicos somente 13 apresentaram relevância estatística, levando-se em consideração p valor ajustado < 0,05. Construiu-se uma matriz com genes e processos biológicos definidos, estes foram representados em gráfico de círculo construído em <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/visualize/>.

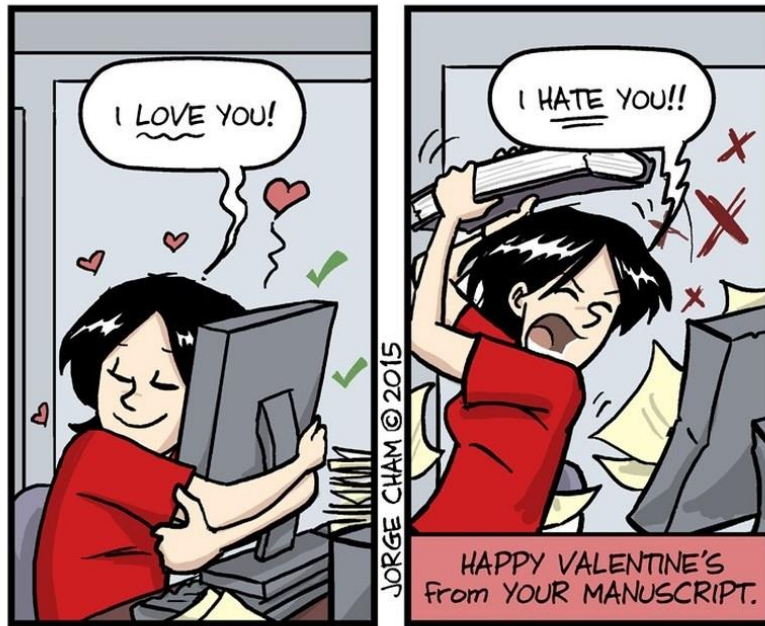
#### **4.4 Análise de expressão diferencial de dados em massa de RNA-seq e microarray**

Para caracterizar a assinatura imunológica dos perfis transcricionais globais na infecção por *Mtb*, as contagens de leitura de cada estudo de RNA-seq foram

transformadas (contagem log2 por milhão) e a ferramenta web Network Analyst 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca/>), conforme ZHOU et al, 2019, foi usada para realizar a análise de expressão diferencial, aplicando o pipeline DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>). Os estudos de Microarray foram analisados por meio do aplicativo da web GEO2R (BARRET et al, 2012) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), usando o pipeline limma-voom (LAW et al, 2014). Foram definidos os pontos de corte estatísticos de  $\log_2\text{-fold-change} > 1$  (regulado para cima) ou  $< -1$  (regulado para baixo) e o valor de  $p$  ajustado  $< 0,05$  para selecionar genes regulados para cima e para baixo entre os grupos associados à infecção por *Mtb* e grupos normais.

#### **4.5 Determinação de correlação entre as expressões gênicas**

As correlações foram realizadas no GraphPad Prism 10.0, levando em consideração os 19 genes relevantes na via estabelecida neste trabalho e todos os contextos de infecção por *Mtb* abordados nos conjuntos de dados selecionados. Após a análise geral, realizou-se a análise dos genes alvo (*IFNG*, *TLR4*, *IL18* e *SIGIRR*). Para realizar a análise de correlação entre genes associados foi utilizado o coeficiente de Pearson ( $r$ ) e adotamos a correlação fraca quando  $r=0$  e correlação forte quando  $r=1/-1$ .



JORGE CHAM © 2015

WWW.PHDCOMICS.COM

**RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DataSets selecionados para análise

Obedecendo os critérios de inclusão estabelecidos no projeto para análise da infecção somente por *Mtb* foram selecionados os DataSets de códigos GSE52819 (monócitos), GSE20050 (células do tecido pulmonar), GSE139871 (monócitos) GSE148731 (macrófagos) (Quadro 1).

O tipo de análise utilizada nestas análises foi o microarray para três dos DataSets (GSE52819, GSE20050 e GSE139871), e apenas o DataSet GSE148731 utilizou o método de RNAseq. GSE20050 apresentou o maior número de genes disponíveis e GSE52819 o menor número de genes.

Foram utilizadas células provenientes de pacientes e indivíduos saudáveis nas análises de GSE20050 e GSE139871, enquanto que nos demais DataSets, trabalhou-se com células de linhagens *in vitro*.

**Quadro 1. Caracterização dos 4 DataSets selecionados no GEO DataSets (NCBI).**

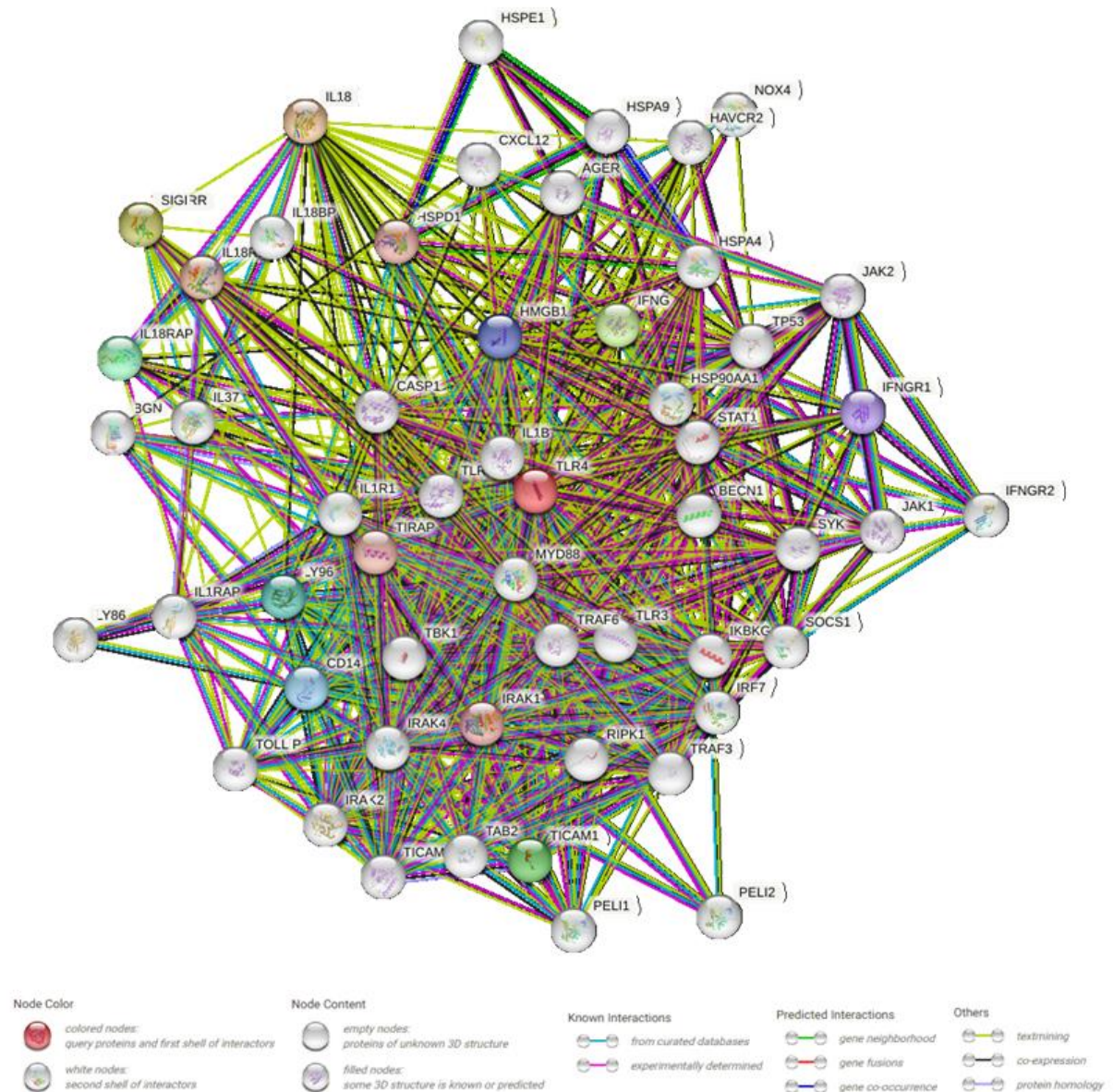
<b>DataSets</b>	<b>Descrição do Estudo</b>	<b>Tipo de análise</b>	<b>Amostra</b>	<b>Resultados pertinentes</b>	<b>Número de genes</b>
GSE 52819	Análise de macrófagos infectados com <i>Mtb</i> e tratados com Vitamina D.	Microarray	Monócitos derivados de THP-1 infectados com <i>Mtb</i> (H37Rv) e tratados ou não com Vitamina D.	A vitamina D induziu a produção de IL- $\beta$ através da sinalização parácrina de macrófagos.	22119 genes
GSE 20050	Análise da expressão gênica de macrófagos presentes em granulomas.	Microarray	Macrófagos obtidos de pacientes com granulomas	O metabolismo lipídico pode ser influenciado pelo <i>Mtb</i> . A via do estresse do retículo endoplasmático pode induzir apoptose em macrófagos de granulomas. O gene ITK pode atuar no combate ao <i>Mtb</i> em casos com formação de granulomas.	61359 genes
GSE 139871	Análise do mRNA de monócitos de pacientes com TB	Microarray	Monócitos sadios infectados com cepas de <i>Mtb</i> UT127 e UT205	Foram observadas diferenças significativas de expressão gênica entre	47323 genes

	comparados com monócitos de pacientes sadios. Também foram comparados os mRNA de monócitos infectados com cepas de <i>Mtb</i> (UT127 e UT205).			os macrófagos sadios e os infectados, tendo sido identificados 48 DEGs.	
GSE 148731	Análise do impacto do <i>Mtb</i> no metabolismo de macrófagos M1 e M2 oriundos de indivíduos sadios e, posteriormente, infectados com <i>Mtb</i> H37Rv.	RNAseq	Macrófagos diferenciados com fenótipos M1 e M2 infectados com cepas de <i>Mtb</i> H37Rv	A infecção por <i>Mtb</i> pode influenciar no metabolismo dos macrófagos, aumentando a síntese de NAD <sup>+</sup> e glutatona, na glicólise, e na via da creatina fosfato	60448 genes

## **5.2 Identificação *in silico* do interactoma de genes relevantes para a resposta imunológica na tuberculose com base na relação TLR/IL18**

Dentre as inúmeras vias de sinalização imunológica que podem ser avaliadas com os dados selecionados, optou-se por analisar a via da citocina IL-18 e aos TLRs, já reconhecidamente importante para a resposta imunológica na tuberculose. Foi agregada à análise a proteína SIGIRR. Para realizar uma análise mais minuciosa da via da IL-18 a possível interação direta ou indireta com SIGIRR, foi realizada uma busca em três bases de dados de criação de redes de interação entre proteínas, STRING, Reven e Signor 3.0.

A análise via STRING revelou um cluster de 54 proteínas envolvidas na resposta imune no contexto da IL-18, com indicação da participação de SIGIRR na via de expressão do receptor de IL-18, IL18R. Ainda, foram identificados agrupamentos de genes/proteínas relacionados à via dos receptores do tipo Toll (TLR), relevantes para o reconhecimento do *Mtb* (Figura 6).

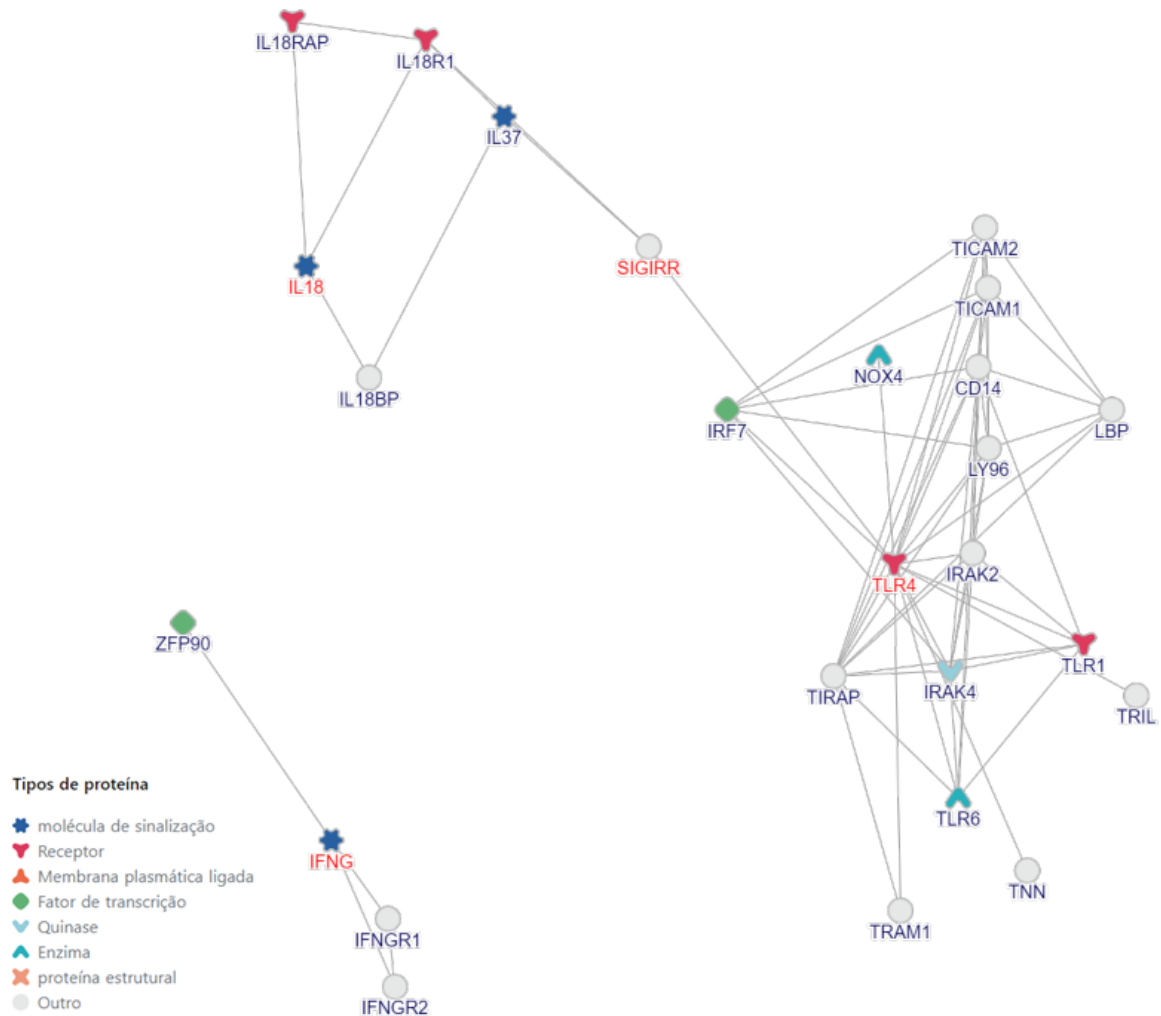


**Figura 6. Diagrama de interação proteína-proteína STRING na via de sinalização IL-18 e SIGIRR.** A análise de enriquecimento de GO de interações proteína-proteína entre genes/proteínas de interesse para o estudo. Os círculos representados na rede indicam todas as proteínas produzidas por um único locus gênico codificador de proteínas. As linhas traçadas entre os círculos representam associações proteína-proteína. Tais associações devem ser específicas e significativas, ou seja, as proteínas contribuem conjuntamente para uma função compartilhada.

