

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema

**Investigação do papel de hormônios esteróides [Vitamina D3 e 17 β -Estradiol]
na Tuberculose**

Recife

2022

Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema

**Investigação do papel de hormônios esteróides [Vitamina D3 e 17 β -Estradiol]
na Tuberculose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jaqueline de Azevêdo Silva

Coorientadora: Dr.^a Michelle Christiane da Silva Rabello

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Na scimento, CRB4/1743

Borborema, Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque
Investigação do papel de hormônios esteróides [Vitamina D3 e 17 β -Estradiol] na
tuberculose/Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema. – 2022.

146 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva.
Coorientadora: Michelle Cristiane da Silva Rabello.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.
Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2022.
Inclui referências.

1. 1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Hormônios esteróides 3. Receptores de
reconhecimento de padrões. 4. Resposta imune. I. Silva, Jaqueline de Azevêdo
(orient.). II. Rabello, Michelle Cristiane da Silva. (coorient). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-008

Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema

**Investigação do papel de hormônios esteróides [Vitamina D3 e 17 β -Estradiol]
na Tuberculose**

Aprovado em 25/08/2022

Banca Examinadora:

Dr.^a Michelle Christiane da Silva Rabello
Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dr.^a Isabelle Freire Tabosa Viana
Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão
Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Virginia Maria Barros de Lorena
Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dr.^a Suelen Cristina de Lima
**Departamento de Virologia, Instituto Aggeu
Magalhães – FIOCRUZ/PE**

**Recife
2022**

Dedico esta tese a todos os colegas cientistas.

AGRADECIMENTOS

Fazer ciência no Brasil é uma jornada árdua, longa e por vezes, solitária. O doutorado foi um momento de intenso aprendizado e amadurecimento, uma fase de superação na qual precisei enfrentar inúmeros desafios, mas acreditar em mim e contar com a confiança de pessoas muito importantes nessa trajetória, foi fundamental pra sua execução.

Agradeço aos meus pais que são meu alicerce e ao meu grande amor, Eduardo, que foram durante esses anos minha força.

Agradeço à minha orientadora, Jaqueline, exemplo de profissional e a quem sou tão grata pela confiança, dedicação e parceria de tantos anos. À minha coorientadora Michelle, agradeço pela dedicação, por me auxiliar nos meus experimentos e principalmente pela confiança em meu trabalho.

Várias pessoas contribuíram para a execução desta tese, direta ou indiretamente. Desde as pessoas que literalmente doaram o sangue pela ciência, até os colegas de profissão que compartilharam protocolos, trocaram experiências, emprestaram reagentes e compartilharam momentos de distração. Deixo aqui registrado o meu agradecimento. Em especial agradeço a Thays pela parceria de sempre, por todos os RNAs extraídos, análises estatísticas feitas e pelo apoio nos longos telefonemas.

Não posso deixar de agradecer a instituição a qual faço parte desde a graduação, a Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Agradeço também ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA e ao Instituto Aggeu Magalhães (Fundação Oswaldo Cruz/PE) pela estrutura cedida para realização dos meus experimentos.

Agradeço ainda a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa a mim concedida.

Por fim, gostaria também de dedicar esta tese a meus amados sobrinhos e afilhados Heitor, Rhuan, João, Isabela e Ohana. Que o meu exemplo de amor à ciência e à educação lhes sirva de inspiração.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates

RESUMO

O papel dos hormônios esteróides na modulação da resposta imune em doenças infecciosas tem sido amplamente estudado, principalmente na tuberculose (TB). Por meio de mecanismos que inibem diretamente o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ou por ação imunomoduladora, os hormônios vitamina D3 (VD3) e 17 β -estradiol (E2) são moléculas que podem atuar como adjuvantes terapêuticos no tratamento da TB. O objetivo deste trabalho foi avaliar como a vitamina D3 (VD3) e o 17 β -estradiol (E2) podem influenciar na resposta contra o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Para isso verificamos a associação entre polimorfismos do *VDR*, *TLR4* e *MYD88* e a susceptibilidade à TB, e verificamos os níveis de expressão do *VDR*, *NLRP1*, e *NLRC4* em pacientes com TB. Além disso, verificamos se a VD₃ e o E₂ alteram o perfil de expressão gênica do *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3*, *DC-SIGN*, *IL-10* e *IL-1 β* em cultura de PBMCs infectadas com a cepa *Mtb H37Rv*. Também foram dosadas a partir do sobrenadante das culturas as citocinas IFN- γ , IL-10, TNF e IL-4. O TagSNP rs4760648 (T/T) do *VDR* está associado a um maior risco, enquanto que os rs1540339 (T/T) e rs2228570 (T/T) estão associados a uma menor susceptibilidade à TB. A expressão do *VDR* foi aumentada em pacientes com TB. O rs6853 (G/G) do *MYD88* foi associado a menor suscetibilidade à TB em caucasianos. Enquanto que o rs7873784 (G/G) *TLR4* foi associado a maior suscetibilidade em afrodescendentes. Nas culturas de PBMCs infectadas com *Mtb* observamos que a VD3 e o E2 regulam a expressão de diversos genes da inflamação, resposta imune e dos receptores estrógenos. Esses hormônios também regularam os níveis das citocinas IFN- γ e TNF. Por fim concluímos que a VD3 e o E2 influenciam na resposta contra o *Mtb*.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Hormônios esteróides. Receptores de reconhecimento de padrões. Inflamação. Resposta imune.

ABSTRACT

The role of steroid hormones in modulating the immune response in infectious diseases has been widely studied, especially in tuberculosis (TB). Through mechanisms that directly inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) or by immunomodulatory action, the hormones vitamin D₃ (VD₃) and 17 β -estradiol (E₂) are molecules of interest as therapeutic adjuvants in the treatment of TB. The aim of this work was to evaluate how VD₃ and E₂ can influence the response against *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). For this, we verified the association between *VDR*, *TLR4* and *MYD88* polymorphisms and TB susceptibility, and assessed the expression levels of *VDR*, *NLRP1*, and *NLRC4* in TB patients. In addition, we verified whether VD₃ and E₂ alter the expression profile of *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3*, *DC-SIGN*, *IL-10* and *IL-1 β* in PBMC culture infected with the *Mtb* H37Rv strain. The IFN- γ , IL-10, TNF and IL-4 levels were measured from culture supernatant. The *VDR* TagSNP rs4760648 (T/T) is associated with a higher risk, while rs1540339 (T/T) and rs2228570 (T/T) are associated with a lower susceptibility to TB. *VDR* expression was increased in TB patients. *MYD88* rs6853 (G/G) was associated with lower susceptibility to TB in Caucasians. While rs7873784 (G/G) of *TLR4* was associated with greater susceptibility in Afro-descendants. We observed that VD₃ and E₂ regulate the expression of several genes of inflammation, immune response and estrogen receptors in cultures of PBMCs infected with *Mtb*. These hormones also regulated the levels of the cytokines IFN- γ and TNF. Finally, we can conclude that VD₃ and E₂ influences the response against *Mtb*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*. Steroid hormones. Pattern recognition receptors. Inflammation. Immune response.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo geral	11
1.1.2 Objetivos específicos	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 TUBERCULOSE	13
2.1.1 Epidemiologia	14
2.1.2 Agente etiológico	16
2.1.3 Modo de Transmissão e Fatores de Risco	17
2.1.4 Patogênese e Sintomatologia da TB	18
2.1.5 Resposta Imune ao <i>Mtb</i>	21
2.2 VITAMINA D	33
2.2.1 Receptor da Vitamina D (VDR)	36
2.2.2 VD e Tuberculose	41
1.2 17 β -ESTRADIOL	44
2.3.1 Receptores do estrógeno	47
2.3.2 E ₂ e Tuberculose	50
3 ARTIGO 1 - PATHOGEN RECOGNITION PATHWAY GENE VARIANTS AND INFLAMMASOME SENSORS GENE EXPRESSION IN TUBERCULOSIS PATIENTS UNDER TREATMENT	53
4 ARTIGO 2 - GENE EXPRESSION PROFILE OF STEROID RECEPTORS AND THE ACTION OF THEIR LIGANDS IN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> INFECTION (<i>IN VITRO</i>)	68
5 ARTIGO 3 - STEROID HORMONES MODULATE PATTERN RECOGNITION RECEPTORS EXPRESSION IN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> INFECTED CELLS	90
6 DISCUSSÃO GERAL	108
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
REFERÊNCIAS	121
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MOLECULAR BIOLOGY REPORTS	139

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas respiratórias estão entre as três principais causas de morbidade e mortalidade em crianças e adultos, sendo responsáveis por cerca de quatro milhões de óbitos por ano em todo o mundo. Ao longo dos séculos, epidemias de doenças respiratórias causadas por patógenos, sejam vírus ou bactérias, tem sido um grande problema de saúde pública, com destaque para a tuberculose (TB) que possui uma das mais altas taxas globais de mortalidade, sendo considerada até antes da pandemia da *Coronavirus Disease -19* (COVID-19), a principal causa de óbitos por um único agente infeccioso.

A TB é uma doença de notificação compulsória, desta forma, dados epidemiológicos do perfil da população infectada, incluindo taxas de complicação e óbitos, têm sido coletados em todo o mundo. O sexo e a idade influenciam no desfecho clínico dessa doença, uma vez que mulheres em idade fértil, comparadas a homens na mesma faixa etária, apresentam menores taxas de complicações e óbitos.

A TB é um dos modelos mais estudados de dimorfismo sexual em infecções do trato respiratório. Embora a prevalência de TB em homens dependa da região geográfica, há uma tendência geral da razão homem/mulher afetar mais homens com piores desfechos em países em desenvolvimento, incluindo maior risco de mortalidade. Essa prevalência do gênero masculino também é observada quando outros fatores de risco como infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*), diabetes mellitus e tabagismo são combinados.

Hormônios esteróides tem, nos últimos anos, sido alvo de estudo frente a seu papel modulador da resposta imunológica e da inflamação, tanto em doenças cardiovasculares e auto imunes, como nas doenças infecciosas, com destaque para a TB. O principal hormônio feminino, 17 β -estradiol (E₂), se destaca neste contexto uma vez que apresenta níveis elevados em mulheres na idade fértil, mas decai consideravelmente a partir da pré-menopausa, idade em que mulheres em geral se tornam mais susceptíveis a doenças cardiovasculares e infecciosas. Isso por que o envelhecimento e a menopausa também influenciam o funcionamento do sistema imunológico, havendo uma redução significativa na síntese de hormônios esteróides sexuais e uma diminuição concomitante nos níveis de células imunes e sua capacidade funcional.

Outro hormônio esteróide com destaque em seu papel imunomodulador é a vitamina D₃ (VD₃), que desempenha funções importantes no sistema respiratório, podendo afetar a biologia celular pulmonar, bem como sua imunidade. Diversos estudos demonstram que a deficiência deste hormônio acarreta a uma maior susceptibilidade no desenvolvimento de doenças respiratórias de forma geral, mas com ênfase na TB. Isso por que a VD₃ atua de formas direta e indireta no combate ao *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).

A associação entre a VD₃ e a TB não é recente, sabe-se que durante séculos o tratamento contra a TB era baseado no consumo do óleo de fígado de bacalhau (rico em VD), e a ida ao campo para exposição regular a radiação solar, fonte primária de ativação da produção desse hormônio. Nas últimas décadas, a ação da VD₃ nas doenças infecciosas vem sendo amplamente investigada, destacando dois principais mecanismos de ação desse hormônio contra a infecção pelo *Mtb*: 1) a ativação da fusão do fagolisossomo por uma via independente do interferon- γ (IFN- γ) e 2) a modulação da expressão do gene *Human Cationic Antimicrobial Protein 18 (hCAP18)*, que tem como um dos produtos finais a catelecidina específica contra o *Mtb* em humanos, a LL -37. As atividades da VD₃ são desempenhadas pela sua ligação ao receptor da vitamina D (VDR), que se heterodimeriza com os receptores do ácido retinóico - RXR α , RXR β ou RXR γ , formando um complexo de ativação da transcrição de diversos genes.

E₂, através de receptores de estrogênio (ER), pode regular respostas imunes inatas e adaptativas, bem como a diferenciação de células imunes. Os ERs são fatores de transcrição dependentes de ligantes e desempenham papéis-chave na mediação de interações de longo alcance da cromatina e na formação de complexos que regulam a expressão gênica pela ligação à elementos de resposta ao estrógeno (EREs). A atividade E₂/ER possui efeitos dependentes da dose, célula alvo e do contexto na sinalização da resposta imune.

Desta forma, investigar as principais vias de atuação desses hormônios frente à infecção por esse patógeno pode ser uma importante ferramenta na investigação de possíveis moléculas que auxiliem na melhora da resposta imune do hospedeiro assim como numa contenção da inflamação nesses indivíduos na resposta contra o *Mtb*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos hormônios esteroides 1,25 α -dihidroxitamina D₃ e 17 β -estradiol e seus respectivos receptores na resposta imunogenética desencadeada na Tuberculose.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a associação entre polimorfismos do VDR e a susceptibilidade à TB ativa;

- Avaliar a expressão do *VDR* em pacientes com TB ativa comparando a indivíduos sintomáticos respiratórios;
- Avaliar a expressão gênica do *VDR* de acordo com os genótipos do polimorfismo *FokI* do *VDR* em pacientes com TB ativa;
- Avaliar a possível influência de polimorfismos nos genes *TLR4* e *MYD88* na susceptibilidade à TB ativa;
- Verificar o perfil de expressão dos genes *NLRP1*, *NLRC4* e *MYD88* em pacientes com TB ativa;
- Verificar se a 1,25 α -dihidroxitamina D₃ altera o perfil de expressão dos genes *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1* e *ESR2* em cultura de PBMCs infectadas com a cepa *Mtb H37Rv*;
- Avaliar se o 17 β -estradiol altera o perfil de expressão dos genes *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1* e *ESR2* em cultura de PBMCs infectadas com a cepa *Mtb H37Rv*;
- Avaliar se os hormônios esteroides 1,25 α -dihidroxitamina D₃ e 17 β -estradiol alteram a viabilidade do *Mtb H37Rv in vitro*;
- Avaliar se a 1,25 α -dihidroxitamina D₃ influencia no perfil de expressão gênica dos PRRs *NLRP3* e *DC-SIGN* e das citocinas *IL-1 β* e *IL-10* em cultura de PBMCs infectadas com a cepa *Mtb H37Rv*;
- Avaliar se o 17 β -estradiol influencia no perfil de expressão gênica dos PRRs *NLRP3* e *DC-SIGN* e das citocinas *IL-1 β* e *IL-10* em cultura de PBMCs infectadas com *Mtb H37Rv*;
- Verificar os níveis das citocinas *IL-10*, *IFN- γ* , *TNF* e *IL-4* em culturas de PBMCs infectadas com a cepa de *Mtb H37Rv* previamente tratadas com vitamina D₃ ou 17 β -estradiol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TUBERCULOSE

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de notificação compulsória causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Sua transmissão é quase que exclusivamente pela inalação de aerossóis contendo o bacilo, que são liberados durante a tosse de indivíduos infectados. Geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas pode afetar outros locais como ossos, fígado, intestinos e linfonodos (TB extrapulmonar) (DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2016).

Apesar de mais de 90 anos de vacinação e 60 anos de quimioterapia, a TB continua sendo a principal causa de morte por um único agente infeccioso no mundo. Estima-se que um quarto da população mundial seja infectada pelo *Mtb*, entretanto apenas cerca de dez por cento (10%) dos indivíduos infectados progridem para a TB ativa durante a vida; o restante das pessoas infectadas contém sua infecção com sucesso ou permanecem em estado latente (ILT) (BLOOM et al., 2017; MOUSQUER; PERES; FIEGENBAUM, 2021).

Um dos principais desafios no combate à TB é que o patógeno persiste em muitos indivíduos infectados em estado latente, podendo ser reativado a qualquer momento e progredindo à TB ativa/doença (DINARDO; GUY, 2016). O risco de progressão para TB doença é maior logo após a infecção inicial e elevado no grupo de pessoas coinfectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e que apresentam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) ou outras condições como desnutrição, diabetes, tabagismo e consumo excessivo de álcool (World Health Organization 2021).

Dentre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) em conjunto com a Organização Mundial da Saúde (OMS) está a erradicação de pandemias como a da TB, o projeto “*End TB*”. No qual países de todo o mundo se comprometeram em reduzir, até 2030, em 90% a taxa de óbitos e 80% a taxa de incidência da TB em comparação à 2015 (ONU, 2021). De acordo com a ONU, o avanço conquistado até 2019 no combate à TB sofreu um retrocesso com o surto da *Coronavirus Disease- 19* (COVID-19), o que refletiu no aumento no número de óbitos por TB pela primeira vez na última década. Em contrapartida, foi observada a diminuição da sua

incidência, acreditando-se ser devido a subnotificação de casos pela baixa testagem (ONU 2021; World Health Organization 2021).

O tratamento contra a TB requer a utilização de vários medicamentos por um período prolongado de tempo. Esses longos regimes de medicamentos são desafiadores tanto para os pacientes quanto para os sistemas de saúde, especialmente em países subdesenvolvidos, onde a carga da doença geralmente supera em muito os recursos locais. Em alguns países se observa uma alta incidência de TB resistente a medicamentos, exigindo regimes de tratamento ainda mais longos com medicamentos mais caros e difíceis de tolerar (SUÁREZ et al., 2019).

Sabe-se ainda que embora a Bacilo Calmette-Guérin (BCG) continue sendo a vacina mais usada no mundo para a TB, sua eficácia é variável. O que sugere que vacinas mais eficazes provavelmente serão necessárias para levar a TB à eliminação em ambientes de alta incidência (BLOOM et al., 2017).

2.1.1 Epidemiologia

A TB é uma doença transmissível considerada pela OMS como umas das dez principais causas de morte no mundo. Até o surto da COVID-19, em março de 2020, a OMS ranqueava a TB como a principal doença causada por um único agente infeccioso, o *Mtb*, e uma das principais causas de mortes no mundo por doenças infecciosas (World Health Organization 2021).

Segundo a OMS, em 2020 foi observada uma grande queda global no número de pessoas recém-diagnosticadas com TB, de 7,1 milhões em 2019 para 5,8 milhões em 2020 (18% de redução) (World Health Organization 2021). Essa diminuição pode ser resultado da provável subnotificação do número de casos de TB devido à pandemia de COVID-19. Outra consequência da pandemia foi a redução do acesso ao tratamento da TB, que se reflete no aumento dos óbitos dessa doença - 1,3 milhões em 2020 (World Health Organization 2021).

A TB afeta tanto o sexo masculino como o feminino em todas as faixas etárias, mas uma maior incidência é observada em homens na fase adulta. Em 2020, homens corresponderam a 56% de todos os casos de TB, enquanto que mulheres da mesma faixa etária correspondem a 33% dos casos. Cerca de 8,6%

de todos os casos de TB são indivíduos com HIV (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2021).

Sabe-se que mais de 86% dos casos notificados de TB são oriundos de apenas 30 países, sendo a maioria países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, dentre eles o Brasil (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2021). Segundo a OMS, em 2020 o Brasil registrou 66.819 casos novos de TB, com um coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100 mil habitantes. Em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, 29% dos casos notificados foram em mulheres (≥ 15 anos) e 68% em homens da mesma faixa etária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). O Brasil é agora o centro das preocupações da OMS nas Américas, onde a incidência de TB parece estar aumentando. Em 2020, o Brasil registrou um coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100.000 habitantes. Seguindo a tendência mundial, entre 2011 e 2020, 69,0% dos casos novos de TB eram do sexo masculino (Secretaria de Vigilância em Saúde 2021).

Uma parcela relativamente pequena, 5-10% dos quase 2 bilhões de pessoas infectadas com o *Mtb* desenvolveram ou desenvolverão TB ativa durante sua vida. No entanto, a probabilidade de desenvolver a doença é muito maior entre pacientes coinfetados com HIV ou que apresentam fatores de risco como desnutrição, diabetes, tabagismo, consumo excessivo de álcool, pessoas em situação de rua, população carcerária e indígenas (Organização Mundial da Saúde 2019).

O desenvolvimento da forma ativa da TB ainda depende de vários fatores desde o estilo de vida até o estado imunológico, comorbidades como diabetes e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), bem como o perfil genético do indivíduo infectado podem influenciar na susceptibilidade à TB (Menon et al. 2016; Mathema et al. 2017).

O tratamento anti TB requer a associação de vários medicamentos e perdura muitos meses. Esses longos regimes de medicamentos são desafiadores tanto para os pacientes quanto para os sistemas de saúde, especialmente em países de baixa e média renda, onde a carga da doença geralmente supera em muito os recursos locais. Em algumas áreas, a incidência de TB resistente a medicamentos, exigindo regimes de tratamento ainda mais longos com medicamentos mais caros

e difíceis de tolerar, está aumentando. Resistência à isoniazida e rifampicina – as duas drogas de primeira linha mais eficazes – é a maior preocupação dos órgãos de saúde. A resistência a ambas as drogas é definida como TB multidroga resistente (MDR-TB). Estima-se que em 2020, 71% (2,1/3,0 milhões) das pessoas diagnosticadas com TB pulmonar foram testadas para MDR-TB. Entre estes, 132.222 casos foram identificados, observando uma queda de 22% em relação a 2019. Por outro lado, a redução no número de casos MDR-TB foi consistente com a redução no número de casos diagnosticados de TB (19%) (World Health Organization 2021).

2.1.2 Agente etiológico

O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da TB. Pertence ao reino *Bacteria*, filo *Actinobacteria*, da ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium* e espécie *Mycobacterium tuberculosis* (KOCH; MIZRAHI, 2018).

Apresenta resistência a medicamentos mediada exclusivamente por mutações e rearranjos que acontecem em seu único cromossomo, que é circular e tem aproximadamente 4.4 mega bases (Mb). Não apresenta plasmídeos e não realiza transferência horizontal de genes (KOCH; MIZRAHI, 2018). Aproximadamente 10% do seu genoma é constituído de genes das famílias prolina-glutamato (PE) e prolina-prolina-glutamato (PPE), que codificam antígenos implicados na evasão imunológica e na imunopatogênese na doença (AKHTER et al., 2012).

Morfologicamente, o *Mtb* se caracteriza por ser um bacilo reto ou ligeiramente curvo, cuja dimensão varia de 0,2 a 0,6 micrômetros (µm) de espessura, por 1 a 10 µm de comprimento. O bacilo é imóvel, não esporulado, não encapsulado, não produz toxinas e é capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, o que o caracteriza como um patógeno intracelular aeróbio estrito (M. et al., 2013).

Sua parede é constituída por lipídios, que compreendem 40% da massa seca da célula, açúcares e ácidos micólicos, que juntos formam uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação e à descoloração por álcool e ácido, sendo esta propriedade morfotintorial a mais importante característica diagnóstica do

bacilo. Em virtude disso, as micobactérias são também denominadas de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) (KOCH; MIZRAHI, 2018; M. et al., 2013). Não são caracterizadas nem como Gram-positivas, nem Gram-negativas, sendo identificadas pela coloração de Ziehl-Neelsen (KOCH; MIZRAHI, 2018).

O ciclo de reprodução do *Mtb* dura aproximadamente 20 horas, o que é considerado extremamente lento em comparação a bactérias que tendem a ter tempos de divisão medidos em minutos, como a *Escherichia coli* que se multiplica a cada 20 minutos. Essa característica acaba dificultando o cultivo do *Mtb* em laboratório (KOCH; MIZRAHI, 2018). O bacilo é capaz de suportar desinfetantes fracos e sobreviver num estado seco durante semanas, além de resistir à luz ultravioleta (UV) (KOCH; MIZRAHI, 2018; M. et al., 2013).

2.1.3 Modo de Transmissão e Fatores de Risco

A TB é transmitida pelo ar de uma pessoa para outra. O *Mtb* é transportado em partículas aéreas, chamadas de núcleos infecciosos constituídos por gotículas que abrigam de 1 a 5 bacilos. Esses núcleos infecciosos compostos de saliva e bacilos do *Mtb* são gerados quando pessoas com TB ativa pulmonar ou laríngea tosse, falam ou espirram. Dependendo do ambiente, essas gotículas podem permanecer suspensas no ar por várias horas (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013; FOGEL, 2015).

A TB ativa nos pulmões ou laringe pode ser infecciosa, ou seja, pode infectar outras pessoas, já a TB extrapulmonar geralmente não é transmissível (MATHEMA et al., 2017).

A transmissão ocorre quando o indivíduo inala os núcleos infecciosos e o *Mtb* consegue atravessar a boca ou os canais nasais, o trato respiratório superior e os brônquios, para só então alcançar os alvéolos pulmonares onde se instala até ser fagocitado por células do sistema imune. A partir daí, o *Mtb* pode se locomover pelo sangue para infectar outros órgãos como rins, coluna vertebral e cérebro (KETATA et al., 2015).

Embora a TB seja uma doença infecciosa, vários fatores podem determinar a probabilidade de transmissão do *Mtb*, dentre eles está a susceptibilidade do indivíduo, que engloba tanto o estado imunológico que se encontra, como o seu perfil genético. Outros fatores de influência são o número de bacilos expelidos pelo

indivíduo infectado, a carga bacilar inalada, fatores ambientais como o tamanho do espaço ao qual os indivíduos se encontram, assim como a ventilação, a circulação e a pressão positiva do ar que permitiriam ao *Mtb* flutuar para outros ambientes, além do tempo, proximidade e da frequência da exposição (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013; MATHEMA et al., 2017).

A idade também é um fator de risco para o desenvolvimento da TB ativa, isso porque pacientes idosos apresentam risco aumentado de desenvolver outras comorbidades como diabetes mellitus e doença renal, o que aumenta o risco de desenvolver a TB ativa (LYON; ROSSMAN, 2017). Por outro lado, crianças menores de cinco anos de idade e portadores de doenças imunodepressoras como AIDS, ou que fazem tratamento com medicações imunossupressoras para doenças autoimunes, pós transplantes e câncer também apresentam risco mais elevado de desenvolver a forma ativa da doença (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013; MATHEMA et al., 2017).

2.1.4 Patogênese e Sintomatologia da TB

Um princípio da patogênese da TB é que o *Mtb* pode tanto estar em estado latente - metabolicamente inativo, ou em um estado de doença – metabolicamente ativo. Nesse contexto, estima-se que 25% da população mundial (1.7 bilhões de pessoas) é infectada pelo *Mtb*, entretanto, apenas 5%-15% desses indivíduos evolui rapidamente para a TB ativa, enquanto a grande maioria desenvolve uma infecção latente e permanece em risco de progressão (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2021).

Convencionalmente sabe-se que após o contato inicial do hospedeiro com o *Mtb*, a infecção pode progredir para TB ativa/doença, ou o patógeno pode ser completamente eliminado por meio de uma resposta imune inata e/ou adquirida do indivíduo ou pela medicação anti TB, esse indivíduo não possui mais *Mtb* viável, mas pode apresentar evidencia imunológica da infecção (FURIN; COX; PAI, 2019). Além desses, um estado de TB latente pode ser desencadeado, no qual o hospedeiro e o *Mtb* mantem uma relação dinâmica, por meio da regulação da disponibilização de nutrientes, bem como do sistema imune (DRAIN et al., 2018). Na infecção latente não se espera que a TB ativa ocorra em um futuro próximo,

exceto se na presença de comprometimento imunológico significativo (DINARDO; GUY, 2016).