No Revelen, 26 genes/proteínas foram indicados pela base, apresentando 66 interações entre eles, seguindo os parâmetros de anotação e confiabilidade adotados (Figura 7). Nesta análise foi observada a formação de um cluster de interação envolvendo IL-18 e SIGIRR, no qual esta última mostra-se como proteína de sinalização entre o reconhecimento via TLR e a via intrínseca de IL-18. No entanto, diferente do identificado no STRING, as análises no Revelen mostram o cluster de

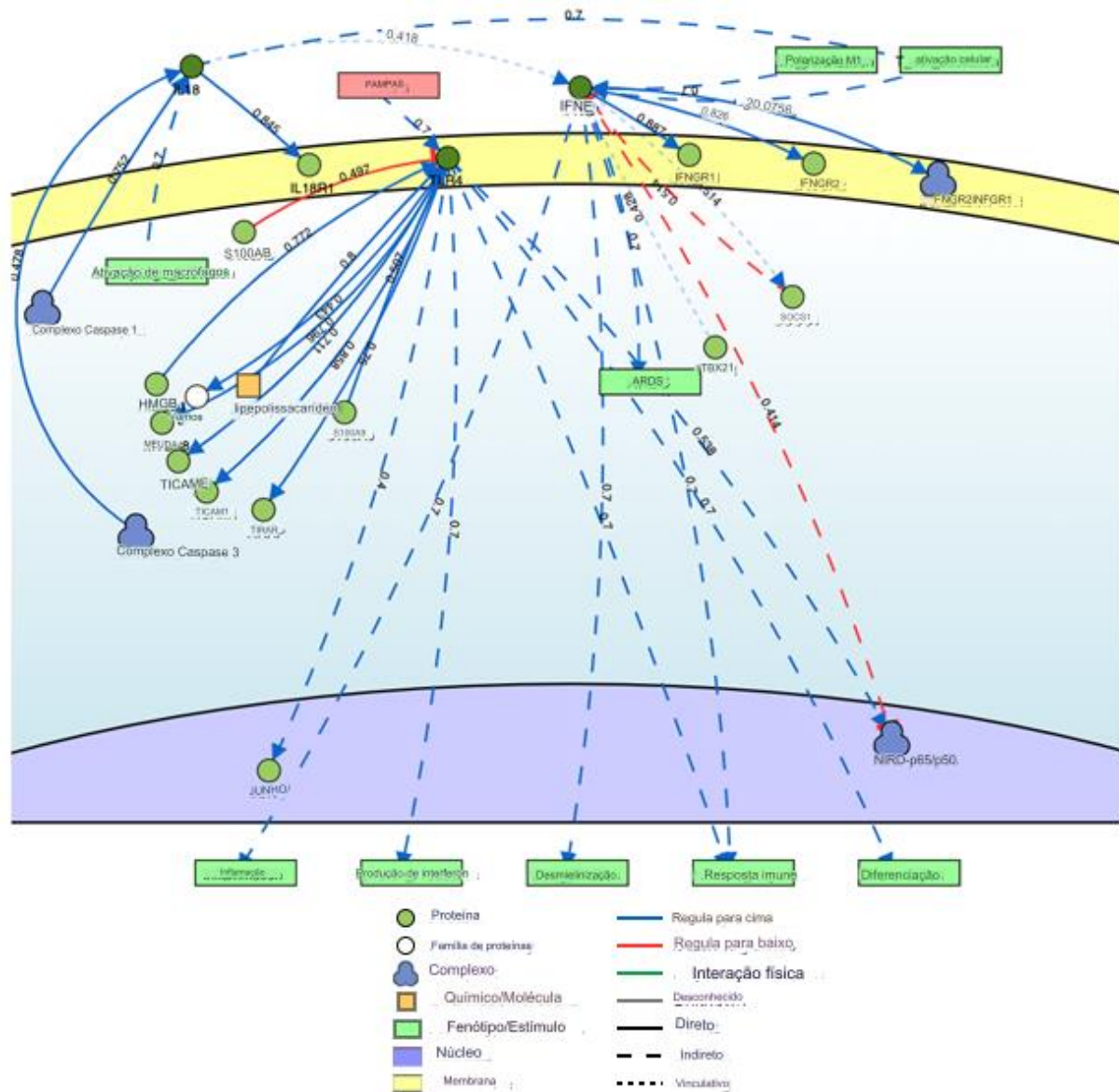


resposta de interferons separado, sem interação, com o cluster principal *TLR/SIGIRR/IL18*.



**Figura 7. Diagrama Revelen de interação de genes/proteínas envolvidos(as) na via de sinalização IL-18 e SIGIRR.** Resultados da visualização da anotação GO net em FEP/FES representando a estrutura hierárquica dos termos GO e os genes envolvidos na via de IL18 e SIGIRR.

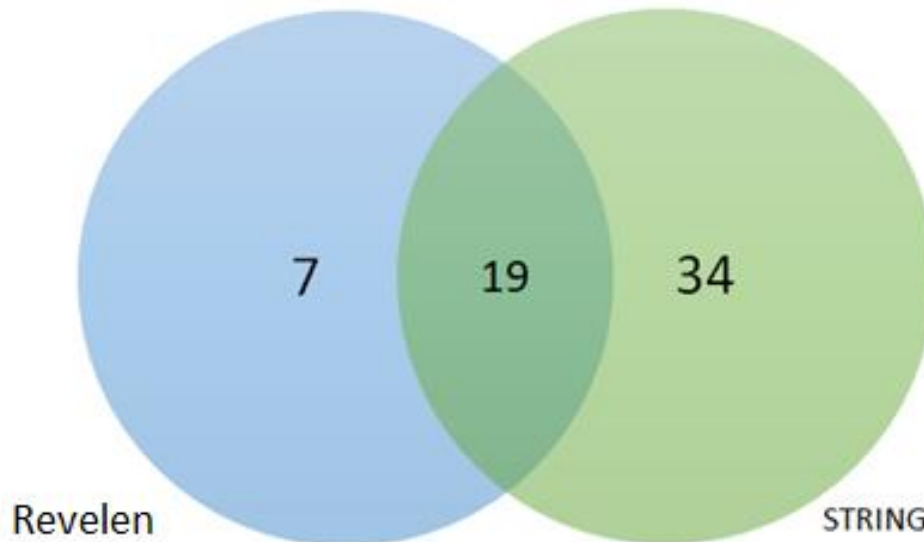
Já a análise na plataforma Signor 3.0 apresentou 25 genes/proteínas dentro dos parâmetros de anotação e confiabilidade estabelecidos para nosso estudo (Figura 8). Curiosamente, nesta análise não foi observada a presença de SIGIRR nas relações construídas. Somente a interação entre TLR4, IL-18 e IFNG ficou evidente na análise.



**Figura 8. Diagrama Signor 3.0 de interação de genes/proteínas envolvidos(as) na via de sinalização IL-18 e SIGIRR.** Resultados da visualização da anotação baseada em evidências experimentais sobre interações causais entre proteínas e outras entidades de relevância biológica: estímulos, fenótipos, inibidores de enzimas, complexos, famílias de proteínas etc. Os dados estão representados graficamente em distribuição nos diferentes locais das células (e.g. núcleo - lilás, citoplasma - degradê azul, membrana plasmática - amarela), em estrutura de relação direta para os genes envolvidos na via de IL18 e SIGIRR.

Para agregar maior precisão à análise, os genes selecionados no estudo de interactoma pelo STRING e Revelen, uma vez que o Signor 3.0 não inseriu o SIGIRR, foram listados para a composição de um diagrama de Venn (Figura 9), possibilitando assim que fossem identificados aqueles que se repetem em ambas as bases de dados. Dessa forma, a extração dos dados de expressão gênica foi direcionada ao

conjunto de 19 genes/proteínas alvo para avaliação da participação de *SIGIRR* na via de ativação de TLR/IL18/IFNG.

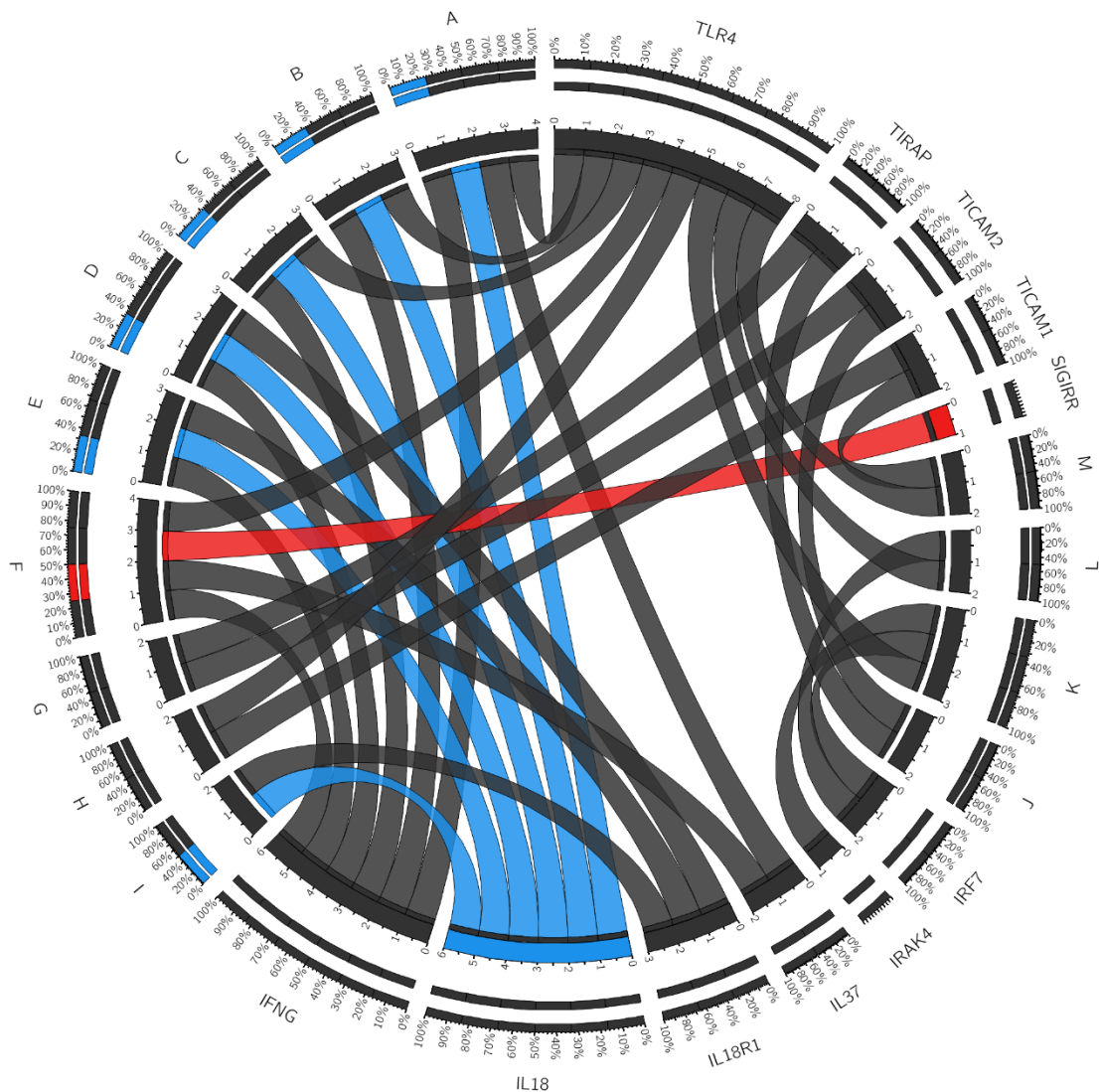


PLATAFORMAS UTILIZADAS	Nº GENES	GENES MOSTRADOS
<b>Revelen + STRING</b>	19	<i>TLR4, IL8, IL8RAP, IL8R1, IL37, IRAK2, IFNG, IL8BP, LY96, NOX4, TICAM2, IRAK4, SIGIRR, IFNGR1, TIRAP, IFNGR2, CD14, IRF7, TICAM1</i>
<b>Revelen</b>	26	<i>TRL6, TNN, TRIL, TLR1, TRAM1, ZFP90, LBP</i>
<b>STRING</b>	53	<i>SYK, HSPD1, BGN, AGER, HSPE1, IKBKG, TOLLIP, BECN1, JAK2, TRAF3, RIPK1, TBK1, HSPA9, IL1B, CASP1, TRAF6, ILIR1, HSPA4, IRAK1, IL1RAP, PELI1, LY86, HSP90AA1, TAB2, SOCS1, HMGB1, TP53, PELI2, STAT1, JAK1, TLR3, HAVCR2, TLR2</i>

**Figura 9. Diagrama de Venn contendo os 19 genes que constam simultaneamente nos interactoma das plataformas STRING e Revelen.** Diagrama de Venn abordando os genes presentes nas vias de sinalização obtidas através das bases de dados. O grupo em verde abrange os genes listados pelo STRING, enquanto o grupo azul engloba os genes do Revelen. A intersecção dos dois conjuntos elenca apenas os genes presentes simultaneamente em ambos os grupos. Gerado no VIB/UGent.

### 5.3 Processos biológicos associados aos genes relevantes na tuberculose com base na relação TLR/IL18

Após a composição final para este estudo do conjunto de genes/proteínas associados à infecção por *Mtb*, procedeu-se a avaliação da repercussão dos mesmos em processos biológicos relacionados à resposta imunológica. O conjunto de genes selecionados apontam grande importância em determinados contextos biológicos, nesta análise foi possível observar a IL18 envolvida nos processos como a regulação da resposta inflamatória, regulação positiva da resposta de defesa, regulação positiva na produção de interferon gama, regulação na produção de interferon gama e regulação positiva da produção de citocinas por células T, enquanto que a molécula SIGIRR mostrou associação a regulação negativa de citocinas (Figura 10).



**Figura 10. GOplot de vias imunológicas selecionadas e genes associados. A –** Regulação da resposta inflamatória, **B –** Regulação positiva da resposta inflamatória, **C –** Regulação positiva da resposta de defesa, **D –** Regulação positiva na produção de interferon

gama, E – Regulação na produção de interferon gama, F – Regulação negativa na produção de citocinas, G – Regulação positiva da via de sinalização do receptor toll-like 4, H – Regulação positiva na produção de citocinas envolvendo a resposta inflamatória, I – Regulação positiva da produção de citocinas por células T, J - Regulação da via de sinalização do receptor toll-like 4, K – Resposta imune inata, L – Regulação positiva na produção de interferon tipo I, M – Regulação na produção de citocinas envolvendo a resposta inflamatória. Destaque azul para IL18 e destaque vermelho para SIGIRR. Foram consideradas vias que apresentaram p valor < 0,05.

#### 5.4 Expressão dos genes relacionados a TLR/IL18 envolvidos na resposta a *Mtb*

A partir das avaliações anteriores foi definido um conjunto de genes/proteínas, juntamente com os genes-alvo iniciais, para composição da base primária de dados para as análises de expressão: *CD14, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL37, IRAK2, IRAK4, IRF7, LY96, NOX4, SIGIRR, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TLR4*.

O primeiro DataSet a ser analisado foi o GSE52819, gerado por uma pesquisa que abordou o padrão de transcrição gênica de macrófagos alveolares infectados com *Mtb* (cepa H37rv), submetidos ou não ao estímulo com vitamina D. Estes dados são referentes a 4 grupos de análise: não infectados, não infectados tratados com vitamina D, infectados, infectados tratados com vitamina D. Nosso objeto de estudo é a infecção pelo *Mtb*, dessa forma, não utilizamos os dados referentes ao tratamento. A expressão gênica foi ajustada para demonstrar o *fold change* a partir do grupo não infectado como referência para os outros grupos. Dos 19 genes analisados, 12 apresentaram alteração na expressão entre o grupo não infectado e o infectado sem tratamento (*IFNGR1, IFNGR2, IL18R1, IL18RAP, IRF7, IL37, IRAK2, LY96, NOX4, TICAM1, TICAM2, TLR4*) (Tabela 1).

**Tabela 1. Expressão gênica diferencial em macrófagos derivados de THP-1 infectados com *Mtb* (GSE52819).**

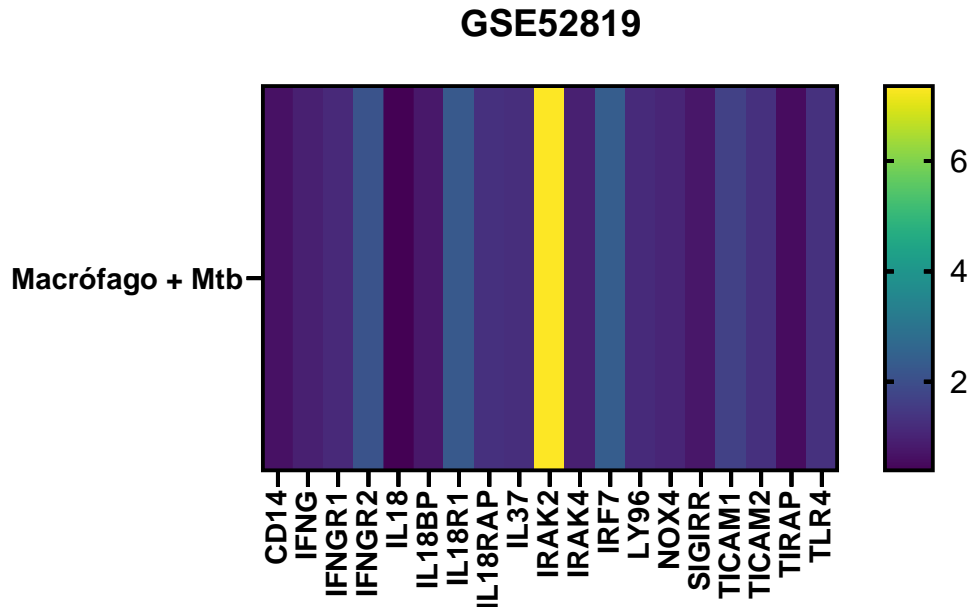
Macrófagos e DEGs	MØ + <i>Mtb</i>	
	<i>fold change</i> <sup>1</sup>	Alteração da expressão <sup>1</sup>
<b><i>CD14</i></b>	0,678	Sem alteração

<b><i>IFNG</i></b>	0,973	Sem alteração
<b><i>IFNGR1</i></b>	1,173	Upregulated
<b><i>IFNGR2</i></b>	2,148	Upregulated
<b><i>IL18</i></b>	0,392	Sem alteração
<b><i>IL18BP</i></b>	0,813	Sem alteração
<b><i>IL18R1</i></b>	2,296	Upregulated
<b><i>IL18RAP</i></b>	1,332	Upregulated
<b><i>IL37</i></b>	1,280	Upregulated
<b><i>IRAK2</i></b>	7,349	Upregulated
<b><i>IRAK4</i></b>	0,980	Sem alteração
<b><i>IRF7</i></b>	2,403	Upregulated
<b><i>LY96</i></b>	1,204	Upregulated
<b><i>NOX4</i></b>	1,088	Upregulated
<b><i>SIGIRR</i></b>	0,797	Sem alteração
<b><i>TICAM1</i></b>	1,704	Upregulated
<b><i>TICAM2</i></b>	1,322	Upregulated
<b><i>TIRAP</i></b>	0,583	Sem alteração
<b><i>TLR4</i></b>	1,356	Upregulated

<sup>1</sup> dados em relação ao controle não infectado. DEGs: do inglês, *differentially expressed genes* – genes diferencialmente expressos; MØ: macrófagos (nestes dados as células foram derivadas de células THP-1).

Dentre os 12 genes que apresentaram alteração, o gene *IRAK2* apresentou maior destaque, exibindo maior regulação positiva no contexto de infecção de

macrófagos derivados de THP1. No entanto, gene *IL18* não apresentou diferenciação na sua expressão (Figura 11).



**Figura 11. Heatmap com expressão da regulação dos genes em perfil de macrófagos infectados com *Mtb*.** Mapa de calor indicando a expressão gênica de macrófagos alveolares infectados com *Mtb* não tratados com Vit. D, referente ao DataSet GSE52819. Em tons de azul escuro os genes menos regulados ou sem alteração na expressão e em amarelo gene com maior expressão na regulação.

O segundo DataSet analisado foi o GSE20050, este traz uma análise da expressão gênica de macrófagos contidos em granuloma. Estes dados são referentes a amostras de 3 grupos de tecidos pulmonares de pacientes com tuberculose com extensa cavitação pulmonar e degeneração tecidual. Este tecido foi dissecado pela técnica de *laser capture microdissection* (LCM), excluindo tecido pulmonar não envolvido. Para o controle foram realizadas análises de 2 grupos de estudo com a utilização de tecido pulmonar não envolvido pelo granuloma dos pacientes com tuberculose, uma vez que não se justifica a realização de biopsia em tecido pulmonar saudável. A expressão gênica foi ajustada para demonstrar o *fold change* a partir do tecido não adjacente como referência.

Dos 19 genes analisados, 18 apresentaram alteração na expressão entre o tecido granulomatoso e o tecido sem a influência direta de *Mtb*. Apenas o gene *IL37* não apresentou informações contidas no material analisado (Tabela 2; Figura 12).

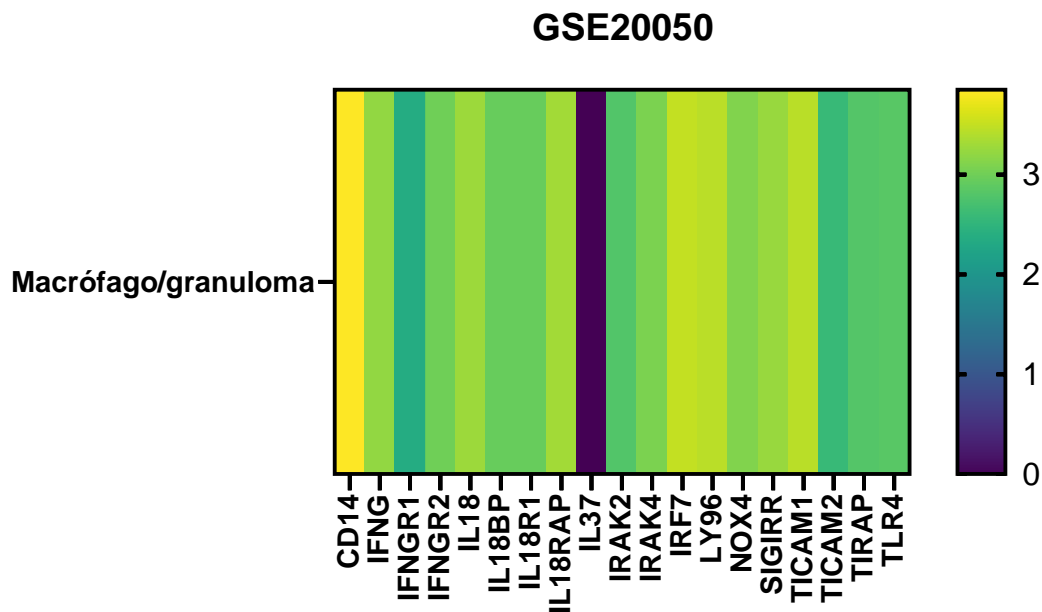
**Tabela 2. Expressão gênica diferencial em macrófagos provenientes de granulomas de pacientes infectados com *Mtb* (GSE50020).**

	<b>MØ de granuloma caseoso de pacientes com <i>Mtb</i></b>	
<b>DEGs</b>	<b><i>fold change</i><sup>1</sup></b>	<b>Alteração da expressão<sup>1</sup></b>
<b><i>CD14</i></b>	3,850	Upregulated
<b><i>IFNG</i></b>	3,221	Upregulated
<b><i>IFNGR1</i></b>	2,639	Upregulated
<b><i>IFNGR2</i></b>	3,005	Upregulated
<b><i>IL18</i></b>	3,283	Upregulated
<b><i>IL18BP</i></b>	2,957	Upregulated
<b><i>IL18R1</i></b>	2,959	Upregulated
<b><i>IL18RAP</i></b>	3,320	Upregulated
<b><i>IL37</i></b>	0	Sem alteração
<b><i>IRAK2</i></b>	2,803	Upregulated
<b><i>IRAK4</i></b>	3,087	Upregulated
<b><i>IRF7</i></b>	3,505	Upregulated
<b><i>LY96</i></b>	3,455	Upregulated
<b><i>NOX4</i></b>	3,121	Upregulated
<b><i>SIGIRR</i></b>	3,258	Upregulated
<b><i>TICAM1</i></b>	3,448	Upregulated
<b><i>TICAM2</i></b>	2,587	Upregulated



<b>TIRAP</b>	2,821	Upregulated
<b>TLR4</b>	2,847	Upregulated

<sup>1</sup> dados em relação ao controle não infectado. DEGs: do inglês, *differentially expressed genes* – genes diferencialmente expressos; MØ: macrófagos (nestes dados as células foram provenientes do granuloma de pacientes infectados com *Mtb*)



**Figura 12. Heatmap com expressão da regulação dos genes em macrófagos contidos no granuloma.** Mapa de calor indicando a expressão gênica de macrófagos inseridos no granuloma de pacientes com tuberculose em grau avançado, referente ao DataSet GSE20050. Em tons de azul escuro os genes menos regulados ou sem alteração na expressão e em amarelo gene com maior expressão na regulação.

O DataSet GSE148731 foi gerado a partir de estudo de diferentes fenótipos de macrófagos quando infectados pela *Mtb*. Este DataSet diferiu dos demais, até então apresentados neste trabalho, pois os macrófagos passaram pela indução de polarização para os perfis M1 e M2. Para os dois perfis, as amostras foram coletadas depois de 4 e 24 horas de incubação com *Mtb*, permitindo observar o comportamento de transcrição precoce e tardio. Dessa forma, foi observado para o perfil M1 a alteração em todos os 19 genes avaliados em 4 horas de infecção e em 17 genes avaliados em 24 horas de infecção. Para o perfil M2, 17 genes avaliados em 4 horas de infecção apresentaram expressão diferencial e todos os 19 genes avaliados estavam com alterações em 24 horas de infecção (Tabela 3). Os macrófagos M1, com

4 horas de infecção, e os macrófagos M2, com 24 horas de infecção, apresentaram os maiores antagonismos de expressão gênica no contexto da infecção pelo bacilo.