Evidências demonstram que indivíduos expostos ao *Mtb* podem não desenvolver a TB ativa, enquanto que outros rapidamente sucumbem à infecção ou à TB ativa com o mínimo de exposição. A infecção pelo *Mtb* exibe um amplo espectro de fisiopatologia. Isso porque a variação genética e fenotípica da bactéria, juntamente com a interação com o hospedeiro pode influenciar na progressão ou não da doença (CARDONA, 2016, 2018; DINARDO; GUY, 2016).

A nível populacional, existe uma grande heterogeneidade genética entre diferentes cepas de *Mtb*, o que influencia a interação com o sistema imunológico do hospedeiro e a patogênese. Essa heterogeneidade genética se traduz em uma variação substancial na virulência e imunogenicidade do *Mtb*, o que acaba afetando a propensão a induzir ou acelerar a TB ativa (TIENTCHEU et al., 2017). Além disso, estudos vêm demonstrando que diferentes cepas induzem diferentes respostas imunes inatas e adaptativas (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014).

Uma vez inalados, a maioria dos bacilos se fixa no trajeto bifurcado da árvore traqueobrônquica, entretanto podem ultrapassar mecanismos físicos de defesa como o movimento ciliar do epitélio respiratório e serem depositados nos alvéolos, geralmente nos seguimentos inferiores dos lobos inferior e médio e nos seguimentos anteriores dos lobos superiores (LAWN et al., 2013).

Uma série de mecanismos de contenção como barreiras físicas e agentes microbianos que servem como obstáculos a infecção pelo *Mtb* devem ser ultrapassados para que os bacilos cheguem aos alvéolos. É muito provável que o *Mtb* seja susceptível a qualquer um desses mecanismos de contenção e durante essa jornada pelas vias aéreas superiores seja incapacitado de infectar o hospedeiro (SCRIBA; COUSSENS; FLETCHER, 2017).

Ao atingir os alvéolos, os bacilos de *Mtb* desencadeiam a ativação da imunidade inata mediada por células que fagocitam os bacilos na tentativa de inibir o crescimento micobacteriano, entretanto sem sua erradicação. Essas células são os macrófagos alveolares, que em torno de 2 a 8 semanas após a infecção além de fagocitarem os bacilos, formam ao redor do sítio de infecção uma barreira de células, chamada de granuloma, que tem como objetivo manter a infecção pelos bacilos sob controle (Figura 1) (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

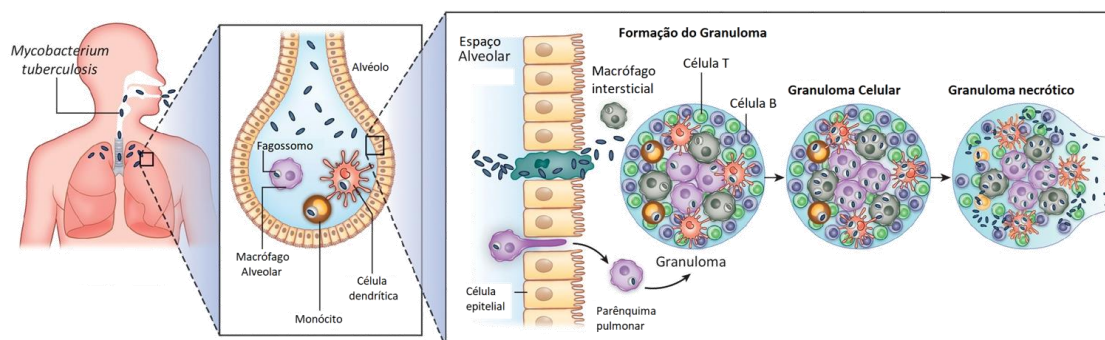


Figura 1: Ilustração do processo de infecção do *Mtb* nos alvéolos pulmonares e formação do granuloma. Fonte: Traduzida de (KOCH; MIZRAHI, 2018).

Esse tipo de resposta envolve a participação de diversos tipos celulares além dos macrófagos alveolares, como as células dendríticas e linfócitos T, como também a liberação de citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), IL-12, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas como IL-8, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α). Todos esses fatores desempenham papel crucial no recrutamento de células para o sítio de infecção e na contenção do *Mtb* com a formação do granuloma (Figura 1) (DRUSZCZYŃSKA et al., 2012).

A estrutura do granuloma é formada principalmente por macrófagos alveolares infectados com o *Mtb* e macrófagos recrutados, alguns se diferenciam em células de linhagem epitelial e outros podem se fundir formando células gigantes e multinucleadas. Esses macrófagos são intercalados com neutrófilos recrutados e linfócitos T e B (Figura 1). Granulomas são altamente diversificados e exibem um amplo espectro de estruturas, tamanhos e composição celular, podendo essa diversidade ser observada também dentro de um único hospedeiro (SCRIBA; COUSSENS; FLETCHER, 2017).

Variações nas composições celulares e nos níveis de ativação das células imunológicas, células epiteliais e da matriz extracelular que compreende o granuloma expõem o *Mtb* a diferentes disponibilidades de nutrientes, intermediários reativos e perfis de citocinas, bem como a penetração diferenciada de medicamentos (DHAR; MCKINNEY; MANINA, 2016; LENAERTS; BARRY; DARTOIS, 2015). Os mecanismos pelos quais o *Mtb* se adapta a diferentes microambientes criados por diferentes sítios de infecção podem contribuir com a progressão diferencial no espectro da infecção (DRAIN et al., 2018).

O fenótipo dos macrófagos dentro do granuloma também pode afetar a probabilidade de extravasamento da infecção, desta forma iniciando uma resposta imune inflamatória e possibilitando o desenvolvimento da tuberculose extrapulmonar a depender do estado imunológico do indivíduo (SCRIBA; COUSSENS; FLETCHER, 2017).

A TB também pode ocorrer em outros órgãos além do pulmão, até mesmo quando a infecção é assintomática. Tendo cada sítio de infecção seu próprio microambiente (LENAERTS; BARRY; DARTOIS, 2015).

A TB pulmonar frequentemente se desenvolve lentamente. Normalmente, até que a doença chegue a um estágio moderado ou avançado, os sintomas são discretos e geralmente atribuídos a outras causas como fumo, gravidez, estafa ou outras condições (KOCH; MIZRAHI, 2018).

A frequência dos sintomas varia de acordo com o estágio da doença ao qual se encontra o indivíduo (LYON; ROSSMAN, 2017). Os sintomas mais frequentes são febre baixa, que caracteristicamente ocorre no final da tarde e pode ou não ser acompanhada de sintomas como suor noturno, mal estar, irritabilidade, fraqueza, fadiga, dor de cabeça e perda de peso (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017).

Com o avanço da infecção, necrose no tecido pulmonar e concomitante liquefação do tecido gera tosse e escarro, caracterizados como sintomas pulmonares, que podem ou não ser associados à hemoptise. Sintomas como dor no peito localizada e falta de ar indicam a evolução da doença com o envolvimento generalizado do pulmão e parênquima, podendo apresentar obstrução traqueobrônquica. Sintomas esses encontrados mais tardiamente no curso da doença (LYON; ROSSMAN, 2017).

2.1.5 Resposta Imune ao *Mtb*

A imunidade desencadeada na TB não resulta de ação específica direta e precisa contra o *Mtb*. O ataque a este, constitui um processo de grande complexidade, que varia de acordo com as circunstâncias, nem todas bem definidas e com intervenção de elementos múltiplos, razão pela qual é mais adequado denominar este processo de resposta imune adquirida (GUPTA; KUMAR; AGRAWAL, 2018).

Indivíduos imunocompetentes podem controlar o desenvolvimento da TB através de duas linhas de defesas específicas. A primeira linha de defesa do sistema imunológico contra microrganismos invasores é formada por células polimorfonucleares, monócitos e macrófagos alveolares, constituindo assim a resposta imune inata (FURIN; COX; PAI, 2019).

Uma vez que o *Mtb* é inalado e chega os alvéolos pulmonares, os bacilos são normalmente fagocitados pelos macrófagos alveolares, internalizando-os para dentro do fagossomo que se funde com o lisossomo formando o fagolisossomo, local onde são liberadas uma série de grânulos e outros produtos tóxicos produzidos pelos macrófagos e armazenados previamente no lisossomo. Dentre esses produtos estão inúmeras enzimas hidrolíticas que conferem a essa organela conteúdo ácido. A formação do fagolisossomo é considerada mecanismo primário de controle da infecção e sua ativação se dá por meio do IFN- γ (FOGEL, 2015).

Dentre as principais moléculas liberadas pelo lisossomo está a LL-37, um peptídeo antimicrobiano que atua contra o *Mtb* pertencente à família das catelecidinas. Esta catelecidina está envolvida na primeira linha de defesa contra patógenos, incluindo o *Mtb* (RIVAS-SANTIAGO et al., 2008).

Ao serem fagocitados, os bacilos ficam em vacúolos citoplasmáticos e são apresentados aos linfócitos T CD4⁺ pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), presente também em macrófagos e células dendríticas. Essas células são chamadas de apresentadoras de antígenos (APCs) e produzem citocinas inflamatórias como o TNF e a IL-1, capazes de recrutar neutrófilos e monócitos. Os macrófagos também ativam uma resposta imune específica contra o *Mtb* pela liberação de IL-12 e IL-18, citocinas que estimulam predominantemente os linfócitos T CD4⁺ a liberarem IFN- γ , que por sua vez estimula a fagocitose do *Mtb* e a fusão fagolisossomo (CLIFF et al., 2015; GUPTA; KUMAR; AGRAWAL, 2018).

Se os bacilos não são mortos durante a interação inicial, eles podem proliferar dentro de células dendríticas e macrófagos alveolares em uma alta taxa de crescimento (DOMINGO-GONZALEZ et al., 2016; FOGEL, 2015).

As células dendríticas são importantes APCs, elas transportam o *Mtb* para o linfonodo mediastino (MLN), onde o apresenta seus peptídeos para as células T. Essa apresentação é feita entre o MHC-II das APCs e os receptores de conhecimento de padrões (PRRs) dos linfócitos. Essa apresentação inicia a

produção por células T CD4⁺ e CD8⁺ que desencadeiam uma resposta T helper tipo 1 (Th1), e são direcionadas para os alvéolos pulmonares para secretar IFN- γ (FOGEL, 2015).

Durante esse período as micobactérias podem sofrer mutações em seu genoma que contribuem com um perfil diferencial de expressão gênica, alterando os antígenos de superfície para evitar o reconhecimento de células T (DE MARTINO; GALLI; CHIAPPINI, 2014). As células de resposta Th1 são ativadas e proliferam em resposta à IL-12 que é produzida por macrófagos infectados com o *Mtb*, assim como a outras citocinas liberadas por APCs como a IL-18 e a IL-23 (WALZL et al., 2015).

Essa resposta é mediada por PRRs que são expressos por essas células e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos pelo *Mtb* (HOSSAIN; NORAZMI, 2013). Dentre esses receptores, vários se destacam no desencadeamento da resposta inflamatória contra o *Mtb*, os receptores do tipo oligomerização de nucleotídeos (NLRs), os receptores do tipo toll (TLRs) e os receptores de leptina do tipo C (CLRs). O objetivo da apresentação do *Mtb* a esses receptores é a indução de várias cascatas de sinalização intracelular para produção de citocinas, sejam elas pró ou anti-inflamatórias, regulando assim o processo de inflamação (FOGEL, 2015).

Os PAMPs do *Mtb* são reconhecidos por uma variedade de receptores que mediam a captação bacteriana opsônica e não-opsônica: CLRs como receptores de manose, DC-Sign (CD209), dectina-1 e dectina-2; receptores sequestradores como o CD36; receptores de membrana ancorados em glicofosfatidilinositol (GPI) como o CD14 e TLRs. O DNA do *Mtb* pode ser reconhecido por PRRs para induzir a produção de citocinas e autofagia. Além disso, NLRs, que são PRRs citosólicos reconhecem PAMPs de *Mtb* como o dipeptídeo muramil, ativando um complexo multiproteico denominado de inflamassoma (SIA; RENGARAJAN, 2019).

Inflamassomas são componentes centrais da resposta imunológica inata e podem reconhecer produtos microbianos, relacionados à PAMPs, e moléculas endógenas, relacionadas à padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), por PRRs. A ativação desse complexo ocorre pelo reconhecimento de NLRs. Entre vários NLRs que formam o complexo inflamassoma, evidências indicam um papel importante do inflamassoma NLRP3 na resposta ao *Mtb* (DORHOI et al., 2012).

Estruturalmente, o NLRP3 é constituído de um domínio NACHT, um domínio pirina (PYD), uma repetição rica em leucinas (LRRs) e um domínio de recrutamento de caspases (CARD). Diante de uma exposição da célula a determinado risco, ocorre a oligomerização do receptor e incorporação dos domínios PYD e CARD, formando uma proteína adaptadora ASC (ou PYCARD). O domínio CARD se liga à pró-caspase-1 que ao se auto clivar forma a caspase-1 ativa, sendo capaz de processar a pró-IL-1 β em citocina ativa. A ativação desse complexo por via canônica requer dois sinais independentes: um sinal de preparação inicial e um outro sinal para o NLRP3 ser totalmente ativado (KELLEY et al., 2019; MAI; LIAO, 2020; MANGAN et al., 2018).