**Tabela 3. Expressão gênica diferencial em macrófagos dos perfis M1 e M2 infectados por *Mtb* por 4 e 24 horas (GSE148731).**

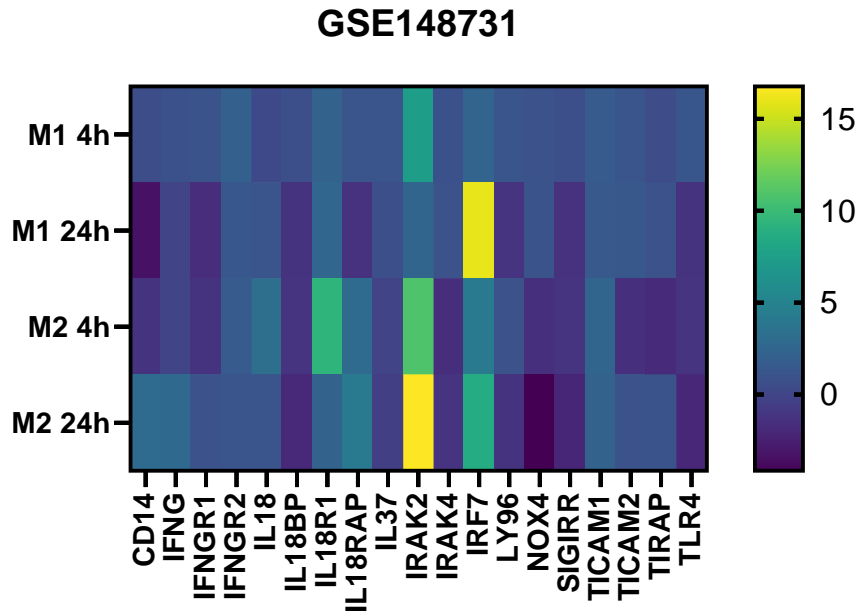
	<b>M1 4h</b>	<b>M1 24h</b>	<b>M2 4h</b>	<b>M2 24h</b>
<b><i>CD14</i></b>	Downregulated -1,18558	Downregulated -3,21611	Downregulated -1,18724	Upregulated 3,028518
<b><i>IFNG</i></b>	Downregulated - 0, 2282	Sem alteração 0	Sem alteração 0	Upregulated 2,876364
<b><i>IFNGR1</i></b>	Downregulated -1,03091	Downregulated -1,5737	Downregulated -1,15268	Upregulated 1,035956
<b><i>IFNGR2</i></b>	Upregulated 1,661891	Upregulated 1,456443	Upregulated 1,70802	Upregulated 1,210607
<b><i>IL18</i></b>	Upregulated 1,363564	Upregulated 1,207339	Upregulated 3,362602	Upregulated 1,29332
<b><i>IL18BP</i></b>	Upregulated 1,048306	Downregulated -1,16105	Downregulated -1,08318	Downregulated -1,84117
<b><i>IL18R1</i></b>	Upregulated 2, 436839	Upregulated 2,586802	Upregulated 9,365415	Upregulated 2,2903
<b><i>IL18RAP</i></b>	Upregulated 1,858253	Downregulated -1,22239	Upregulated 2,992157	Upregulated 4,356835
<b><i>IL37</i></b>	Upregulated 1,34329	Sem alteração 0,7861	Sem alteração 0	Downregulated -0,37152
<b><i>IRAK2</i></b>	Upregulated 4,65478	Upregulated 2,537495	Upregulated 10,91873	Upregulated 16,73689

<b><i>IRAK4</i></b>	Downregulated -1,01298	Upregulated 1,042094	Downregulated -1,49496	Downregulated -1,08324
<b><i>IRF7</i></b>	Upregulated 1,344878	Upregulated 16,00006	Upregulated 4,301516	Upregulated 8,68235
<b><i>LY96</i></b>	Downregulated -1,04279	Downregulated -1,10894	Upregulated 1,026252	Downregulated -1,17337
<b><i>NOX4</i></b>	Downregulated -1,29734	Upregulated 1,107313	Downregulated -1,30208	Downregulated -4,14935
<b><i>SIGIRR</i></b>	Downregulated -1,099	Downregulated -1,23697	Downregulated -1,1126	Downregulated -2,01283
<b><i>TICAM1</i></b>	Upregulated 1,15236	Upregulated 1,57452	Upregulated 2,524612	Upregulated 2,249624
<b><i>TICAM2</i></b>	Upregulated 1,110622	Upregulated 1,466251	Downregulated -1,34571	Upregulated 1,051014
<b><i>TIRAP</i></b>	Downregulated -1,06094	Upregulated 1,039004	Downregulated -1,76374	Upregulated 1,148763
<b><i>TLR4</i></b>	Downregulated -1,08348	Downregulated -1,17904	Downregulated -1,11162	Downregulated -1,91624

DEGs: do inglês, *differentially expressed genes* – genes diferencialmente expressos; M1 e M2: macrófagos (derivados de monócitos isolados de *buffy coats* de doadores saudáveis e diferenciados com M-CSF ou GM-CSF).

Neste contexto de infecção de macrófagos polarizados, observou-se maior variação na expressão dos genes, havendo genes com regulação positiva e negativa. No entanto, destacam-se os genes *TLR4* e *SIGIRR*, apresentando regulação negativa para os 4 grupos avaliados. Além disso, se observa os genes *IRAK2* e *IRF7* apresentando destaque com regulação positiva nos grupos infectados de perfil M1

24h e Perfil M2 24h, respectivamente (Figura 13), salientando sua importância nas infecções por TB.



**Figura 13. Heatmap com expressão da regulação dos genes em macrófagos M1 e M2.** Mapa de calor dos 19 genes selecionados com expressão diferencial, no contexto da infecção de macrófagos polarizados para os perfis M1 ou M2 com *Mtb*. O padrão de expressão gênica mostra quatro agrupamentos diferentes indicando um padrão de expressão divergente entre os diferentes grupos de tratamento: 1 - Macrófagos M1 após 4h; 2 - Macrófagos M1 após 24h; 3 - Macrófagos M2 após 4h; 4 - Macrófagos M2 após 24h, referentes ao DataSet GSE148731. Em tons de azul escuro os genes menos regulados ou sem alteração na expressão e em amarelo gene com maior expressão na regulação.

O DataSet GSE139871 foi gerado a partir de um estudo do padrão de transcrição de monócitos infectados com duas cepas do *Mtb*, UT127 e UT205, sendo a última mais virulenta que a primeira. O trabalho dividiu os grupos a serem analisados primeiramente em monócitos controle oriundos de pessoas saudáveis e monócitos oriundos de pessoas com tuberculose. Estas células foram então incubadas com a *Mtb* cepa UT127 ou *Mtb* cepa UT205. Os monócitos de pacientes com TB foram considerados já infectados, sendo a incubação com as cepas de *Mtb* considerada como reinfecção. Os dados brutos do DataSet continham 47323 genes, sendo que para gerar o *fold change* deste estudo foi necessário primeiro obter e traduzir o código ID de cada um dos 19 genes selecionados. Após a identificação dos genes, foi calculado o *fold change*, tendo em vista que o trabalho disponibilizou apenas os *read counts* de cada gene em cada uma das 24 amostras. A partir do cálculo realizado

observou-se a expressão diferencial em 13 genes no grupo com monócitos saudáveis infectados com a cepa UT127 (*CD14, IFNGR2, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL37, IRAK2, IRF7, NOX4, SIGIRR, TICAM1, TIRAP*), e 12 genes no grupo com monócitos saudáveis infectados com a cepa UT205 (*IFNG, IFNGR2, IL18, IL18R1, IL18RAP, IL37, IRAK2, IRF7, NOX4, SIGIRR, TICAM1, TIRAP*). No grupo com monócitos de pacientes com tuberculose sendo posteriormente infectados com a cepa UT127, foram encontrados 12 genes com expressão diferencial (*IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IL18, IL18R1, IL18RAP, IL37, IRAK2, IRF7, TICAM1, TICAM2, TIRAP*); já nos reinfectados com UT205 foram encontrados 12 genes (*IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IL18, IL18R1, IL37, IRAK2, IRF7, SIGIRR, TICAM1, TICAM2, TIRAP*) (Tabela 4).

**Tabela 4. Expressão gênica diferencial em monócitos de sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes com tuberculose infectados com duas cepas de *Mtb* (GSE139871).**

	<b>FC PBM 127 sadios</b>	<b>FC PBM 205 sadios</b>	<b>FC PBM 127 TB</b>	<b>FC PBM 205 TB</b>
<b><i>CD14</i></b>	Upregulated 1,034006021	Sem alteração 0,890752799	Sem alteração 0,95995794	Sem alteração 0,992602289
<b><i>IFNG</i></b>	Sem alteração 0,99848761	Upregulated 1,018336509	Upregulated 1,016570583	Upregulated 1,054591938
<b><i>IFNGR1</i></b>	Sem alteração 0,965905809	Sem alteração 0,965905809	Upregulated 1,023063967	Upregulated 1,014837131
<b><i>IFNGR2</i></b>	Upregulated 1,043555315	Upregulated 1,046642621	Upregulated 1,048756322	Upregulated 1,04316893
<b><i>IL18</i></b>	Upregulated 1,048434793	Upregulated 1,038763344	Upregulated 1,049633033	Upregulated 1,045642472
<b><i>IL18BP</i></b>	Upregulated 1,000855136	Sem alteração 0,997800464	Sem alteração 0,998061921	Sem alteração 0,99960807

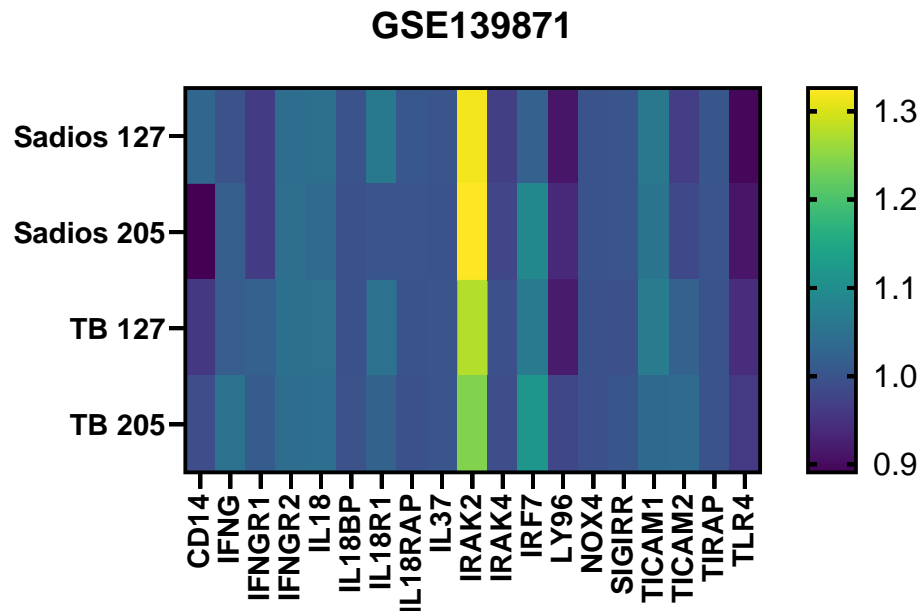
<b><i>IL18R1</i></b>	Upregulated 1,065053019	Upregulated 1,004303601	Upregulated 1,052657922	Upregulated 1,026668167
<b><i>IL18RAP</i></b>	Upregulated 1,007003859	Upregulated 1,005040641	Upregulated 1,000673799	Sem alteração 0,99730327
<b><i>IL37</i></b>	Upregulated 1,002208828	Upregulated 1,001688043	Upregulated 1,002417928	Upregulated 1,00471583
<b><i>IRAK2</i></b>	Upregulated 1,319119585	Upregulated 1,32604703	Upregulated 1,276984599	Upregulated 1,243662713
<b><i>IRAK4</i></b>	Sem alteração 0,970915273	Sem alteração 0,980852025	Sem alteração 0,995080093	Sem alteração 0,992539917
<b><i>IRF7</i></b>	Upregulated 1,022971133	Upregulated 1,093565328	Upregulated 1,066628949	Upregulated 1,11875447
<b><i>LY96</i></b>	Sem alteração 0,914621144	Sem alteração 0,939915315	Sem alteração 0,920831497	Sem alteração 0,981978729
<b><i>NOX4</i></b>	Upregulated 1,000215064	Upregulated 1,000445882	Sem alteração 0,99712269	Sem alteração 0,996168483
<b><i>SIGIRR</i></b>	Upregulated 1,003484989	Upregulated 1,003231224	Sem alteração 0,996039754	Upregulated 1,006825209
<b><i>TICAM1</i></b>	Upregulated 1,06381815	Upregulated 1,056628259	Upregulated 1,068748537	Upregulated 1,037420992
<b><i>TICAM2</i></b>	Sem alteração 0,968964667	Sem alteração 0,983961939	Upregulated 1,022408626	Upregulated 1,040092583
<b><i>TIRAP</i></b>	Upregulated 1,006695977	Upregulated 1,003279714	Upregulated 1,001366889	Upregulated 1,001124716

<b>TLR4</b>	Sem alteração 0,896565019	Sem alteração 0,913611226	Sem alteração 0,945190955	Sem alteração 0,961895619
-------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------

DEGs: do inglês, *differentially expressed genes* – genes diferencialmente expressos; FC: *fold change*; PBMC: monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis ou pacientes com tuberculose (TB); 127 e 205: cepas de *Mtb* utilizadas no estudo para infecção dos monócitos.

No contexto de infecção de monócitos com diferentes cepas de *Mtb* (127 e 205), *IRAK2* permanece super regulado (Figura 14), seguindo o que vem sendo exibido nos demais contextos de infecção mostrados até aqui. A expressão de *IFNG* não está alterada no grupo de monócitos de indivíduos saudáveis infectados pela cepa 127, mas apresenta regulação positiva nos demais grupos. *SIGIRR* não apresenta alteração em sua expressão no grupo de monócitos de pacientes com TB infectados pela cepa 127, mas apresenta regulação positiva nos demais grupos

O gene *IL18* aparece regulado positivamente nas infecções de monócitos em todas as condições apresentadas nesse conjunto de dados, enquanto que a expressão de *TLR4* não apresentou alteração.



**Figura 14. Heatmap com expressão da regulação dos genes em monócitos infectados por cepas de *Mtb*.** Mapa de calor dos 19 genes selecionados com expressão diferencial, no contexto da infecção de monócitos com diferentes cepas de *Mtb* (127 e 205). O padrão da expressão gênica mostra três agrupamentos não supervisionados, indicando um padrão de expressão divergente entre os diferentes grupos de tratamento: 1 - Monócitos padrão infectados com UT127; 2 - Monócitos padrão infectados com UT205; 3 - Monócitos de pacientes com TB infectados com UT127; 4 - Monócitos de pacientes com TB infectados com

UT205. Em tons de azul escuro os genes menos regulados ou sem alteração na expressão e em amarelo gene com maior expressão na regulação.

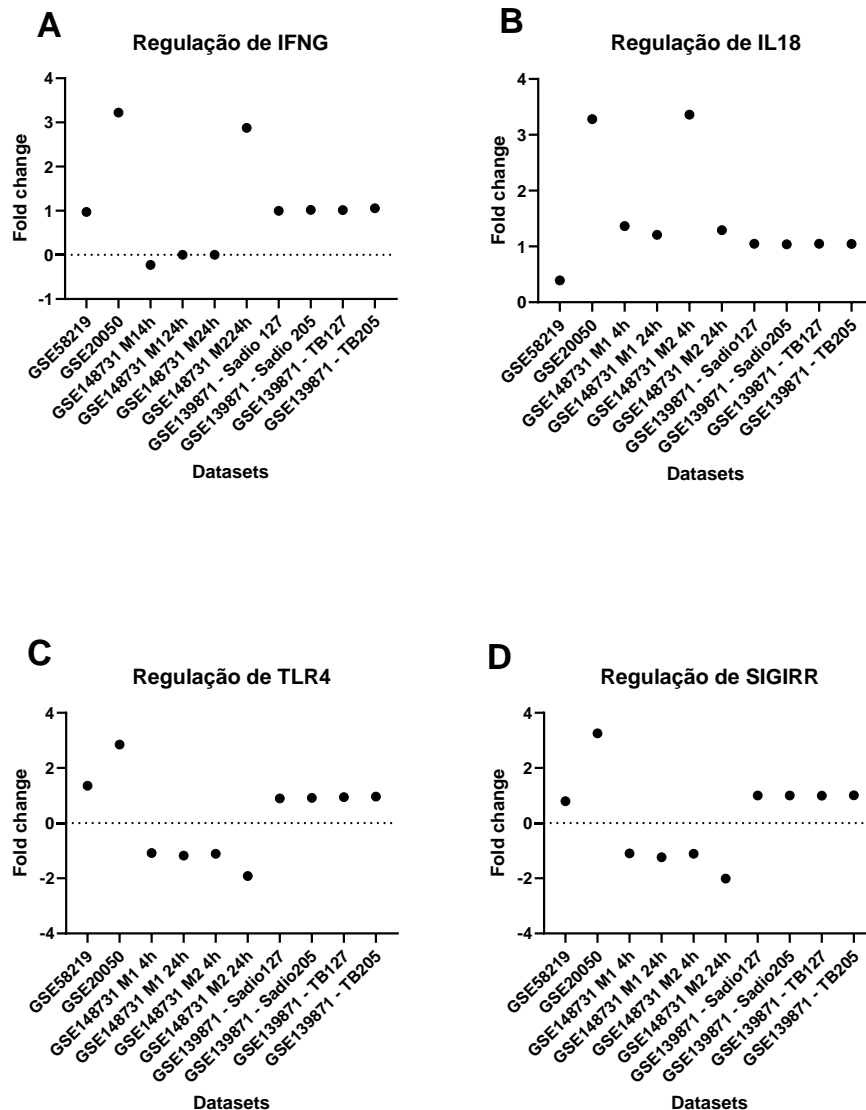
### **5.5 Expressão e regulação do core principal de genes-alvos – *TLR*, *IL18*, *IFNG* e *SIGIRR***

Dentre os genes alvos estabelecidos em nosso estudo, *IFNG* mostrou-se regulado positivamente nas condições de infecção em macrófagos de perfil M2 e regulado negativamente na condição de infecções M1 (Figura 15A). Para o gene *IL18*, houve regulação positiva em todos os casos de infecção por *Mtb*, excetuado o caso referido para o GSE58219, onde não houve alteração neste gene (Figura 15B).

A regulação de *SIGIRR* acompanhou o padrão estabelecido para a regulação do *TLR4* em quase todas as condições colocadas de infecção por *Mtb*. Com destaque para as condições de macrófagos infectados com fenótipos para M1 e M2, quando esses dois genes apresentaram regulação negativa (Figura 15 C e D). É importante ressaltar também que, ainda que discretamente, *SIGIRR* apresentou regulação positiva na avaliação de células do granuloma e de monócitos de indivíduos sadios infectados por cepas de *Mtb*, e *TLR4* apresentou regulação positiva na avaliação de macrófagos alveolares infectados com *Mtb* e na avaliação de células do granuloma.

Ainda, foi observado que todos os genes avaliados se apresentaram regulados positivamente na condição do granuloma na tuberculose (Figura 15).



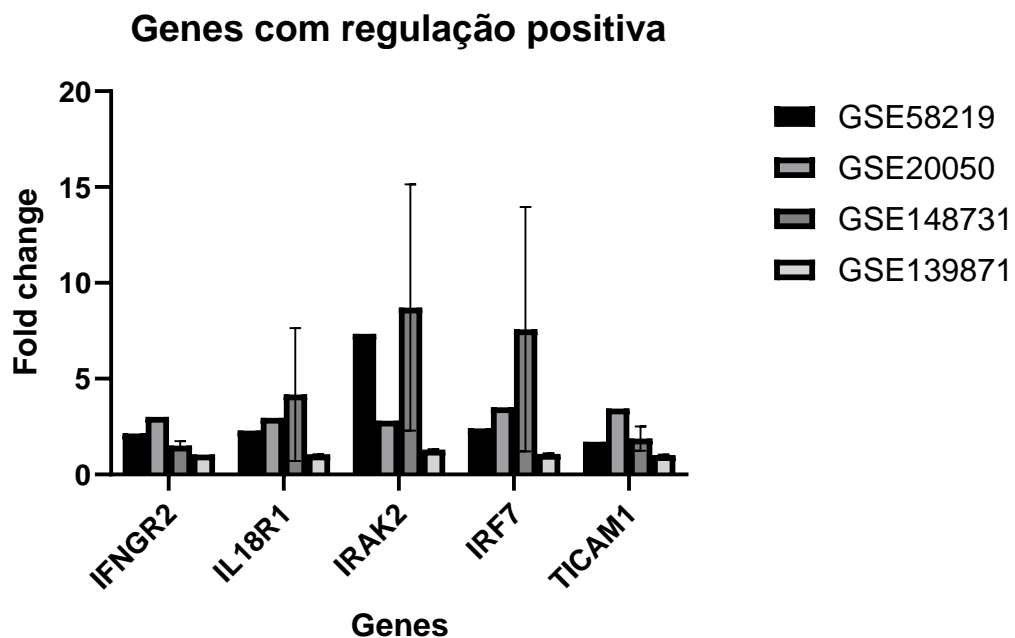


**Figura 15. Demonstração da regulação dos genes alvo por DataSet.** (A) Regulação IFNG; (B) regulação de IL18; (C) regulação de TLR4 e; (D) regulação de SIGIRR. DataSets. GSE52819 – macrófagos alveolares infectados com *Mtb* (cepa H37rv), GSE20050 – macrófagos contidos em granulomas de pacientes com TB, GSE148731 M1 4h – macrófagos de perfil M1 após 4h de infecção com *Mtb*, GSE148731 M1 24h – macrófagos de perfil M1 após 24h de infecção com *Mtb*, GSE148731 M2 4h – macrófagos de perfil M2 após 4h de infecção com *Mtb*, GSE148731 M2 24h – macrófagos de perfil M2 após 24h de infecção com *Mtb*, GSE139871 sadio 127 – monócitos de indivíduos sadios infectados com a cepa de *Mtb* 127, GSE139871 sadio 205 – monócitos de indivíduos sadios infectados com a cepa de *Mtb* 205, GSE139871 TB 127 – monócitos de pacientes com TB infectados com a cepa de *Mtb* 127e GSE139871 TB 205 – monócitos de pacientes com TB infectados com a cepa de *Mtb* 205. Foram usados pontos de corte estatísticos de  $\log_2\text{-fold-change} > 1$  (regulado para cima) ou  $< -1$  (regulado para baixo) e o valor de p ajustado  $< 0,05$  para selecionar genes regulados para cima e para baixo entre *Mtb* infecção e grupos normais

## 5.6 Regulação positiva de genes relacionados ao core principal de genes-alvos

Além dos genes alvos desse estudo, foi possível observar a regulação de outros genes. Na figura abaixo (Figura 16) estão dispostos os genes que se destacaram por apresentar regulação positiva em todas as condições de infecção por *Mtb* relatadas nos DataSets apontados neste trabalho. Sendo eles: *IFNGR2*, *IL18R1*, *IRAK2*, *IRF7* e *TICAM1*.

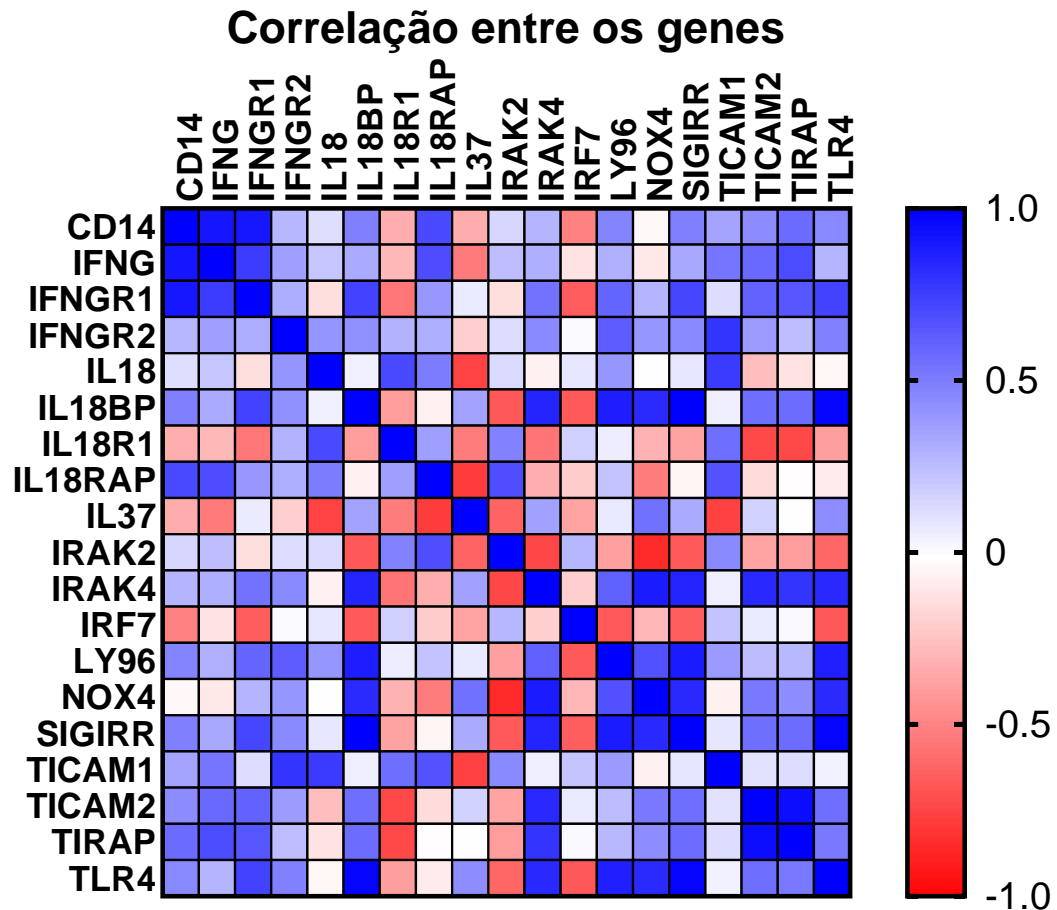
É importante ressaltar que, *IRAK2* e *IRF7* apresentam maiores valores de expressão quando comparados aos demais genes e os grupos. Evidenciando a importância destes genes no contexto da infecção pelo *Mtb*.



**Figura 16. Genes com regulação positiva em todos os DataSets.** Demonstrativo com a distribuição dos genes *IFNGR2*, *IL18R1*, *IRAK2*, *IRF7* e *TICAM1*, regulados positivamente em todos os DataSets. GSE58219 – macrófagos alveolares infectados com *Mtb* (cepa H37rv), GSE20050 – macrófagos contidos em granulomas de pacientes com TB, GSE148731 M1 4h – macrófagos de perfil M1 após 4h de infecção com *Mtb*, GSE148731 M1 24h – macrófagos de perfil M1 após 24h de infecção com *Mtb*, GSE148731 M2 4h – macrófagos de perfil M2 após 4h de infecção com *Mtb*, GSE148731 M2 24h – macrófagos de perfil M2 após 24h de infecção com *Mtb*, GSE139871 sadio 127 – monócitos de indivíduos sadios infectados com a cepa de *Mtb* 127, GSE139871 sadio 205 – monócitos de indivíduos sadios infectados com a cepa de *Mtb* 205, GSE139871 TB 127 – monócitos de pacientes com TB infectados com a cepa de *Mtb* 127 e GSE139871 TB 205 – monócitos de pacientes com TB infectados com a cepa de *Mtb* 205. Foram usados pontos de corte estatísticos de  $\log_2$ -fold-change > 1 (regulado para cima) ou < -1 (regulado para baixo) e o valor de p ajustado < 0,05 para selecionar genes regulados para cima e para baixo entre *Mtb* infecção e grupos normais.