O sinal inicial começa quando PAMPs, e outros mediadores inflamatórios como IL-1 β e TNF, se ligam a seus respectivos receptores, e induzem a ativação do NF- κ B, que promove a transcrição de genes dependentes dessa via, como *NLRP3*, pró-IL-1 β e pró-IL-18. Um segundo sinal pode ser iniciado através de vários estímulos extracelulares, como cristais de colesterol e ácido úrico, que induzem a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desencadeia danos mitocondriais, promovendo a oligomerização do NLRP3 (LÓPEZ-REYES et al., 2020), como descrito anteriormente.

Essa via de sinal NF- κ B é ativada através da fosforilação e ubiquitinação após a ligação de IL-1 β a IL-1R1, por exemplo. Após a ativação dos sinais inflamatórios, a I κ B quinase (IKK) fosforila a proteína I κ B α , levando à ubiquitinação desta e à separação do I κ B α do NF- κ B. NF- κ B é assim ativado e se transloca para o núcleo, então se liga a sequências de DNA específicas. Em seguida, o complexo DNA/NF- κ B recruta outras proteínas e aumenta a transcrição e tradução de genes de mediadores inflamatórios (GREBE; HOSS; LATZ, 2018).

Para a ativação final do NLRP3, ocorre a clivagem da gasdermina D (GSDMD) pela caspase-1, resultando na liberação de fragmentos N-terminais de GSDMD, o que permite a formação de poros nas membranas celulares. Diante da formação desses poros, ocorrerá a liberação desenfreada do conteúdo citosólico, causando a disseminação de IL-1 β que induz a morte celular por piroptose (BIASIZZO; KOPITAR-JERALA, 2020; LIU et al., 2016).

A interação inicial com o *Mtb* é considerada crucial para a ativação de macrófagos e o eventual desfecho da doença. PRRs expressos em macrófagos determinam a ligação, internalização e destino intracelular do bacilo. Entre as várias

famílias de PRRs que reconhecem esse bacilo estão os CLRs, conhecidos por contribuir para o controle ou persistência desse patógeno nos macrófagos (LUGO-VILLARINO et al., 2011; SANCHO; REIS E SOUSA, 2012). A família CLR inclui coletinas, selectinas, receptores endocíticos e fagocíticos e proteoglicanos. CLRs são proteínas de ligação a glicano dependentes de cálcio que exibem semelhanças nas estruturas do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), que dependendo da sua sequência de aminoácidos apresenta especificidade para uma ou outra estrutura contendo resíduos de manose, fucose, galactose, N-acetilGlucosamina, N-AcetilGalactosamina. Por sua vez, CRDs reconhecem os carboidratos expressos na superfície do *Mtb* incluindo glicolipídios como por exemplo, manosídeo de fosfatidil-mio-inositol (PIM), glicoglicanos como o lipoarabinomanano (LAM), polissacarídeos como α -glucano e glicoproteínas (LUGO-VILLARINO et al., 2018).

Nos últimos anos, a compreensão das interações de ligantes micobacterianos com CLRs avançou consideravelmente, especificamente em receptores fagocíticos ancorados na membrana, como o receptor de manose MRC1 (CD206 / CLEC13D) e a molécula de adesão intercelular específica para células dendríticas-3-Grabbing não integrina (DC-SIGN / CD209 / CLEC4L) (LUGO-VILLARINO et al., 2011; YONEKAWA et al., 2014). Em termos gerais, a ativação desses receptores pelo *Mtb* leva a efeitos como endocitose, oligomerização, tráfego intracelular e transdução de sinal. Evidências apontam que as vias de sinalização desencadeadas por esses CLRs convergem em um conjunto limitado de interações sinérgicas ou antagônicas com outros PRRs e entre si, dando origem a um fenômeno conhecido como sinalização cruzada. Curiosamente, o *Mtb* desenvolveu a capacidade de subverter esse fenômeno de sinalização para aumentar sua sobrevivência e aptidão dentro dos macrófagos (LUGO-VILLARINO et al., 2011; RAJARAM et al., 2014; YONEKAWA et al., 2014).

O reconhecimento de patógenos pelo DC-SIGN, determina o tipo de resposta imune adaptativa que irá acontecer, através da modulação de vias de sinalização induzidas por outros receptores e, com isso, promovendo a adaptação da resposta imune aos diferentes patógenos (JOSHI et al., 2011).

Estudos realizados identificaram e caracterizaram o DC-SIGN como um receptor-chave para o *Mtb* em células dendríticas e macrófagos. Este CLR é um receptor transmembrana que possui um único CRD extracelular, no terminal C,

capaz de reconhecer moléculas contendo manose, como as presentes em ManLAM micobacteriana (LAM capeado com manose) (LUGO-VILLARINO et al., 2018). No caso do *Mtb*, foi demonstrado que o DC-SIGN é direcionado pelo ManLAM micobacteriano para induzir a liberação de IL-10 e neutralizar o TLR-4 dependente de resposta pró-inflamatória. Desta forma, o bacilo impede a ativação adequada das células dendríticas, uma vez que a IL-10 inibe a expressão de moléculas coestimuladoras como CD86 e a produção de IL-12, que são essenciais para a melhor ativação da resposta Th1. Digno de nota, o sequestro da produção de IL-10 via DC-SIGN em células dendríticas parece ser uma estratégia geral de evasão por vários patógenos (DORHOI et al., 2012; NEYROLLES; GICQUEL; QUINTANA-MURCI, 2006; VAN KOOYK; GEIJTENBEEK, 2003).

Vale ressaltar que o reconhecimento do *Mtb* pelo DC-SIGN pode por um lado, ser um fator do hospedeiro que confere vantagem para o patógeno parasitar macrófagos e, por outro lado, representa uma chave molecular para desligar a resposta pró-inflamatória nessas células para prevenir potencialmente a imunopatologia associada à TB (LUGO-VILLARINO et al., 2018).

Os TLRs são os principais PRRs envolvidos no reconhecimento de antígenos do *Mtb* e responsáveis pela ativação de macrófagos e células dendríticas. Controlam a ligação entre a resposta imune inata e adquirida, aumentando a expressão de moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 na superfície de macrófagos e CDs, que interagem com os receptores CD28 nos linfócitos T, ampliando assim a resposta imune (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007).

O *Mtb* expressa uma variedade de PAMPs conhecidos ou putativos de TLR, sendo os TLR-2, TLR-4 e TLR-9 implicados no reconhecimento do *Mtb* pelo hospedeiro (SIA; RENGARAJAN, 2019). A contribuição desses receptores para a imunidade contra a infecção pelo *Mtb* é variável, mas a importância da via de sinalização é evidente, uma vez que estudos mostram que camundongos que não expressam a proteína adaptadora comum dos TLRs, o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), sucumbem rapidamente à infecção pelo *Mtb*. Isso se daria pelo comprometimento da capacidade de ativar a via dos receptores de IL-1 β ou IL-1 (IL-1R), comprometendo também a sinalização de macrófagos por IFN- γ e liberação de IL-12 e TNF em macrófagos e células dendríticas (MAYER-BARBER et al., 2010; SIA; RENGARAJAN, 2019).

Os TLR2, TLR4 e TLR9 reconhecem componentes estruturais do *Mtb* e iniciam uma resposta inflamatória pela liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão e recrutamento de outras células da imunidade para o local da infecção (MORTAZ et al., 2015). O TLR2 reconhece importantes componentes da parede celular do *Mtb* como os glicolipídios lipoarabinomanano e lipomanano, o fosfatidilinositol manosídeo e glicoproteínas. Este receptor é capaz de formar heterodímeros com TLR1 ou TLR6, reconhecendo lipopeptídeoacilados ou diacilados, respectivamente (ALBIGER et al., 2007; KLEINNIJENHUIS et al., 2011; ZUÑIGA et al., 2012).

Camundongos deficientes em *TLR2* apresentam defeitos na formação do granuloma e maior susceptibilidade à infecção comparado com animais tipo-selvagem (DRENNAN et al., 2004). Além disso, TLR2 e TLR6 estimulam a produção de IL-1 β e são importantes para a liberação de IL-12 em macrófagos, mas não em células dendríticas (KLEINNIJENHUIS et al., 2009; POMPEI et al., 2007).

O TLR9 reconhece motivos CpG não metilados em DNA bacteriano (ALBIGER et al., 2007). Em estudo realizado com camundongos deficientes em TLR9, verificou-se que esses animais sucumbem mais rápido à infecção por TB do que os animais tipo-selvagem (BAFICA et al., 2005).

O TLR4 é ativado por diferentes proteínas do choque térmico secretadas pelo *Mtb* (BULUT et al., 2005). Macrófagos derivados de camundongos nocauteados para o *TLR4*, demonstraram uma menor produção de TNF (MEANS et al., 2001). O TLR4 pode induzir uma via dependente do TIR domain containing adaptor protein-inducing IFN- β (TRIF) que está envolvida na autofagia induzida por LPS, tendo um papel na fusão do fagolisossomo (XU et al., 2007).

Um estudo *in vivo* com murinos deficientes em *TLR4*, reportou um maior crescimento micobacteriano nos pulmões, baço e fígado e menor sobrevivência pós-infecção comparado aos animais tipo selvagem, indicando que o TLR4 é necessário para controlar o estágio crônico da infecção (ABEL et al., 2002) (Figura 2).

A ativação de TLRs pode acionar duas vias de sinalização que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e IFNs do tipo I, sendo uma via dependente e outra independente do MyD88 (Figura 2). O MyD88 é usado por todos os TLRs, com exceção do TLR3, e atua induzindo a produção de citocinas inflamatórias importantes na contenção do *Mtb* (MORTAZ et al., 2015).

A sinalização do MyD88 na imunidade inata integra a sinalização de TLRs e de IL-1 pela ligação ao receptor associado a quinase (IRAK) inibindo diversas vias de ativação da inflamação como a do fator de necrose κ B (NF- κ B), a de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e proteína ativadora 1 (AP-1). Tanto a IL-1 α como a IL-1 β , assim como seu receptor comum IL-1R, estão implicados na imunidade ao *Mtb*. Sabe-se também que a liberação da IL-1 β requer a clivagem pelo efetor terminal do inflamassoma, a caspase-1, desta forma, também requer a ativação deste complexo via receptores NLRs (MAYER-BARBER et al., 2010) (Figura 2).

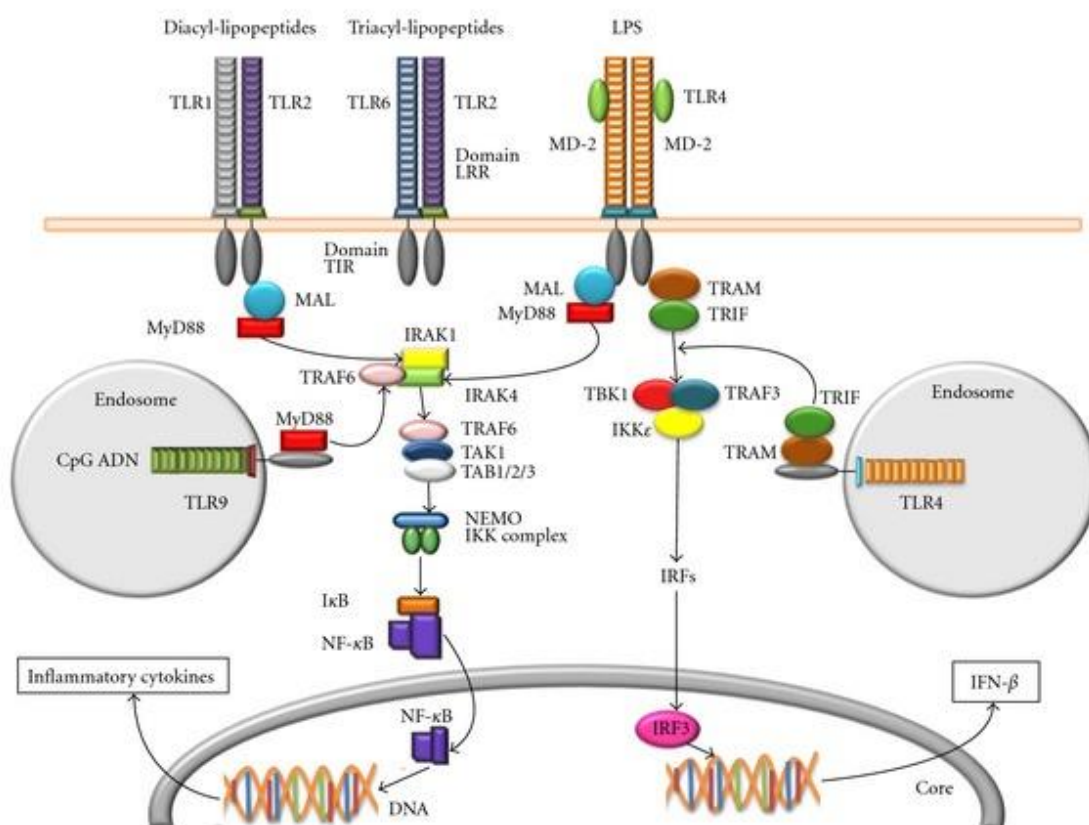


Figura 2: TLRs sinalizam vias envolvidas no reconhecimento de estruturas do *Mtb*. Os receptores TLR podem reconhecer vários PAMPs conservados da parede celular de micobactérias. Proteínas diaciladas ou triaciladas, bem como LPS, são reconhecidas por receptores de membrana (TLR1, TLR2, TLR6 e TLR4), enquanto o DNA CpG bacteriano não metilado pode ser reconhecido por TLR9 endossomal. O adaptador MyD88 é um componente central na sinalização TLR cuja cascata de sinalização a jusante leva à ativação de fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 e à produção de citocinas inflamatórias. A sinalização através da molécula adaptadora TRIF ativa o fator de transcrição IRF-3 induzindo a secreção de IFN- β . Fonte: (ZUÑIGA et al., 2012)

Durante o estágio inicial de infecção, ainda na resposta imune inata, o *Mtb* se prolifera dentro das células hospedeiras. Esse processo induz a sinalização de uma via de morte celular por meio do sistema de secreção do fator de virulência ESX1 do tipo VII, o que atrasaria a resposta imune adaptativa (DE MARTINO; GALLI; CHIAPPINI, 2014). Esse mecanismo permite ao *Mtb* atrasar em até 12 semanas após a infecção uma resposta imune adaptativa do hospedeiro (CRUZ-KNIGHT; BLAKE-GUMBS, 2013).