## 5.7 SIGIRR apresenta correlação fortemente positiva com os genes das vias de reconhecimento e eliminação de *Mtb*

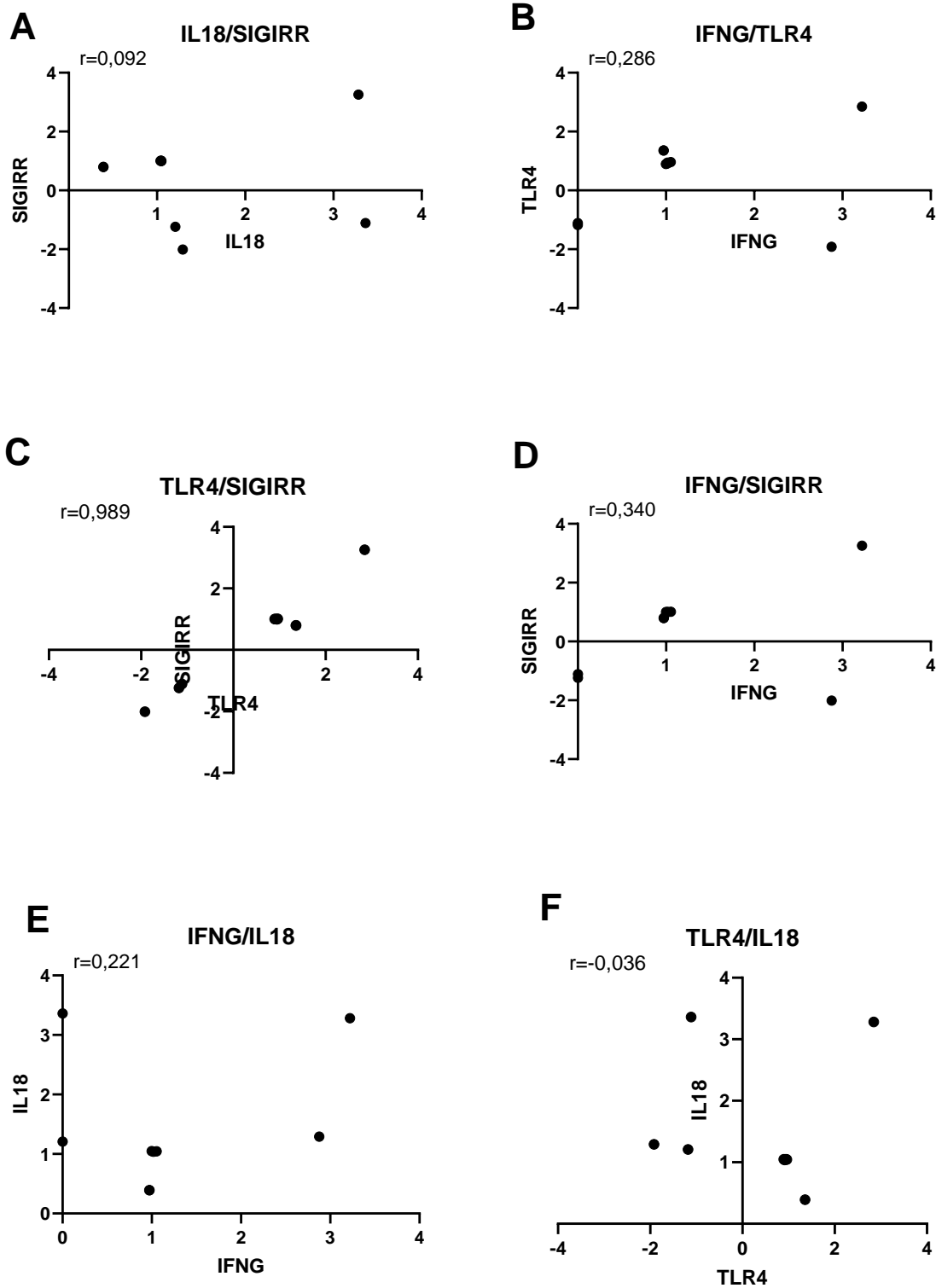
Após a avaliação da regulação dos genes fomos avaliar a correlação entre eles, foi possível observar que a maioria dos genes mostrou correlação, ainda que em pouca intensidade como mostrado no nosso mapa de calor (Figura 17).



**Figura 17. Correlações entre os 19 genes estudados.** Demonstrativo da correlação dos 19 genes por mapa de calor onde os quadros em azul escuro apresentam correlação mais forte e em vermelho, pouca correlação. Utilizado coeficiente de Pearson para a análise, considerando  $r=0$  correlação fraca,  $r=1$  correlação positiva forte e  $r=-1$  correlação negativa forte.

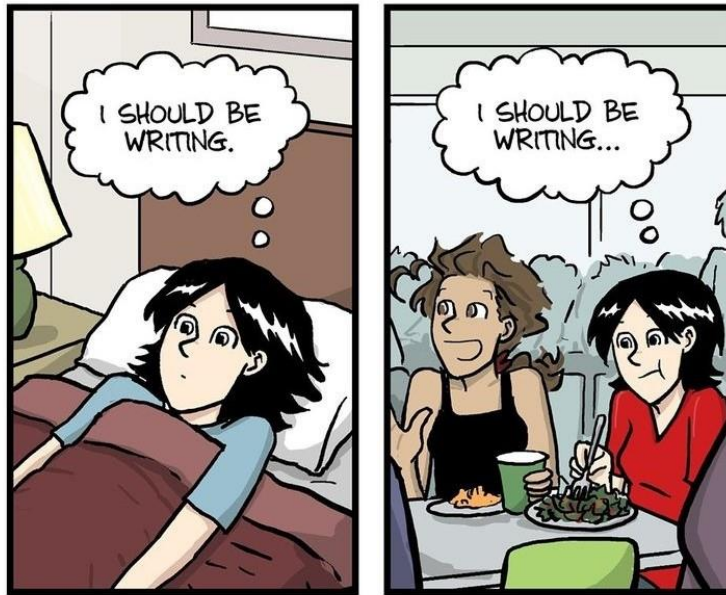
Especificamente falando dos genes alvo deste estudo, não foi possível observar correlação forte entre os genes *IL18/SIGIRR* e *TLR4/IL18* (Figura 18 A e F). Entre os genes *IFNG/TLR4*, *IFNG/SIGIRR* e *IFNG/IL18* a correlação existe, mas com coeficiente baixo (Figura 18 B, D e E). No entanto, nossos achados evidenciam forte correlação entre SIGIRR e os genes *TLR4*, *CD14*, *LY96*, *IRAK4*, *IL18BP*, *IFNGR1* e

*NOX4*, que mostraram padrão de expressão semelhante em todos os contextos de infecção por *Mtb*. (Figura 18 C).



**Figura 18. Correlações apresentadas para os genes alvo.** (A) correlação entre IL18 e SIGIRR; (B) correlação entre IFNG e TLR4; (C) correlação entre TLR4/SIGIRR; (D) correlação entre IFNG e SIGIRR; (E) correlação entre IFNG e IL18 e; (F) correlação entre TLR4 e IL18.

Utilizado coeficiente de Pearson para a análise, considerando  $r=0$  correlação fraca,  $r=1$  correlação positiva forte e  $r= -1$  correlação negativa forte.



This message brought to you by that manuscript you're supposed to be writing.

**DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Análises *in silico* de transcriptomas vêm se mostrando como metodologia importante e de grande relevância no meio científico. A transcriptômica tem se tornado na última década uma realidade para o estudo de diferentes situações biológicas, associadas ou não a patologias. Neste trabalho, aplicamos a referida metodologia para o estudo da tuberculose (TB), considerada uma das mais importantes doenças infectocontagiosas da história. A relevância dessa patologia, individual ou coletivamente, torna fundamental a análise de genes associados a resposta imune à infecção por *M. tuberculosis* (*Mtb*) para estabelecer novas possibilidades de diagnóstico, prognóstico e a tratamentos.

Sendo assim, utilizamos as informações contidas nas bases de dados públicas de expressão gênica para seleção de quatro DataSets com informações sobre a genes/proteínas importantes para resposta imune a *Mtb*, que se encaixaram em nossos critérios de inclusão e exclusão. A busca realizada foi delimitada no contexto da hipótese de que SIGIRR participa da via ativada por receptores semelhantes ao *Toll* para produção de interleucina 18. Dessa forma, a seleção dos genes alvos ficou inicialmente em torno da via da citocina IL18, com possível participação da proteína SIGIRR, no contexto da resposta ao *Mtb*. Os dados gerados permitem a definição de uma relação entre IL-18 e SIGIRR, além de elencar uma série de outras proteínas para estudos futuros de bioinformática, em modelos *in vitro*, experimentais e/ou clínicos.

Por serem proteínas reconhecidamente importantes para a eliminação de *Mtb* e resolução dessa infecção, os genes *TLR4*, *IFNG*, *IL18* e *SIGIRR* foram selecionados como parâmetros de entrada para análise nas plataformas STRING, Revelen e SIGNOR 3.0, resultando em três redes de interações proteicas, ao redor das quatro selecionadas, incluindo suas singularidades. O interactoma de genes/proteínas gerados no STRING foi mais extensa e diversificada, incluindo proteínas de vias correlatas à dos genes/proteínas de entrada. O interactoma do Revelen foi mais sucinto, incluindo genes/proteínas diretamente associados aos genes-alvo, sem vias secundárias. No entanto, o interactoma gerado pelo software online SIGNOR 3.0 não apresentou *SIGIRR* em sua análise. Dessa forma, esses dados não foram considerados para o presente estudo. Com a lista de

genes/proteínas dos interactomas foi elaborado um diagrama de Venn, salientando-se que tal ferramenta oferece uma melhor visualização do que é comum em dois conjuntos e o que é específico em cada um deles, ou seja, aquilo em que se deve focar em uma análise, direcionando o processo de mineração de dados.

Cada conjunto de dados possui dezenas de milhares de genes, todos analisados seguindo um mesmo protocolo e rigor metodológico, sendo possível considerar que diferentes genes em mesmas condições de análise estariam aptos a serem colocados em testes de hipóteses, assim como em testes de padrão de expressão pré e pós infecção. Essa grande quantidade de genes compilados, assim como em qualquer estudo que objetiva analisar determinada característica celular ou via de sinalização, passou por um processo de triagem, no qual apenas genes envolvidos em determinados contextos foram selecionados.

De porte dos dados apresentados em cada DataSet utilizamos a medida de taxa de expressão gênica usual que é dada em valor de expressão relativa, ou “*fold change*” (FC), que caracteriza a expressão gênica como positiva (aumento da expressão em determinado contexto) ou negativa (redução da expressão em situação específica). No entendimento comum do campo de estudo são denominados valores relativos positivos com o termo *upregulation* ou *upregulated* (UR), e os valores relativos negativos como o termo *downregulation* ou *downregulated* (DR). A avaliação funcional dos conjuntos gênicos e de sua variação no contexto da TB envolve o trabalho de complementar a anotação de suas expressões com informações funcionais. Para isso são utilizados bancos de dados complementares e ferramentas virtuais que possibilitam determinar quais grupos gênicos estão envolvidos na regulação e sinalização das vias moleculares estudadas (ALLISON et al, 2006; KITO et al, 2016).

Nos resultados obtidos, o gene *IL 18* aparece diferencialmente expresso em praticamente todos os contextos de infecções por *Mtb*, com exceção de macrófagos infectados pela cepa H37rv, onde não houve alteração de sua expressão. Nos demais contextos da infecção por *Mtb*, *IL 18* apresentou regulação positiva quando comparada aos grupos controle, sem exposição ao patógeno. A interleucina 18, uma das bases para nossa via proposta, é uma citocina da família da interleucina 1, com ação em diversas células, como linfócitos, macrófagos, mastócitos, basófilos,



células epiteliais e nervosas, entre outras. Sua produção, por sua vez, também é amplamente distribuída pelo corpo humano, sendo realizada por variadas células, como macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, e nos mais variados tecidos biológicos (TOMINAGA et al, 2000). Sua principal característica, que também desperta interesse para esse trabalho, é a capacidade de intensificar a ação do IFN- $\gamma$  nas células mieloides, maximizando sua atividade microbicida (XIA et al, 2021). Nossos achados mostram correlação, ainda que fraca, entre a expressão dos genes *IL18* e *IFNG*. Além disso, outros trabalhos já mostraram que a falta, ou produção irregular, de IL-18 acarreta em maior susceptibilidade a infecção por *Mtb*, seja através de estudos com camundongos knockout para IL-18 e IL-18R, seja por meio de estudos de polimorfismos no gene promotor de IL-18. (HASSUNA, 2022; YASUDA, 2019).

Os nossos achados corroboram com os achados de Wawrocki (2020), reiterando a atuação da IL-18 durante a infecção por *Mtb*. No entanto, para os macrófagos infectados *in vitro* com *Mtb* cepa H37rv, curiosamente, a expressão de IL-18 não sofreu alteração significativa em nenhuma das condições de análise. Este fato pode ser explicado por uma provável baixa sensibilidade do procedimento de análise do microarray empregado, já que é demonstrado por estudos anteriores que os níveis de IL-18 costumam ser elevados durante infecções por microrganismos que se alojam no meio intracelular (SCHNEIDER, 2010), ou ainda pela cepa utilizada, desenvolvida em laboratório, apresentar baixa virulência (RIBEIRO, 2015).

O SIGIRR, diferente do IL18, apresentou um padrão de expressão mais dissonante entre os DataSets, já que para os macrófagos infectados *in vitro* com *Mtb* H37rv, seus níveis não sofreram alteração, para avaliação de macrófagos do granuloma na tuberculose e infecção de monócitos com cepas 127 e 205 de *Mtb* houve regulação positiva, e para as condições de macrófagos polarizados para M1 e M2, a regulação foi negativa. Esses resultados, que poderiam ser percebidos inicialmente como um fator de equívoco, podem ser reavaliados através de questionamentos analíticos em relação à geração dos dados brutos. No primeiro estudo (VERWAY et al, 2013), assim como aconteceu com a IL-18, a baixa sensibilidade do método pode ter atrapalhado a contagem dos transcritos. Nos três trabalhos seguintes (SEIMON et al, 2010; VRIELING et al, 2020; LAVALETT et al, 2020), o aumento e a baixa da transcrição provavelmente esta relacionado aos

métodos e contextos de infecções, uma vez que se usou células do granuloma e linhagens de cepas de *Mtb* mais virulentas. Entre os 4 DataSets avaliados, a avaliação macrófagos de perfil M1 e M2 infectados com *Mtb* foi o único que mostrou genes pouco regulados.