A entrada do *Mtb* nos macrófagos por meio de diferentes receptores pode levar à ativação de vias distintas que podem inibir ou promover a replicação micobacteriana. Como por exemplo, a captação do *Mtb* pelo receptor do complemento 3 (CR-3) depende do colesterol do hospedeiro, que media a associação fagossômica com a coronina-1 resultando na inibição da formação de fagolisossomos pela ativação da calcineurina do hospedeiro (JAYACHANDRAN et al., 2007).

Por outro lado, o reconhecimento micobacteriano pelo TLR2 ativa a transcrição dos genes codificantes do NF- κ B e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS, NOS2) pela secreção de TNF, responsável por altos níveis de óxido nítrico (NO). A produção de NO está fortemente associada à resistência ao *Mtb*, isso por que intermediários de nitrogênio reativo (RNI) são tóxicos para as micobactérias, sendo a infecção exacerbada pela inibição da NOS2 (SIA; RENGARAJAN, 2019). Sabe-se ainda que a produção de NO após sinalização do IFN- γ limita a inflamação ao inibir o processamento da pró-IL-1 β em IL-1 β pelo inflamassoma (MISHRA et al., 2013).

O reconhecimento do *Mtb* pelo TLR2 induz, de fato, uma resposta predominantemente pró-inflamatória. Entretanto, a sinalização via TLR2 também aumenta a secreção de IL-10, citocina Th2 – anti-inflamatória, pelas células dendríticas e macrófagos, sugerindo um mecanismo de defesa do patógeno no controle da resposta inflamatória do hospedeiro (SALGAME, 2005).

Células Th1 ativadas são a principal fonte de IFN- γ , crucial para a ativação do fagolisossomo em macrófagos e contenção da infecção. Nesta etapa, a eliminação do *Mtb* antes do estabelecimento da resposta imune adaptativa é possível, no entanto, cepas mais modernas de *Mtb* evoluíram geneticamente à nível de evasão imunológica, permitindo sua sobrevivência no hospedeiro por prolongados períodos (OTTENHOFF et al., 2012).

A secreção de citocinas e quimiocinas no início da infecção recruta células fagocíticas adicionais ao local da infecção, sendo que a secreção precoce de quimioatraentes pode ser atribuída a macrófagos alveolares infectados, bem como a células epiteliais do pulmão. A chegada de monócitos e granulócitos exerce uma pressão imune sobre o *Mtb* e é crucial para o início de respostas imune adaptativas, mas também pode promover a transmissão e disseminação célula a célula do *Mtb* (REUSCHL et al., 2017).

Neutrófilos estão entre as primeiras células imunes que migram para o local da infecção pelo *Mtb*, onde desempenham um papel crucial no desencadeamento da resposta imune inata e inflamação aguda. Os neutrófilos produzem e secretam enzimas antimicrobianas como α -defensinas, metaloproteases de matriz, lactoferina e lipocalina que tem por objetivo restringir o crescimento de micobactérias nos macrófagos, promovendo assim a apoptose dessas células. Neutrófilos também secretam quimiocinas como a proteína induzida por interferon 10 (IP-10), a MCP-1 e as proteínas MIP-1 α e β , além de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF, com o intuito de recrutar e ativar outras células do sistema imune (GUPTA; KUMAR; AGRAWAL, 2018).

Além dos neutrófilos, monócitos também são recrutados para o local da infecção. O receptor de quimiocina C-C tipo 2 (CCR2) é um receptor de quimiocina expresso em monócitos e é responsável pelo recrutamento de monócitos mediado por seu ligante, o CCL2, para locais de infecção. Sabe-se ainda que o CCR2 medeia a imunidade contra o *Mtb*. Monócitos se diferenciam em macrófagos e células dendríticas após a infecção e são consideradas a população de células da imunidade inata mais predominante na infecção, sendo utilizadas como estratégia do hospedeiro para conter a replicação micobacteriana (SIA; RENGARAJAN, 2019).

As células NK (*natural killer*) desempenham papel central na eliminação dos patógenos intracelulares como o *Mtb*. Sua função é mediada pela citotoxicidade celular e pela variedade da produção de citocinas (TOPHAM; HEWITT, 2009). Na infecção pelo *Mtb*, as células NK possuem atividade citotóxica aumentada, produzindo IFN- γ e TNF, principalmente na presença de IL-12, expandindo ainda células Th1 antígeno específicas (ILD, 2011). Células NK ainda lisam monócitos infectados, macrófagos alveolares e células T reguladoras (Treg), induzindo a

proliferação dessas células e promovendo a produção de IFN- γ pelas células TCD8+ (GUPTA; KUMAR; AGRAWAL, 2018).

A imunidade anti *Mtb* é mediada especialmente pelos linfócitos TCD4+ e TCD8+ do tipo Th1. Sendo o principal papel na resposta ao *Mtb* desempenhado pelas células TCD4+ (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007). Geralmente, 20 dias são o suficiente para a produção de IFN- γ pelos linfócitos Th1 suficiente para se acumular no pulmão e cessar o crescimento micobacteriano. Entretanto, pacientes com mutação em genes de receptores do IFN- γ e da IL-12 e pacientes com AIDS, adoecem gravemente quando infectados, pois são incapazes de desencadear essas vias de inflamação, impedindo a formação do granuloma (ALGOOD; CHAN; FLYNN, 2003).

O escape do *Mtb* pode ocorrer em diversas situações de não contenção da infecção pelo granuloma. Antígenos desse patógeno secretados em vesículas apoptóticas, associados ao MHC classe I, estimulam células TCD8+ por meio de um fenômeno denominado de apresentação cruzada (WINAU et al., 2006). Uma vez ativados, esses linfócitos também produzem IFN- γ e liberam grânulos enzimáticos ricos em granulicina, que ativam outras enzimas capazes de degradar lipídios levando à lise celular por apoptose. Ainda não se sabe ao certo se a ação das células TCD8+ é apenas pela sua atividade citotóxica e produção de IFN- γ , ou pela combinação dessas e de outras funções ainda não estabelecidas. O que se sabe é que a função citotóxica dessas células é prejudicada na deficiência de células TCD4+, como em pacientes com AIDS (ILD, 2011).

A regulação da inflamação é um fator crítico que determina o resultado da infecção por *Mtb*. A inflamação excessiva prejudica a imunidade celular, danifica o tecido pulmonar e pode levar à cavitação pulmonar e transmissão aprimorada. Por outro lado, a inflamação diminuída pode prejudicar o controle bacteriano ao retardar a indução da imunidade inata e adaptativa. Embora o recrutamento e a atividade de neutrófilos durante a infecção possa contribuir na contenção da replicação bacteriana, pode também promover uma inflamação exacerbada (NOVIKOV et al., 2011).

A infecção inicial é dominada por uma resposta imune do tipo Th1, no entanto, se a infecção não é contida, uma mudança gradual em direção à resposta Th2 ocorre (ILD, 2011). Vários estudos tentam esclarecer os mecanismos imunológicos nas infecções por bactérias intracelulares, sendo que a produção de

citocinas por células Th2, como a IL-4 e a IL-10, pode refletir na incapacidade de combater essas bactérias. Estas e outras citocinas supressoras da atividade Th1 e de marcadores da atividade Th2, como as imunoglobulinas IgE e IgG4, são frequentemente encontradas na TB avançada (FERRAZ et al., 2006). Indivíduos que apresentam aumento da expressão de IL-10 podem manifestar ausência de resposta à vacinação com BCG (WEIR et al., 2004).

A resposta imune mediada por linfócitos T com liberação de citocinas, principalmente o IFN- γ e a liberação de TNF com consequente produção de NO são essenciais ao controle da TB latente na manutenção do granuloma, limitando assim a resposta inflamatória (ILD, 2011).

O balanço entre citocinas do tipo Th1, ditas como inibitórias do crescimento micobacteriano (IFN- γ , TNF- α), ou do tipo Th2, ditas como aceleradoras do crescimento do *Mtb* (IL-4, IL-10), pode ser importante na regulação da atividade micobactericida em macrófagos infectados (FERRAZ et al., 2006). Células alveolares de pacientes com TB pulmonar ativa expressam citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ), em um ambiente também dito como Th2, pela presença de mRNA de *IL-10* e *IL-4*. Não é o aumento de citocinas Th1, mas sim das citocinas Th2, que desempenha papel importante na progressão da TB (NOVIKOV et al., 2011). Em infecções por cepas de *Mtb* multidrogas resistente (MDR-*Mtb*), ocorre diminuição da expressão de IFN- γ , IL-2 e IL-10 e aumento de IL-4, IL-6 e TNF, sugerindo que a alteração nos efeitos patogênicos e protetores induzidos pela imunossupressão das respostas Th1 e Th2 são características destas cepas, corroborando a importância do balanço de citocinas na TB (ILD, 2011; SINGHANIA et al., 2018).

Entretanto, a resposta imune na TB não deve ser apenas interpretada somente com base num paradigma de regulação Th1-Th2. Células Treg possuem importante papel na regulação da resposta imune contra o *Mtb*, atuando na prevenção ou supressão da ativação de linfócitos autorreativos. As células Treg são linfócitos TCD4⁺ que expressam altos níveis de CD25 e de cadeia α de IL-2, uma citocina necessária para indução e autorregulação da resposta imune mediada por células T, além de regular a proliferação e função de células NK e B (CHEN et al., 2007). A proliferação de células Treg depende do fator de transcrição *foxhead box P3* (FOXP3), encontrado em altos níveis em pacientes com TB ativa (HOUGARDY et al., 2007).

O êxito na eliminação do *Mtb* depende da correta interação entre a resposta inata e a adquirida, em que participam inúmeras células e ampla rede de mediadores químicos. A variedade clínica e a localização pulmonar ou extrapulmonar da TB dependem da virulência do bacilo e do estado imunológico prévio do hospedeiro, que inclui o estado nutricional, enfermidades concomitantes, deficiências intrínsecas da resposta imunitária e fatores genéticos (ILD, 2011).

2.2 VITAMINA D

A vitamina D (VD) é um dos hormônios sintetizado pelas formas mais ancestrais de organismos, há mais de 750 milhões de anos. Fitoplanctons, zooplanctons e muitas formas de plantas e animais que são expostos à luz solar possuem a capacidade de sintetizá-lo. Fitoplânctons no oceano, como o *coccolitóforo* e a *Emiliana huxleyi*, fotossintetizam a VD há mais de 500 milhões de anos. Acredita-se que vertebrados primitivos no oceano absorviam cálcio em seus esqueletos por comerem plânctons ricos nesse hormônio (HOCHBERG; HOCHBERG, 2019).

A VD representa a nomenclatura de um grupo de hormônios secoesteroides solúveis em gordura e responsáveis por aumentar a absorção intestinal de cálcio, magnésio e fosfato, além de possuir diversos outros efeitos biológicos (HOLICK, 2004). Em humanos, os compostos mais importantes nesse grupo são a vitamina D₂ (VD₂) ou ergocalciferol e a vitamina D₃ (VD₃) ou colecalciferol (HOLICK, 2006).

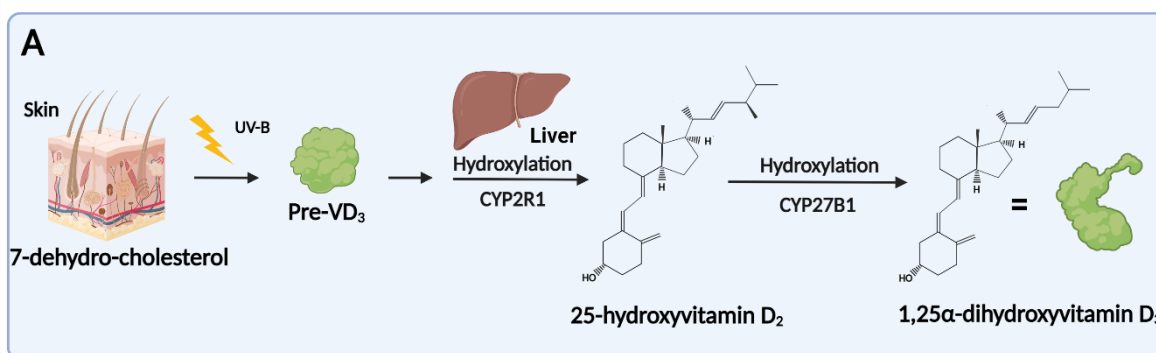


Figura 3: Metabolismo da VD₃. Nas células epidérmicas encontra-se a molécula 7-deidrocolesterol, que sofre uma quebra física pela radiação UVB do sol, formando a pré-VD₃. Esta sofre o primeiro processo de hidroxilação no fígado através da enzima CYP2R1, tendo como produto da reação a 25-hidroxivitamina D₂. Este é convertido em 1,25α-dihidroxivitamina D₃ através do segundo processo de hidroxilação pela enzima CYP27B1. Fonte: a autora 2022.

A principal fonte natural da VD é dependente do sol (HOLICK et al., 1980). Entretanto, tanto a VD₂ como a VD₃ podem ser ingeridas na dieta ou em suplementos (NORMAN, 2008b). Apenas alguns alimentos como peixes gordurosos, gemas de ovo, cogumelos shitake e fígado contêm, naturalmente, quantidades significativas de VD₂. Em alguns países, o leite de vaca e os leites e produtos derivados de plantas são fortificados com VD₂, assim como muitos cereais matinais (LEHMANN et al., 2015).