O SIGIRR, acrônimo para *single Ig IL-1- related receptor* (receptor órfão de imunoglobulina dependente de interleucina 1, em português), ou TIR8, ou ainda IL1R8, faz parte de uma imensa família de receptores de interleucina 1 que desempenham os mais diversos papéis pelo corpo humano (QIN et al, 2005). O SIGIRR é expresso em uma infinidade de tecidos, a citar os pulmões, órgãos linfóides, fígado, trato digestivo e outros órgãos. Nos pulmões é expresso tanto em células epiteliais quanto na superfície dos leucócitos residentes daquela área. No âmbito da infecção pelo *Mtb*, camundongos deficientes em TIR/SIGIRR apresentaram significativo aumento da mortalidade em relação àqueles com expressão normal desse receptor (RIVA, 2012).

Além disso, SIGIRR atua regulando negativamente *toll-like receptor 4* (BAUMAN et al, 2015; LIU et al, 2017). No entanto, em nossos achados ficou evidente uma correlação significativa de SIGIRR com TLR4, sugerindo mecanismos de resposta diferentes dessas moléculas na infecção pelo *Mtb*. O DataSet GSE20050 apontou alteração acentuada na expressão de todos os genes avaliados, com exceção a IL37, gene que não apresentou alteração. Esse DataSet traz a avaliação de genes presentes em células que compõem o granuloma, estrutura complexa que evoluiu para permitir que o hospedeiro e o patógeno sobrevivam em um delicado equilíbrio de contensão, no qual a infecção não avança e a micobactéria não é eliminada (PRIDEAUX et al, 2015).

É importante enfatizar que o tecido estudado era de pacientes que se encontravam na fase característica como granuloma com necrose caseosa. Este fator traz uma série de mudanças em sua estrutura, os macrófagos podem sofrer transformações epitelióides, tornando-se espumosos preenchidos por lipídios ou fundir-se em células gigantes multinucleadas (VIA et al, 2008). Este núcleo central de macrófagos é acompanhado por neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos circunscritos por linfócitos T e B e tornando-se progressivamente um ambiente

hipóxico onde muitas células sofrem morte necrótica para formar um núcleo acelular denominado caseum (SIA & RENGARAJAN, 2019).

Assim, considera-se que, granulomas de TB podem variar em sua composição celular, níveis de oxigenação, meio inflamatório e carga bacteriana. Essa heterogeneidade pode existir entre e dentro do hospedeiro infectado. Tais variações ocorridas na estrutura do granuloma poderiam justificar a alteração acentuada na expressão dos genes identificada no GSE20050, quando comparados aos demais DataSets (SIA & RENGARAJAN, 2019).

O DataSet GSE139871, forneceu dados de monócitos de pacientes saudáveis e de pacientes com TB, infectados *in vitro* a duas cepas diferentes de *Mtb*. As cepas utilizadas, UT127 e UT205, apresentam virulências diferentes. A infecção de monócitos humanos com UT205 induz uma quantidade mais significativa de necrose, maior proporção de dano de membrana celular e menor produção de citocinas, como por exemplo TNF $\alpha$ , quando comparada a cepa UT127, sugerindo diferenças na virulência entre esses dois isolados (DUQUE et al, 2014).

Baena et al 2019, compararam a resposta transcricional em ambos os isolados clínicos (UT205 e UT127) e os resultados mostraram que o isolado UT205 foca principalmente na ativação do sistema de virulência como ESX-1, enquanto UT127 concentra seus esforços principalmente no modo de sobrevivência pela ativação da replicação do DNA, divisão celular e biossíntese de lipídios.

Nossos resultados mostram que, praticamente todos os genes definidos para o nosso estudo se apresentam super regulados no DataSet GSE139871, porém apresentam pouca diferença quando comparados entre si, não evidenciando diferenças significativas entre as diferentes condições de infecção e de cepas utilizada. Os estudos discutidos acima indicam que a diversidade genética dentro do *Mtb* pode influenciar a resposta do hospedeiro à infecção e durante a doença da tuberculose. No entanto, o uso de sistemas *in vitro* (modelo experimental utilizado no GSE139871) pode tornar difícil avaliar se a variação imunológica associada à diversidade genética do *Mtb* impacta consideravelmente o resultado clínico ou se as abordagens de controle da TB devem ser adaptadas de acordo com a cepa *Mtb* infectante (TIENTCHEU et al, 2017).

Em relação aos demais genes, tiveram destaque no nível de expressão o

IRAK2 e o IRF7. O IRAK2, ou quinase tipo 2 associada ao receptor 1 de interleucina 1 (sigla em inglês), é um fator de transcrição diretamente relacionado ao receptor de IL-1, presente também nos receptores toll-like (e.g TLR 2 e 7). Esse fator de transcrição ganha destaque na indução de uma resposta celular pró-inflamatória e na produção de citocinas, auxiliando o sistema imune no combate a infecções. No contexto da tuberculose, e de encontro com o que foi encontrado neste trabalho, os níveis de transcrição estavam aumentados porque os receptores onde o IRAK2 está acoplado são o TLR 2 e TLR 7, ambos localizados em áreas estratégicas. O TLR2 é sensível à presença de lipopolissacarídeos e peptídeoglicanos, componentes característicos de bactérias, já o TLR7, por sua vez, é encontrado no compartimento lisossomal, exatamente onde os microorganismos invasores, incluindo a *Mtb* se encontram. Portanto, o aumento expressivo na expressão do IRAK2 pode ter uma relação com sua função biológica e a infecção pelo bacilo da tuberculose, conhecido por se alojar no ambiente intracelular dos macrófagos (WAN, 2011; MAYER-BARBER, 2015).

O IRF7, ou fator regulador de interferon 7, é um fator de transcrição responsável por iniciar a produção de interferons do tipo I, foi outro gene com aumento no padrão de regulação, que, apesar de não ser o tipo de interferon padrão no combate ao *Mtb*, tem grande valor no combate ao bacilo (PANE et al, 2007; ZHANG et al, 2020). O bacilo *Mtb* busca o interior das células para se alojar e se evadir do sistema imunológico, sendo assim, o padrão de produção de citocinas costuma ter muita similaridade nestes dois contextos, onde interferons do tipo I e do tipo II agem em conjunto na erradicação de patógenos que fazem das células seus hospedeiros (HOFFPAUIR, 2020; MACHADO, 2005).

Para análises realizadas em macrófagos fenotipados em perfil M1 e M2 infectados com *Mtb*, ficou evidente a uma correspondência negativa de *IRAK2* e *IRF7* com *SIGIRR*, esta apresentando regulação negativa e aquelas regulação positiva. No entanto, não há evidências descritas entre a ação destas moléculas demonstrando como uma pode estar interferindo na outra.

Diante do que vem sendo exibido neste trabalho, observa-se que a correlação de *SIGIRR* com *TLR4* pode trazer uma compensação em alguns contextos da resposta imune ao *Mtb*. Além disso, a regulação de *TLR4* pode ser

entendida, ainda, como importante para manter a produção de IL18 num contexto menos inflamatório, o que apresenta um efeito benéfico, já que a resposta inflamatória exacerbada pode trazer efeitos deletérios ao organismo humano.

Dessa forma, nossa ideia inicial da participação direta de SIGIRR na indução da produção de IL18 não se comprovou. No entanto, SIGIRR apresentou correlações fortemente positivas com TLR4 e proteínas acessórias de sua via de ativação, como CD14, LY96 e IRAK4, comprovando sua significância no reconhecimento do patógeno. Mais importante, SIGIRR apresentou correlação fortemente positiva com IL18BP, IFNGR1 e NOX4. Isto demonstra o potencial de SIGIRR em regular negativamente a ação de IL18, mantendo a resposta imune dependente de IFNG pelo aumento da expressão de IFNGR1. Por fim, SIGIRR aumenta a expressão de NOX4, o que potencializa a atividade microbicida. Dessa forma, SIGIRR apresenta potencial de aumento da fagocitose e atividade microbicida, sem um processo inflamatório exacerbado deletério na resposta a *Mtb*.

Os genes diferencialmente expressos analisados provam a grande utilidade das bases de dados de transcriptômica, tendo em vista a possibilidade de testar hipóteses e expandir os conhecimentos sobre as vias de sinalização imunológica, isso tudo sem nem mesmo precisar realizar experimentos de bancada. Essa economia de tempo e material pode ser utilizada como elemento-chave para o desenvolvimento de avaliações experimentais e clínicas, levando em conta não ser necessário grandes incentivos financeiros, nem extensas áreas físicas para implementação de um laboratório focado em análises *in silico*. Outro ponto que merece destaque é a praticidade de trabalhar com dados que, embora necessitem ser normalizados e ajustados, possibilitam uma reutilização constante de conjuntos de dados quando abordados em novos contextos e novas perspectivas e abre-se espaço para novas discussões e possíveis descobertas importantes no âmbito científico.

# SUMMER

WHAT MOST PEOPLE THINK  
ACADEMICS DO ALL SUMMER:



YAY!  
NO WORK!

JORGE CHAM © 2018

[WWW.PHDCOMICS.COM](http://WWW.PHDCOMICS.COM)

WHAT MOST ACADEMICS  
ACTUALLY DO:



YAY! I CAN  
FINALLY WORK!

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nos trazem indicativos de novas moléculas e vias que necessitam ser exploradas quanto aos fatores internos da patologia da tuberculose e sua conseqüente prevalência em diversas populações no mundo. No entanto, não confirmamos nossa hipótese inicial da participação de *SIGIRR* induzindo IL18 na resposta imune a *Mycobacterium tuberculosis*.

Mesmo com a hipótese nula, neste estudo foi possível realizar análises em diferentes contextos de infecção por *Mtb*, o que proporciona confiabilidade nos dados. Isto permitiu definir, pela análise de banco de dados públicos, um conjunto de genes relevantes para a resposta imune a tuberculose, que ultrapassou nossa via de interesse inicial (*TLR/SIGIRR/IL18*).

Dessa forma, o presente trabalho estabeleceu evidências das alterações na expressão gênica da resposta imune associada à infecção por *Mtb*. A análise de moléculas não descritas classicamente na tuberculose, como o próprio *SIGIRR* e *IL18BP*, bem como o pareamento de novos conjuntos de marcadores, permitiu prospectar vias acessórias de sinalização de resposta imune que devem ser consideradas nesta patologia.

Por suas relações com os genes das vias de reconhecimento (e.g. *TLR4*, *CD14*, *IRAK4*), de atividade microbicida (e.g. *NOX4*) e de regulação (e.g. *IL18BP* e *IFNGR1*), foi confirmado o potencial de *SIGIRR* na modulação da fagocitose e atividade microbicida, sem induzir um processo inflamatório deletério na resposta a *Mtb*. Ainda, este trabalho demonstra a importância da utilização de avançadas ferramentas de bioinformática para tratar uma vasta quantidade de dados, sem altos investimentos em infraestrutura e materiais, gerando informações expressivas para uso futuro destas moléculas como marcadores diagnósticos e prognósticos da tuberculose, além da possibilidade de intervenções na resposta imune nesta doença.

## REFERÊNCIAS

ALLISON, D. B, CUI X, PAGE, G. P, SABRIPOUR, M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. **Nat Rev Genet.** V.7(1); p:55-65, 2006. Arq Asma Alerg Imunol – Vol. 6, Nº 2, 2022. <http://dx.doi.org/10.5935/2526-5393.20220024>

ALVES, A. C. F. P. B.; PRADO, AI. I. F.; TAQUENAMI, I. Tuberculosis immunology: a narrative literature review BARRETT, T. et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics DataSets—update. *Nucleic Acids Res.* 41, 991–995, 2012.

Anton C, Machado FD, Ramirez JM, Bernardi RM, Palominos PE, Brenol CV, et al. Infecção latente por tuberculose em pacientes com doenças reumatológicas. **J Bras Pneumol.** 2019;45(2):e20190023.

BOISSON-DUPUIS, S.; BUSTAMANTE, J.; EL-BAGHDADI, J.; CAMCIOGLU, Y.; PARVANEH, N.; AZBAOUI, S. E.; AGADER, A.; HASSANI, A.; EL HAFIDI, N.; MRANI, N. A.; JOUHADI, Z.; AILAL, F.; NAJIB, A.; REISLI, I.; ZAMANI, A.; YOSUNKAYA, S.; GULLE-GIRIT, S.; YILDIRAN, A.; CIPE, F. E.; TORUN, S. H.; METIN, A.; ATIKAN, B. Y.; HATIPOGLU, N.; AYDOGMUS, C.; KILIC, S. S.; DOGU, F.; KARACA, N.; AKSU, G.; KUTUKCULER, N.; KESER-EMIROGLU, M.; SOMER, A.; TANIR, G.; AYTEKIN, C.; ADIMI, P.; MAHDAVIANI, S. A.; MAMISHI, S.; BOUSFIHA, A.; SANAL, O.; MANSOURI, D.; JEAN-LAURENT CASANOVA; ABEL, C. Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunological Reviews*; v. 264, p. 103 – 120, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2 ed. 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Número Especial, 2022.



De MARTINO, M. et al. Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. **Frontier in pediatrics**. 2019. Doi 10.3389/fped.2019.00350

DUQUE C., ARROYO L., ORTEGA H., MONTUFAR F., ORTIZ B., ROJAS M., ET AL. Different responses of human mononuclear phagocyte populations to Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. v94, p:111–122, 2014. 10.1016/j.tube.2013.11.001

ETNA, M. P.; GIACOMINI, E.; SEVERA, M.; COCCIA, E. M. Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in Immunology*, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 543-551, 2014.

GEORGE, P. J.; KUMAR, N. P.; JAGANATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; NAIR, D.; BANUREKHA, V. V.; SHEN, K.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. Modulation of pro-and anti-inflammatory cytokines in active and latent tuberculosis by coexistent *Strongyloides stercoralis* infection. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 95, n. 6, p. 822-828, 2015.