A produção de VD₃ a partir da pele é um processo fotoquímico. A molécula 7-deidrocolesterol, encontrada nas células epidérmicas em grandes quantidades, por meio de um processo físico de fotólise tem seu anel B quebrado pela radiação UV de espectro 290-315nm (UVB) liberada pelo sol, resultando como um dos produtos a pré-vitamina D₃, que sofre um processo termossensível espontâneo, mas não catalítico, de isomerização (Figura 3) (BIKLE, 2014).

A pré-VD₃ é carregada pelo sangue até o fígado, onde sofre um primeiro processo de hidroxilação no carbono 25 pela enzima 25-hidroxilase/citocromo oxidase de função mista P450 (CYP2R1), expressa por hepatócitos e armazenada no retículo endoplasmático dessas células, tendo como produto da reação a VD₂ ou 25-hidroxivitamina D (25OHD₂), forma circulante da VD, com tempo de meia-vida de 2 a 3 semanas (Figura 3). A VD₂ é liberada no plasma, onde se liga a um carreador chamado de proteína ligante à VD (VDBP, do inglês *vitamin D binding protein*), que a transporta para diversos tecidos do corpo (CHENG et al., 2004).

A VD₂ é convertida em VD₃ ou 1,25α-dihidrovitamina D (1,25(OH)₂D₃), estado ativo com tempo de meia vida de 4 a 6 horas. O segundo processo de hidroxilação ocorre no carbono 1 do anel A e é realizado pela enzima 1α-hidroxilase, produto do gene *CYP27A1* que é expresso em maiores quantidades nas células dos túbulos proximais dos rins, mas também pode ser expressa por outros tipos celulares como células do sistema imune (Figura 3) (ADAMS; HEWISON, 2010).

A VD₃ é a forma funcional e hormonalmente ativa da VD responsável pela maioria, senão todas, as ações biológicas desse hormônio. A 1α-hidroxilase renal, que metaboliza 25(OH)D₃ em 1,25(OH)₂D₃, compreende um citocromo P-450, uma ferredoxina e uma redutase de ferredoxina e está presente predominantemente no

rim (túbulos retos proximais) e contribui para as concentrações circulantes da VD_3 (Figura 3) (JONES; PROSSER; KAUFMANN, 2014, 2018).

Tanto a intensidade da UVB quanto o nível de pigmentação da pele, contribuem para a taxa de formação da VD_3 (HOLICK et al., 1980). Isso ocorre porque a melanina da pele bloqueia a radiação UVB de atingir a molécula de 7-deidrocolesterol, limitando a produção de VD_3 , assim como as roupas e o uso de protetor solar. A intensidade da UVB oriunda do sol varia de acordo com a localização geográfica, sendo fatores como latitude, distância da linha do equador, e estação do ano, limitantes à exposição solar suficiente para produção desse hormônio (BIKLE, 2014).

Quantidades adequadas de VD_3 podem ser produzidas com exposição moderada ao sol no rosto, braços e pernas, em média 5 a 30 minutos duas vezes por semana, ou aproximadamente 25% do tempo para queimaduras solares mínimas. Quanto maior a concentração de melanina na pele e mais fraca a incidência solar, mais minutos de exposição são necessários. A overdose de VD devido à exposição aos raios ultravioleta é impossível, isso por que a pele atinge um equilíbrio onde a VD_3 se degrada tão rápido quanto é criada (HOLICK, 2007).

A concentração sérica de VD_2 é o melhor indicador do status desse hormônio. Ela reflete a VD_2 produzida na pele e a obtida a partir de alimentos e suplementos e tem uma meia-vida de circulação bastante longa (JONES, 2008; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2020).

As recomendações sobre os níveis séricos recomendados de VD_2 variam entre as autoridades e com base em fatores como a idade (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2020). Uma revisão concluiu que os níveis séricos mais vantajosos para VD_2 para todos os desfechos pareciam estar próximos de 30 ng/mL (75 nmol/L), entretanto os níveis ideais de VD_2 ainda são controversos (BISCHOFF-FERRARI, 2014). Parte da controvérsia se deve ao fato de que vários estudos encontraram diferenças nos níveis séricos de VD_2 entre diferentes grupos étnicos, estudos apontam para razões genéticas e ambientais por trás dessas variações (ENGELMAN et al., 2008).

Com base em sua revisão dos dados das necessidades de VD, um comitê do *Institute of Medicine* concluiu que as pessoas correm o risco de deficiência de VD_2 quando apresentam concentrações séricas de <12 ng/mL (< 30 nmol/L). Alguns estão potencialmente em risco de inadequação em níveis que variam de

12–20 ng/mL (30–50 nmol/L). Praticamente todas as pessoas são suficientes em níveis ≥ 20 ng / mL (≥ 50 nmol/L); o mesmo comitê declarou que 20 ng/mL é o nível sérico de VD₂ que cobre as necessidades de 97,5% da população (MEDICINE, 2011).

A VD exerce inúmeros papéis no organismo, mas é mais popularmente conhecida por seu papel no metabolismo ósseo e na homeostase do cálcio. Esse hormônio promove a absorção de cálcio no intestino e mantém as concentrações séricas de cálcio e fosfato adequadas para permitir a mineralização normal do osso e prevenir a tetania hipocalcêmica. Também é necessária para o crescimento e remodelação óssea por osteoblastos e osteoclastos (CRANNEY et al., 2007).

A VD ainda exerce outras funções no corpo, incluindo modulação do crescimento celular, função neuromuscular e imunológica e redução da inflamação (BOUCHER, 2012; MEDICINE, 2011; NORMAN, 2008b). Muitos genes que codificam proteínas que regulam a proliferação, diferenciação e apoptose celulares são modulados em parte pela VD₃. Muitas células expressam o receptor da vitamina D, o VDR, e algumas a CYP27B1 podendo converter localmente a VD₂ na VD₃ (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2020).

Após a etapa final de conversão, a VD₃ é liberada na circulação. Ao se ligar à proteína de ligação à VD, é transportada por todo o corpo, incluindo os órgãos-alvo clássicos como intestinos, rins e ossos. A VD₃ é o ligante natural mais potente do VDR, e medeia a maioria das ações fisiológicas da VD (ADAMS; HEWISON, 2010; NORMAN, 2008a).

2.2.1 Receptor da Vitamina D (VDR)

A VD₃ exerce suas funções pela ligação ao VDR. O VDR é membro da superfamília de receptores de hormônios esteroides, que incluem receptores para ácido retinóico, hormônio da tireoide, hormônios sexuais e esteroides adrenais (MARGOLIS; CHRISTAKOS, 2010; WANG; ZHU; DELUCA, 2012).

O gene VDR, que codifica este receptor é evolutivamente conservado entre peixes, pássaros e mamíferos (Haussler et al. 2013). O VDR em humanos está localizado no cromossomo 12 (12q13.11) e é composto por oito exons codificantes (2-9), seis exons não codificantes (1^a-1f) que apresentam splicing alternativo, além

de oito íntrons. O gene apresenta ainda duas regiões promotoras (Zella et al. 2006). Sendo uso de promotor específico de tecido sugerido (Zella et al. 2010) (Figura 4).

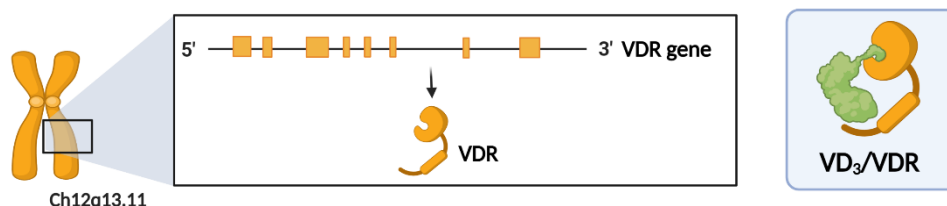


Figura 4: Localização cromossômica do gene VDR. A VD₃ desempenha suas funções por meio da ligação ao VDR, formando o complexo VD₃/VDR. Fonte: a autora 2022.

O VDR em humanos contém 427 aminoácidos e funciona como um heterodímero obrigatório com o receptor do ácido retinóico (RXR) para ativação de genes alvo da VD₃ (Figura 5) (HAUSSLER et al., 2013; PIKE; MEYER, 2010). Os dois domínios funcionais principais do VDR são o domínio de ligação ao DNA do terminal NH₂ (DBD) altamente conservado e o domínio de ligação ao ligante do terminal COOH mais variável (LBD) (Figura 5).

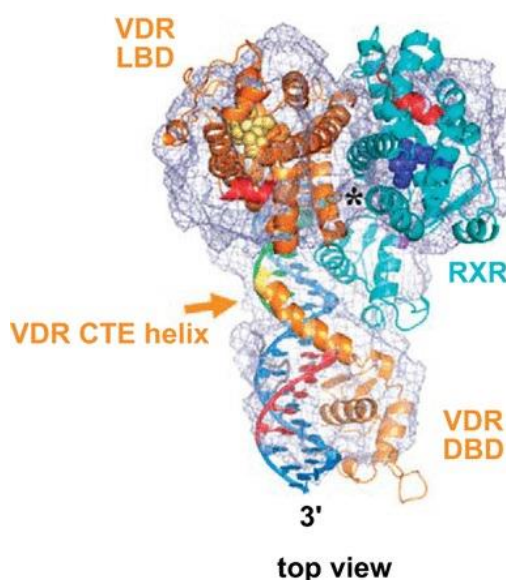


Figura 5: Estrutura do complexo heterodimérico do receptor nuclear RXR/VDR humano completo com seu DNA alvo. A estrutura do complexo RXR/VDR foi determinada por crio-EM de partícula única e reconstrução 3D. Representação do mapa crio-EM com a estrutura cristalina ajustada dos LBDs e DBDs, RXR e VDR individuais, resultando em um modelo molecular do complexo RXR/VDR/DNA completo (vista superior do complexo). Foi sugerido que a extensão do terminal carboxi (CTE) do DBD de VDR que se estende para a região de dobradiça tem um papel crítico

para a atividade transcricional do VDR. O contato da interface LBD que compreende a hélice 4, o loop 8/9 de VDR e a hélice H7 de RXR está marcado com uma estrela.

Fonte:(CHRISTAKOS et al., 2016).

O DBD é uma região de dedo de zinco rica em cisteína. Existem dois dedos de zinco, cada um dos quais contém um único átomo de zinco em um arranjo tetraédrico com quatro resíduos de cisteína invariantes (PIKE; MEYER, 2010). O LBD é composto por pelo menos 12 hélices α [H1-H12; a função de ativação dependente de ligante (AF2) corresponde a H12] e 3 folhas β (S1-3). A ligação VD_3 induz uma mudança conformacional que facilita a interação com o RXR e complexos co-reguladores necessários para a transcrição de genes alvo (CHRISTAKOS et al., 2016) (Figura 5).

Embora outras interfaces de coativadores no LBD de VDR tenham sido identificadas, o reposicionamento de H12 após a ligação da VD_3 foi relatado como crítico para o recrutamento de proteínas coativadoras. O DBD e o LBD são conectados por uma região de dobradiça. A estrutura do complexo VDR/RXR/DNA ligante foi caracterizada usando microscopia crioelétrica (Figura 5).

Muitos genes podem ser diretamente regulados por meio da ativação do VDR, seja positivamente como o *CYP24A1*, ou negativamente como o hormônio da paratireoide (PTH) e a *CYP27B1* (KIM et al., 2007). Assim, o VDR desempenha um papel central nas ações biológicas da VD_3 (WANG; ZHU; DELUCA, 2012).

O mecanismo de ação da VD_3 é mediado pelo VDR, que atua como fator de transcrição nas células-alvo após formar um heterodímero com os RXR α e RXR β . Uma vez dimerizado, o complexo liga-se ao elemento de resposta à VD (VDRE, do inglês *vitamin D response element*), localizado nas regiões promotoras dos genes alvo ou em locais distantes, para regular positiva ou negativamente sua expressão (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018) (Figura 6). Como o VDR foi encontrado em praticamente todos os tipos de células, ele pode explicar suas múltiplas ações em diferentes tecidos (WANG; ZHU; DELUCA, 2012).

Além da VD_3 , o heterodímero VDR-RXR pode se associar a outras moléculas como a família de coativadores p160 dos coativadores de receptor de esteroide 1, 2 e 3, que têm atividade de histona acetilase (HAT), e são coativadores primários que se ligam ao domínio AF2 do complexo do VDR (CHRISTAKOS et al., 2016) (Figura 6). Membros da família p160 recrutam proteínas coativadoras secundárias,

como CBP/p300, que também possuem atividade HAT, resultando em um complexo de múltiplas subunidades que modificam a cromatina e desestabilizam a interação histona/DNA (PIKE et al., 2016). A modificação das histonas pode ocorrer não apenas por acetilação, mas também por metilação (CHRISTAKOS et al., 2016).

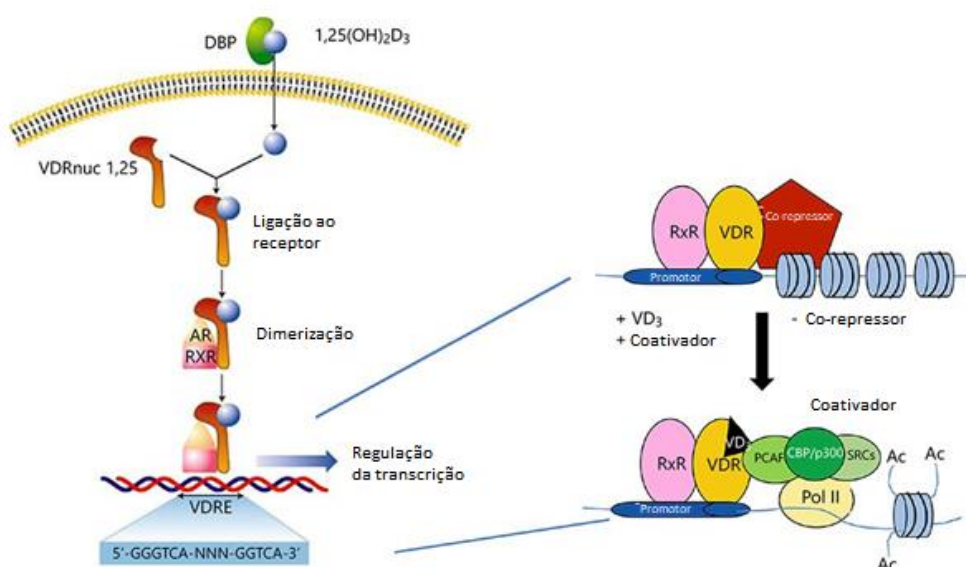


Figura 6: Complexo transcrricional VD₃/VDR.

Fonte: (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018).

O complexo VD₃/VDR/RXR interage com os fatores de transcrição basais como o fator de transcrição IIB (TFIIB) e vários fatores associados à proteína de ligação a TATAbox no DNA. A transcrição mediada por VDR é facilitada pelo mediador, um complexo multiproteico que funciona por meio do recrutamento da RNA polimerase II e promove a formação do complexo de pré-iniciação da transcrição (Figura 6) (YIN; WANG, 2014).

O resultado das interações genômicas do VDR é a regulação da transcrição de múltiplos genes, em muitos casos longe do local *cis* de ligação do VDR. No entanto, em alguns casos, o VDR pode ainda exercer uma ação reguladora na ausência da VD₃ (Figura 6) (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018).

Os princípios gerais da regulação gênica mediada pela VD₃ em células-alvo são: 1) os locais de ligação do VDR são cerca de 2.000–8.000pb; 2) a unidade de transcrição ativa é o heterodímero VDR/RXR; 3) a localização do sítio de ligação distal está dispersa em módulos *cis*-reguladores (potenciadores/intensificadores, do inglês *enhancers*) em todo o genoma; 4) a sequência do local de ligação

VDR/RXR (VDRE) é mediada por sequências hexaméricas clássicas de meio-sítio (AGGTCA) separados por 3 pares de bases e a repressão é mediada por locais divergentes; 5) o modo de ligação do DNA é predominantemente, mas não exclusivamente, dependente de VD₃; 6) os intensificadores contêm locais de ligação para múltiplos fatores de transcrição que facilitam a interação independente ou sinérgica; 7) as assinaturas de intensificadores epigenéticos são definidas pelas modificações pós-traducionais das histonas H3 e H4 dinamicamente reguladas e seletivamente reguladas por VD₃; 8) e os locais de ligação de VDR são altamente dinâmicos, pois mudam durante a diferenciação celular, maturação e ativação de doença e, portanto, têm efeitos consequentes na expressão gênica (DELUCA, 2016).

Além da regulação da transcrição de genes por meio da ligação da VD₃ ao seu sítio genômico (GP), o VDR também participa em respostas celulares rápidas por translocação, quando a VD₃ se liga ao sítio alternativo do VDR (AP), atuando pela transdução de sinal e ativando várias moléculas, esta resposta é rápida (45 minutos) em relação a resposta genômica (2 a 48 horas) (NORMAN, 2006).

Algumas mutações no VDR podem afetar gravemente sua funcionalidade, causando raquitismo resistente à VD, uma doença autossômica recessiva rara, também conhecida como raquitismo tipo II. Essas mutações modificam a ligação ao VDR, a localização nuclear do complexo VD₃/VDR, a ligação do VDR aos elementos *cis* ou a ligação do VDR a alguns coativadores (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018).

Alterações genéticas no VDR podem levar a importantes defeitos na ativação gênica, afetando o metabolismo do cálcio, proliferação celular e função imune, o que pode ser explicado por mudanças na conformação da proteína (Tabela 1) (VASILOVICI et al., 2018).

Tabela 1: Descrição dos principais SNPs do VDR. Fonte: A autora, 2022.

SNP	Identificação	Bases	Localização	Consequência	Referência
<i>Cdx2</i>	rs11568820	G>A	Éxon 1 Promotor	A troca G>A leva a uma proteína que interage mais fortemente com fatores de transcrição e consequente maior expressão dos genes alvo desse receptor	(SLATTERY et al., 2007)
<i>FokI</i>	rs2228570	C>T	Éxon 1	Gera um sítio de iniciação da tradução (ATG) anterior ao sítio correto, resultando em uma proteína 3 aminoácidos maior (427aa), quando normalmente a mesma possui 424 aa. Sabe-se que a proteína de 424aa interage melhor com o fator de transcrição TFIIB	(VAN ETEN et al., 2007)
<i>TaqI</i>	rs731236	T>C	Éxon 9 (3'UTR)	Por ser próximo ao limite éxon-íntron (GCTG/attg) pode influenciar o splicing e afetar a tradução do VDR	(NOSRATABADI et al., 2010)
<i>BsmI</i>	rs1544410	A>G	Íntron 8 (3'UTR)	Por se localizar na região 3'UTR pode influenciar na estabilidade do mRNA	(UITTERLINDEN et al., 2004)
<i>Apal</i>	rs7975232	A>C	Íntron 8 (3'UTR)	Pode afetar a tradução do VDR por se localizar no sítio de splicing	(Uitterlinden et al. 2004)

2.2.2 VD e Tuberculose

A exposição à luz solar é conhecida há mais de 100 anos por ajudar no tratamento da tuberculose, embora o primeiro indicador da VD com atividade antimicrobiana contra o *Mtb* tenha sido de estudos somente na década de 1980, onde estímulo com VD₃ em monócitos e macrófagos infectados com o bacilo reduziu a carga micobacteriana (COHEN et al., 1992; CROWLE; ROSS; MAY, 1987; HOLICK; CHEN, 2008; LIU; MODLIN, 2008).

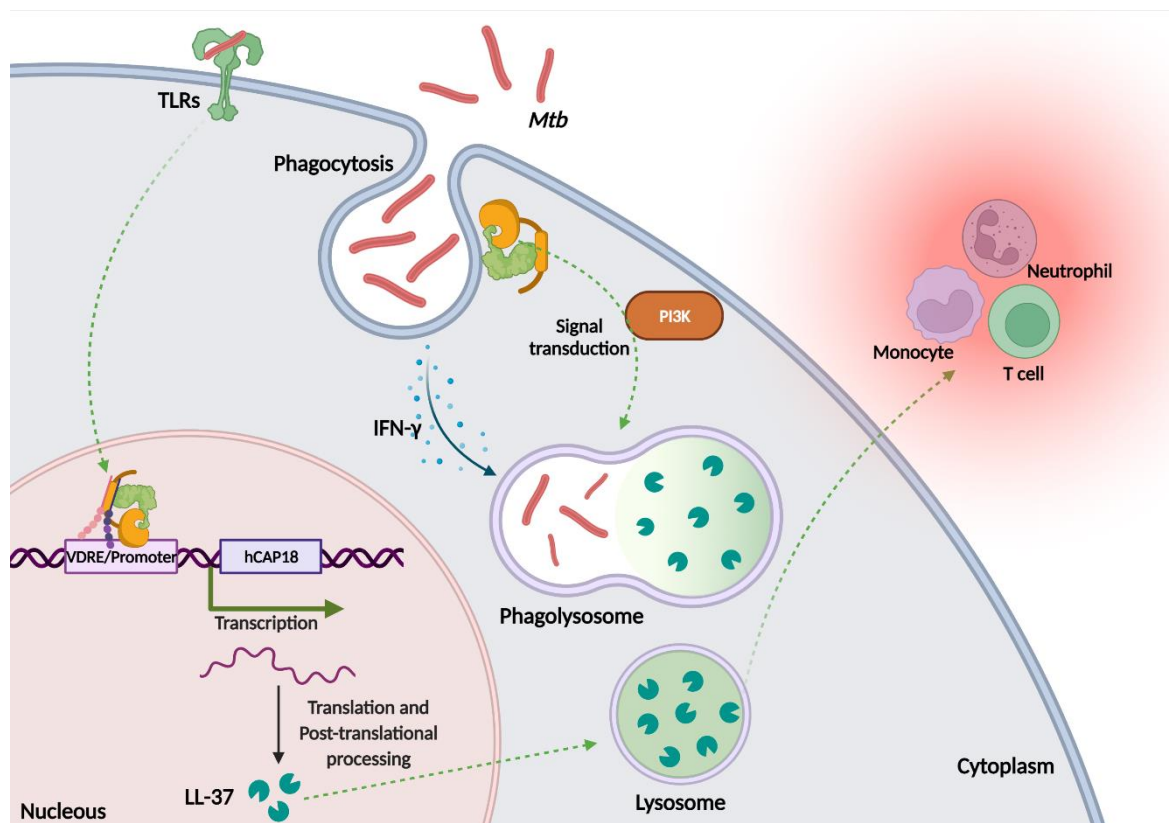


Figura 7: Mecanismo de ação da VD₃ frente a infecção pelo *Mtb*. O *Mtb* é fagocitado pelos macrófagos alveolares, é internalizado em fagócitos que se fundem ao lisossomo e formam o fagolisossomo via IFN-γ. Os bacilos permanecem no vacúolo citoplasmático e células imunes são recrutadas para manter a resposta inata. O *Mtb* pode ser reconhecido através dos TLRs e induz várias cascatas de sinalização intracelular. A presença de VD₃ afeta a infecção por *Mtb* por meio de dois mecanismos: recrutamento do complexo VD₃/VDR/RXR para o VDRE presente na região promotora do gene hCAP-18 e consequente produção de LL-37, ativação do fagolisossomo por via independente do IFN-γ. Fonte: a autora, 2022.

Pessoas com infecção pelo *Mtb* geralmente apresentam deficiência de VD₂ (DESAI et al., 2012). A VD₃ pode afetar a infecção pelo *Mtb* por diversos mecanismos de defesa imunológica, dentre eles está a produção do peptídeo antimicrobiano específico para o *Mtb*, a LL-37, por meio da ativação da expressão do gene da proteína antimicrobiana catiônica humana (*hCAP-18*), precursor desta catelecidina (Figura 7) (DINI; BIANCHI, 2012; SELVARAJ, 2011). Peptídeos antimicrobianos, como defensinas e catelecidinas, estão envolvidos como uma primeira linha de defesa na prevenção de infecções, incluindo a TB (RIVAS-SANTIAGO et al., 2008).

Embora as catelecidinas sejam amplamente distribuídas em mamíferos, LL-37 é o único membro da família das catelecidinas que foi identificado em humanos,

sendo encontrada em macrófagos alveolares, linfócitos, neutrófilos e células epiteliais (MARTINEAU et al., 2007; RIVAS-SANTIAGO et al., 2008). Além de ter atividade bactericida direta, a LL-37 também modula a resposta imune atraindo monócitos, células T e neutrófilos para o local de infecção (MARTINEAU et al., 2007). A presença de VD₃ em neutrófilos e macrófagos regula positivamente de maneira dose-dependente o gene *hCAP-18* por meio da ligação do complexo transcricional VD₃/VDR/RXR ao VDRE presente na região promotora deste gene (LIU et al., 2007).

VD₃ parece reduzir a viabilidade do *Mtb*, aumentando a fusão do fagossomo e lisossomo em macrófagos infectados (CHOCANO-BEDOYA; RONNENBERG, 2009). As vias usadas para promover a formação de fagolisossomos induzida por VD₃ são independentes da ativação clássica de macrófagos dependente de IFN- γ e envolvem produtos de fosfatidilinositol-3-quinases (PI3K), que ajudam a regular o transporte de endossomos para os lisossomos (Figura 7) (LIU et al., 2007). A ativação aumentada de TLRs pela VD₃ também resulta na produção de defensina-2 e catelecidinas (ADAMS et al., 2009). Além disso, a presença desse hormônio é essencial para a função antimicrobiana mediada por IFN- γ dos macrófagos (FABRI et al., 2011).

Outro papel relevante da VD₃ no controle da TB pode ser seu efeito modulador no fenótipo das células T, equilibrando as respostas Th1 e Th2 (LIN; FLYNN, 2010). Em geral, VD₃ funciona aumentando a resposta imune inata e inibindo a resposta adaptativa (TOPILSKI et al., 2004). Assim, uma resposta imune eficaz às vezes é aumentada na presença de VD₃, que equilibra a inflamação.

VD₃ aumenta a produção de β 2 defensina e de peptídeo antimicrobiano de catelecidina (CAMP) por macrófagos e queratinócitos derivados de monócitos aumentando sua atividade antimicrobiana (DAI et al., 2010; GOMBART; BORREGAARD; KOEFFLER, 2005). Além disso, esse hormônio aumenta a quimiotaxia, a autofagia e a fusão dos fagolisossomos das células imunes inatas (WHITE, 2010). VD₃ não só aumenta a expressão de CAMP em monócitos e macrófagos, mas também em outras células que participam da resposta inata na defesa da primeira barreira, como queratinócitos, trofoblastos epiteliais, intestinais, pulmonares e placentários (WEI; CHRISTAKOS, 2015).

A exposição de monócitos humanos a patógenos como o *Mtb* aumenta a expressão de *CYP27B1* e do próprio *VDR*, aumentando assim a capacidade da

célula de produzir VD_3 no local da infecção e de responder a esse hormônio de forma mais eficiente. No entanto, os monócitos se diferenciam em diferentes perfis de macrófagos que desempenham papéis diferentes na resposta imune (SASSI; TAMONE; D'AMELIO, 2018). Por exemplo, os macrófagos formados após a estimulação com IL-15 respondem ao estímulo com VD_3 aumentando sua atividade antimicrobiana, enquanto os macrófagos fagocitários obtidos após estímulo com IL-10 são fracamente influenciados pelos níveis de VD_3 , independentemente de sua alta atividade fagocitária (KIM et al., 2018).