GÓES, A. C. S. & OLIVEIRA, B. V. X. The Human Genome Project: a portrait of scientific knowledge construction by the *Ciência Hoje* magazine. *Ciênc. educ. (Bauru)* V. 20 (3), 2014. <https://doi.org/10.1590/1516-73132014000300004>

GUREVITCH, J.; KORICHEVA, J.; NAKAGAWA, S.; STEWART, G. Meta-analysis and the science of research synthesis, *Nature*, v. 55, p. 175-182, 2018.

HASSUNA, Noha A et al. Interleukin-18 and interferon- $\gamma$  single nucleotide polymorphisms in Egyptian patients with tuberculosis. *PLoS One*, v. 16, n. 1, jan. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7790531/>.

HOSSAIN, M. M.; NORAZMI, M. N. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection – the double-edge sword? *BioMed Research International*, New York, 2013, 2013.

HOFFPAUIR, Caitlyn T. et al. TRIM14 is a key regulator of the type I IFN response during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*, v. 205, n. 1, p.(153-167), maio 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7313415/>.

JAMWAL SV, MEHROTRA P, SINGH A, SIDDIQUI Z, BASU A, RAO KVS. Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. **Sci Rep.**6:23089, 2016. doi: 10.1038/srep23089

KASSA, D.; DE JAGER, W.; GEBREMICHAEL, G.; ALEMAYEHU, Y.; RAN, L.; FRANSEN, J.; WOLDAY, D.; MESSELE, T.; TEGBARU, B.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN BAARLE, D. The effect of HIV coinfection, HAART and TB treatment on cytokine/chemokine responses to Mycobacterium tuberculosis (Mtb) antigens in active TB patients and latently Mtb infected individuals. *Tuberculosis, Edinburgh*, v. 96, p. 131-140, 2016.

KATO. Z, et al. The structure and binding mode of interleukin-18. *Nature Structural & Molecular Biology*. V 10, pages966–971, 2003.

KAUFMANN, S. H. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol*. V. 26(12), P:660-7, 2005.

KIDO, K., ATO, S., YOKOKAWA, T., MAKANAE, Y., SATO, K., FUJITA, S. Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation. *Physiol Rep*. V.4(16).pii: e12907.

LAI, R. P.; NAKIWALA, J. K.; MEINTJES, G.; WILKINSON, R. J. The immunopathogenesis of the HIV tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome. *European Journal of Immunology, Weinheim*, v. 43, n. 8, p. 1995-2002, 2013.

TIENTCHEU, L. D.; KOCH, A.; NDENGANE, M.; ANDOSEH, G.; KAMPMANN, B.; WILKINSON, R. J. Immunological consequences of strain variation within the Mycobacterium tuberculosis complex *Eur. J. Immunol*. v: 47; p: 432–445, 2017. DOI: 10.1002/eji.201646562

LIU, C. G., LIN, C., HU, H., LIU, H., CHIU, Y., LEE, S., WU, L. S. The association of inflammasome and TLR2 gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis in the Han Taiwanese population. **Scientific Reports** 10:10184, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67299-6>

LIVAK, K. J, SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Method* , v.25, p 402–408, 2001.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Rev Med Minas Gerais*; V.21(1), P: 42-48, 2011.

MACEDO, L. R. Tuberculose em populações vulneráveis: fatores associados ao adoecimento e ao desfecho do tratamento. Fundação Oswaldo Cruz Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. Biblioteca de Saúde Pública, 2018.

MACEDO JUNIOR et al. Perfil epidemiológico da tuberculose no Brasil, com base nos dados provenientes do DataSUS nos anos de 2021. *Research, Society and development*, v 11, n 6, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.28999>

MACHADO, Paulo R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 6, p.(647-662), mar. 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/3VZ9Fz6BH9HDGnPhkN3Ktbd/#>.

MADKAIKAR, M., ITALIA, K., GUPTA, M., CHAVAN, S., MISHRA, A., RAO, M., et al. Molecular characterization of leukocyte adhesion deficiency-I in Indian patients: identification of 9 novel mutations. *Blood Cells Mol*, 54(3):217-23, 2015.

MAYER-BARBER, Katrin D.; BARBER, Daniel L. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cold Spring Harbor Perspective Medicine*, v.5, jul. 2015. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/12/a018424.full.pdf+html>

MILLER, M. B. & TANG, Y. W. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *ASM Journals Clinical Microbiology Reviews* Vol. 22, No. 4, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-09>

PAI, R. K., PENNINI, M. E., TOBIAN, A. R., CANADAY, D. H., BOOM, W. H., HARDING, C. V. Prolonged toll-like receptor signaling by Mycobacterium tuberculosis and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of

selected genes in macrophages. **Infect Immun.** 72:6603–14, 2016. DOI: 10.1128/IAI.72.11.6603-6614.2004

PICARD, C., AL-HERZ, W., BOUSFIHA, A., CASANOVA, JL., CHATILA, T., CONLEY, M.E. et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*;35(8):696-726, 2015.

RIBEIRO, S. C. M. Caracterização de virulência e caráter da resposta imune induzida por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* da família genética beijing: sublinhagens ancestral e moderna. 2015. 76 f. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF, Rio de Janeiro, 2015.

RIVA, Frederica et al. TIR8/SIGIRR is an interleukin-1 receptor/toll like receptor family member with regulatory functions in inflammation and immunity. **Front. Immunol**, v. 3, n. 322, out. 2012.

ROCHA, A. F. M.; ELIAS, C. D.; GOMES, C. A.; WERNECK, L. D.; BROWN, E.; ZANIER, J. F. Forma de apresentação atípica de tuberculose pulmonar. Relato de Caso: Tuberculose pulmonar atípica. **Pulmão RJ**; v.18(3) p:158-160, 2009.

RUSSO, P. S. T. et al. CEMiTool: A Bioconductor package for performing comprehensive modular coexpression analyses. **BMC Bioinform**, v.19, 56, 2018.

SCHNEIDER, B. E.; KORBEL, D.; HAGENS, K.; KOCH, M.; RAUPACH, B.; ENDERS, J.; KAUFMANN, S. H.; MITTRÜCKER, W.; SCHAIBLE, U. E. A role for IL-18 in protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur. J. Immunol.** V.40, p. 396–405, 2010.

SCHURZ H, DAYA M, MÖLLER M, HOAL EG, SALIE M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE** 2015; 10 (10): e0139711. doi: 10.1371/journal.pone.0139711.

SEIMON, T. A.; KIM, M.; BLUMENTAL, A. et al. Induction of ER stress in macrophages of tuberculosis granulomas. *Plos-one.* 5(9):e12772. doi: 10.1371/journal.pone.0012772.

SIMON, A. K, HOLLANDER, G. A, MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci.* 22;282(1821):20143085, 2015.

QIN. J.; QIAN, Y; YAO, J. GRACE, C. LI, X. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J Biol Chem.* 280(26):25233-41. doi: 10.1074/jbc.M501363200.

LAVALETT, L.; ORTEGA, H.; BARRERA, L. F. Infection of Monocytes From Tuberculosis Patients With Two Virulent Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Induces Alterations in Myeloid Effector Functions. *Front cell infect microbiol.*10:163. doi: 10.3389/fcimb.2020.00163

THADA, S., VALLURI, V. L., GADDAM, S. L. Influence of Toll-Like Receptor Gene Polymorphisms to Tuberculosis Susceptibility in Humans. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2013, 78, 221–229. doi: 10.1111/sji.12066

TIAN F, et al. Negative effects of SIGIRR on TRAF6 ubiquitination in acute lung injury in vitro. *J Immunol Res.* 2020.

TIAN F, et al. Regulation of CD18 stability by SIGIRR modulated ubiquitination: new insights into the relationship between innate immune response and acute lung injury. *The FEBS Journal.* V 290; p: 2721-2743, 2022.

VAN GRIENSVEN, J., MOHAMMED, R., RITMEIJER, K., DIRO, S. B. E. Tuberculosis in Visceral Leishmaniasis-HIV Coinfection – an Evidence Gap in Improving Patient Outcomes? *Open Forum Infectious Diseases.* Accepted manuscript, v 5 p 1-4. 2018.

VERWAY, M.; BOUTTIER, M.; WANG, T. et al. Vitamin D induces interleukin-1 $\beta$  expression: paracrine macrophage epithelial signaling controls *M. tuberculosis* infection. *Plos Pthogens.* 9(6):e1003407. doi: 10.1371/journal.ppat.1003407.

VRIELING, F.; KOSTIDIS, S.; SPAINK, H. P. et al. Analyzing the impact of *Mycobacterium tuberculosis* infection on primary human macrophages by combined exploratory and targeted metabolomics. *Scientific reports.* 10(1):7085. doi: 10.1038/s41598-020-62911-1

WAN, Youzhong et al. The dual functions of IRAK2 in TLR9-mediated interferon and proinflammatory cytokine production. *J Immunol*, v. 186, n. 5, p.(3006-3014), mar. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163905/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2017. Disponível em: < [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en)>. Acesso em: 20 mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The Stop TB Strategy: bulding on and enchancing DOTS to meet the TB-related Millennium Developmet Goals. Geneva, 2006.

WHO. World health organization. **Global Tuberculosis Report**. 2021.

WU, J.; WANG, S.; LU, C.; SHAO, L.; GAO, Y.; ZHOU, Z.; HUANG, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, W. Multiple cytokine responses in discriminating between active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 102, p. 68-75, 2017.

YATIM, K. M, LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*;10(7):1274-8, 2015.

MCHENRY, M. L.; BARTLETT, J.; IGO, R. P.; WAMPANDEI, E. M.; BENCHEKI,P.; MAYANJA-KIZZA, H.; FLUEGGE, K.; HALL, N.B.; GAGNEUXI, S. TISHKOFF , S. A.; WEJSEI, C.; SIRUGOI, G.; BOOM, W. H.; JOLOBA, M.; WILLIAMSI,S. M.; STEINI, C. M. Interaction between host genes and Mycobacterium tuberculosis lineage can affect tuberculosis severity: Evidence for coevolution? *PLOS Genetics* | <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008728> April 30, 2020.

DE VRIES, D. H. et al. Integrating GWAS with bulk and single-cell RNA-sequencing reveals a role for LY86 in the anti-Candida host response. *PLOS Pathog*. V.16, e1008408, 2020.

STUART, T. et al. Comprehensive integration of single-cell data. *Cell*. V.177, 1888-1902, 2019.

TOMINAGA, K et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int. Immunology*. V 12, p 151-160, 2000)

TSUTSUMI, N et al. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nature Communications* V 5, Article number: 5340, 2014.

ZHOU, G. et al. Network Analyst 30: A visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res.* V. 47, 234–241, 2019.

LAW, C. W., Chen, Y., Shi, W. & Smyth, G. K. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* V.15, R29, 2014.

KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* V.44, W90–W97, 2016.

KHAN, A. & MATHELIER, A. Intervene: A tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. *BMC Bioinform.* V.18, 287, 2017.

WALD, D. et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* V. 4(9):920-7, 2003. doi: 10.1038/ni968.

WALTER, W., SÁNCHEZ-CABO, F. & RICOTE, M. GOplot: An R package for visually combining expression data with functional analysis: Fig. 1. *Bioinformatics*, v. 31, 2912–2914 2015.

WAWROCKI, Sebastian et al a. Interleukin-18, Functional IL-18 Receptor and IL-18 Binding Protein Expression in Active and Latent Tuberculosis. *Pathogens*, v. 9, n. 6, jun. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7350328/>.

WAWROCKI, Sebastian et al b. IL-18 and related function proteins associated with tuberculosis severity and screening for active TB among patients with non-mycobacterial community-acquired pneumonia (CAP). *Saudi J Biol Sci.* V 27(11); P: 3035–3045, 2020

WICKHAM, H. Getting Started with ggplot2. in 11–31, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_2).

JENDOUBI, T. & STRIMMER, K. A whitening approach to probabilistic canonical correlation analysis for omics data integration. *BMC Bioinformatics*, v. 20, 15, 2019.

DE VITO, R., BELLIO, R., TRIPPA, L. & PARMIGIANI, G. Bayesian Multistudy Factor Analysis for High-throughput Biological Data, 2018.

YASUDA, Koubun; NAKANISHI, Kenji; TSUTSUI, Hiroko. Interleukin-18 in health and disease. *Int J Mol Sci.* v. 20, n. 3, p(), fev. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6387150/>.

YU, G., WANG, L. G., HAN, Y. & HE, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.*, v.16, 284–287, 2012.

DE VITO, R., BELLIO, R., TRIPPA, L. & PARMIGIANI, G. Multi-study factor analysis. *Biometrics*, v.75, 337–346, 2019.

PANNE, D.; MANIATIS, T.; HARRISON, S. C. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell.* 129(6):1111-23. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.019.

PRIDEAUX B, VIA LE, ZIMMERMAN MD, EUM S, SARATHY J, O'BRIEN P, CHEN C, KAYA F, WEINER DM, CHEN PY, SONG T, LEE M, SHIM TS, CHO JS, KIM W, CHO SN, OLIVIER KN, BARRY CE 3rd, Dartois V. 2015. A associação entre atividade esterilizante e distribuição de drogas em lesões de tuberculose. *Nat Med* 21 :1223–1227

VIA LE, LIN PL, RAY SM, CARRILLO J, ALLEN SS, EUM SY, TAYLOR K, KLEIN E, MANJUNATHA U, GONZALES J, LEE EG, PARK SK, RALEIGH JA, CHO SN, MCMURRAY DN, FLYNN JL, BARRY CE 3º. 2008. Granulomas tuberculosos são hipóxicos em cobaias, coelhos e primatas não humanos . *Infect Immun* 76 :2333–2340.

SIA, J. K. & RENGARAJAN, J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis infections. *Microbiol Spectr.* v. 7(4), 2019. doi:10.1128/microbiolspec

FERLUGA, J, HADIDA, Y, MOHAMMED N. A., SANJIB, B., UDAY, K. Natural and trained innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Elsevier Immunobiology.* v.225,3, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151951>



XIA, S; ZHANG, Z; MAGUPALLI, V. G., et al. Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1. *Nature*. V.93(7860); p: 607-611, 2021. doi: 10.1038/s41586-021-03478-3

ZHANG, Q; BASTARD, P.; LIU, Z. et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. V. 370, 2020 doi: 10.1126/science.abd4570.