A VD_3 aumenta a capacidade de defesa dos macrófagos induzindo sua diferenciação, capacidade fagocitária e atividade antimicrobiana, aumentando também a expressão de catelecidinas. Além disso, VD_3 inibe a proliferação de monócitos e promove a diferenciação de monócitos em macrófagos, esses efeitos são mediados pela regulação positiva dos receptores Fc da superfície celular e aumento na respiração celular. VD_3 inibe a proliferação e maturação das células dendríticas, bem como suas propriedades imunoestimulantes, levando à indução de células Treg. Consequentemente, a deficiência de VD_2 resulta em um estado menos tolerante a antígenos estranhos (CHRISTAKOS et al., 2016).

Alterações genéticas do gene *VDR* podem levar a defeitos na ativação do gene ou a alterações na estrutura proteica do *VDR*, podendo ambos afetar as funções celulares da VD_3 . Vários polimorfismos no *VDR* também podem estar ligados uns aos outros ou a genes não identificados que são determinantes importantes ao risco de desenvolver a doença (LEE et al., 2016).

Vários estudos examinaram os polimorfismos do *VDR* e sua associação com a suscetibilidade e características clínicas da TB em diferentes populações com achados inconclusivos (CHEN et al., 2013; LEWIS; BAKER; DAVEY SMITH, 2005; XU et al., 2015).

2.3.17β-ESTRADIOL

Os estrogênios (E) são hormônios endógenos com inúmeras ações fisiológicas (COELINGH BENNINK, 2004). O termo “estrogênios” refere-se a um grupo de hormônios femininos, incluindo estrona (E_1), estradiol ou 17β-estradiol (E_2), estriol (E_3) e estretrol (E_4) (Figura 10). Quimicamente, os estrogênios pertencem à família dos compostos orgânicos conhecidos como esteroides.

Sua estrutura central é composta por 17 ligações carbono-carbono dispostas como quatro anéis fundidos (três anéis ciclohexano e um anel ciclopentano) (FUENTES; SILVEYRA, 2019). Todos os quatro estrogênios contêm 18 carbonos ($C_{18}H_{24}O_2$) e são conhecidos coletivamente como esteroides C18 (PATEL et al., 2018). Eles consistem em um anel benzênico, um grupo hidroxila fenólico e um grupo cetona (E_1), ou um (E_2), dois (E_3) ou três (E_4) grupos hidroxila (Figura 8) (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

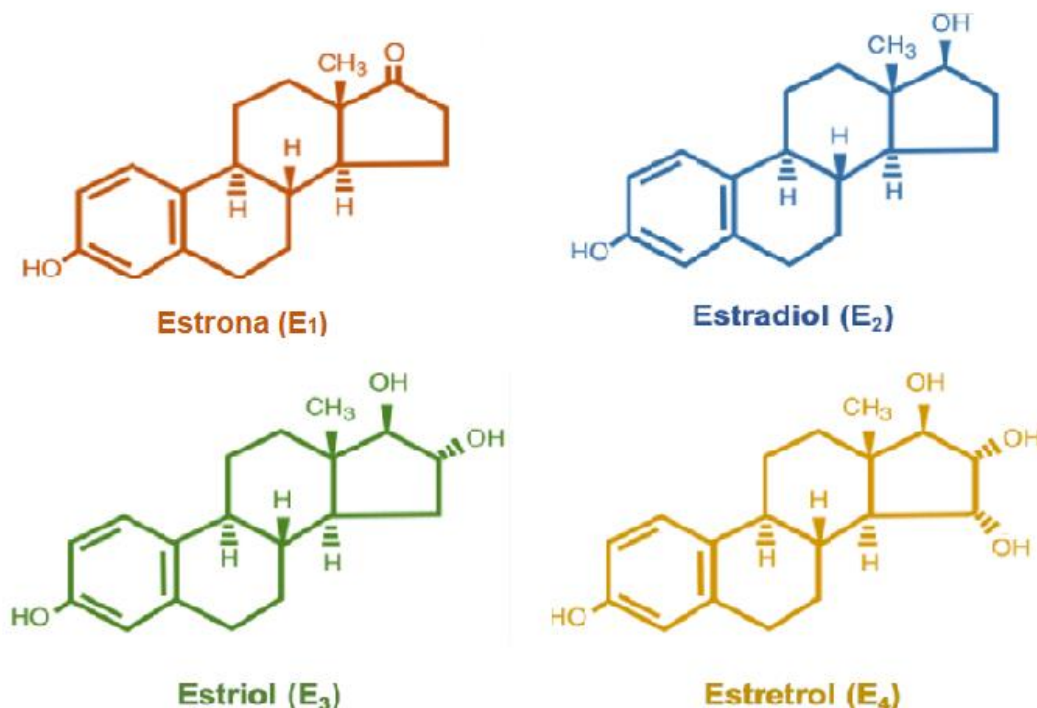


Figura 8: Estrutura química dos estrogênios endógenos.

Fonte: Traduzido de (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

Os estrogênios são sintetizados principalmente nos ovários, mas também nas glândulas suprarrenais e no tecido adiposo (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015). Eles foram descobertos no início dos anos 1900, quando extratos ovarianos (*"liquor folliculi"*) de bovinos e suínos foram injetados em roedores e considerados eficazes na indução da atividade sexual ou "estro" (ALLEN, 1983). Posteriormente, foi determinado que o hormônio era produzido por folículos ovarianos maduros e que provavelmente era comum a todas as fêmeas. O termo estrogênio deriva das palavras gregas *oistros* (frenesi, no cio) e *gennan* (produzir) (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

Todos os quatro estrogênios são capazes de se ligar aos receptores de estrogênio (ER) nuclear e de membrana, com diferentes afinidades e respostas (WATSON; JENG; KOCHUKOV, 2008). A palavra estrogênio é comumente usada para se referir ao estradiol ou 17 β -estradiol ou E₂, devido à sua relevância fisiológica e predominância durante os anos reprodutivos. Enquanto as mulheres produzem todos os estrogênios ao longo da vida, os hormônios 16-hidroxiestradiol (estriol) e 15 α -hidroxiestriol (estretol) são encontrados predominantemente durante a gravidez, e a estrona é geralmente encontrada em níveis mais elevados durante a menopausa (SAMAVAT; KURZER, 2015).

O E₂, estrogênio circulante predominante em humanos, é secretado principalmente pelas células da granulosa dos folículos ovarianos e pelos corpos lúteos. Por outro lado, o estretol é sintetizado exclusivamente pelo fígado fetal e atinge a circulação materna por meio da placenta (COELINGH BENNINK et al., 2008; HOLINKA; DICZFALUSY; COELINGH BENNINK, 2008). A estrona, que é produzida pela aromatização da androstenediona em tecidos extraglandulares, pode ser transformada reversivelmente em estradiol pela enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase em tecidos periféricos (BULUN et al., 1999).

O principal substrato para a biossíntese de hormônios esteroides é o colesterol, especificamente colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (CARR; MACDONALD; SIMPSON, 1982). Por meio de um processo denominado esteroidogênese, o colesterol é convertido em hormônios esteroides de 21 carbonos (pregnanos, progestogênios), 19 carbonos (androstanos) e 18 carbonos (estranos) nas gônadas, córtex adrenal e tecido adiposo. O principal local de síntese de estrogênio são os ovários e, especificamente, as células da granulosa (MILLER, 2017).

Em mulheres na puberdade e na pré-menopausa, o estrogênio é sintetizado nos ovários, mas também pode ser produzido no fígado e no tecido adiposo, usando o colesterol como precursor e regulando vários processos fisiológicos, como crescimento, reprodução, desenvolvimento e diferenciação celular (FAN et al., 2019; FUENTES; SILVEYRA, 2019). Em mulheres na pós-menopausa e em homens, a síntese de E₂ ocorre através da conversão do hormônio sexual masculino, testosterona e androstenediona, a partir da estrona sob a ação da enzima conversora de aromatase do citocromo, a P450 (ÖSTERLUND; HURD, 2001; SACZKO et al., 2017).

Além dos efeitos do E₂ nas células normais e na fisiologia normal, o estrogênio também desempenha um papel importante em vários processos patológicos, como câncer, doenças metabólicas e inflamação (PÉREZ-CREMADES et al., 2018). Todas as funções fisiológicas desempenhadas por esse hormônio são mediadas por ERs (MOULTON, 2018).

2.3.1 Receptores do estrógeno

Em 1958, Elwood Jensen descobriu o ER, o primeiro receptor encontrado para qualquer hormônio, ao mostrar que os tecidos reprodutivos femininos eram capazes de captar estrógeno da circulação ligando-se a proteínas. Mais tarde, ele demonstrou que os receptores ligados a esse hormônio eram capazes de migrar para o núcleo, onde poderiam estimular a transcrição gênica (JENSEN et al., 1967, 1968).

Mais recentemente, um novo tipo de proteína de ligação ao estrogênio foi descoberto nas células-alvo: o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1), ou receptor de estrogênio de membrana. Ao contrário dos receptores de estrogênio nuclear ER α e ER β , que foram isolados por abordagens bioquímicas tradicionais, o GPER1 foi identificado por métodos de clonagem molecular (FILARDO; THOMAS, 2012).

Os subtipos ER α e ER β realizam ações de longo prazo ou rápidas, atuando por meio de vias clássicas ou não clássicas, sendo receptores de atuação genômicas (nuclear) ou não genômicas (extranuclear), respectivamente, nos quais controlam mecanismos de expressão gênica, modificação de proteínas e sinalização celular (MOULTON, 2018; TRENTI et al., 2018). ER α são encontrados principalmente nos tecidos reprodutivos (útero, ovário), mama, tecido adiposo e fígado, enquanto ER β é encontrado no ovário, sistema cardiorrespiratório e sistema imunológico (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015).

Os mecanismos clássicos ou genômicos são mediados pelas isoformas ER α e ER β com similaridade de 56% e por meio da formação de conjuntos de homo ou heterodímeros (α - α , β - β , α - β) antes de se ligarem aos elementos de resposta ao estrogênio (EREs) para modular a expressão de diversos genes (MOULTON, 2018). Os genes que codificam ER α e ER β são *ESR1* e *ESR2*, estando localizados

nos cromossomos 6q25.1 e 14q23.2, respectivamente (FUENTES; SILVEYRA, 2019; MOULTON, 2018).

O tamanho total do ER α é de 595 aminoácidos e 67 kDa. ER β tem 530 aminoácidos de comprimento e 59 kDa. A principal diferença entre as duas proteínas é que ER β tem um domínio amino terminal mais curto do que ER α (Figura 9) (FUENTES; SILVEYRA, 2019; MOULTON, 2018).

ER α e ER β são compostas por vários domínios funcionais e têm várias regiões estruturais em comum (SCHWABE; TEICHMANN, 2004). Os principais domínios funcionais são denominados A/B, C, D e E/F e estão presentes em ambas as estruturas dos receptores (Figura 9).

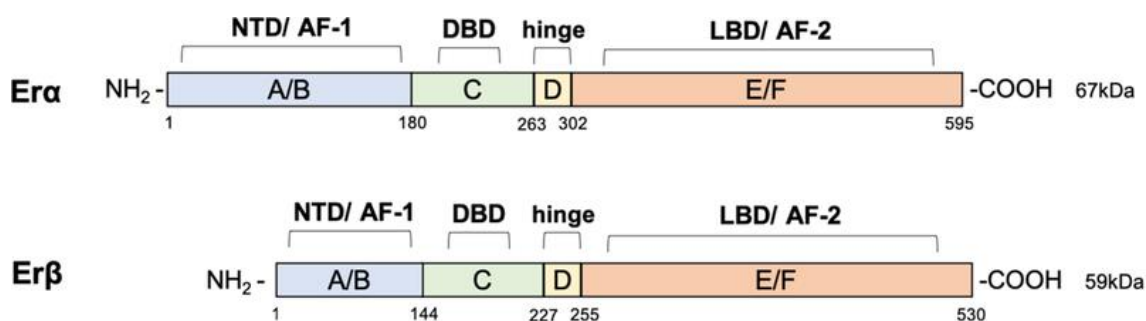


Figura 9: Organização estrutural dos receptores de estrogênio. Os domínios estruturais do ER α (595aa) e ER β (530aa) são marcados de A-F. Ambos os receptores têm 6 domínios estruturais e funcionais diferentes divididas em quatro domínios funcionais: domínio amino-terminal (domínios A e B ou NTD) com domínio de função ligante 1 (AF-1); um domínio de ligação ao DNA (domínio C ou DBD) que contribui para a dimerização do ER e para a ligação a sequências específicas de EREs e ativação do domínio ligante 2 (AF-2); um domínio D que é uma região que contém o sinal de localização nuclear e quando se liga ao estrogênio permite que os complexos de ligação do receptor realizem a translocação para o núcleo; e o domínio E / F com o terminal carboxi contém a área de conexão de estrogênio juntamente com outros coativadores.

Fonte: (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

Devido às diferenças nos eventos celulares e moleculares que levam à regulação da expressão gênica, na qual os complexos estrogênio-receptor podem se ligar direta ou indiretamente ao DNA, os eventos de sinalização mediados por estrogênio podem ser divididos em genômicos e não genômicos (Figura 10) (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

A sinalização genômica direta é conhecida como o mecanismo clássico de sinalização do E₂. Nesse processo, ER α e ER β atuam como fatores de transcrição ativados por ligante. Após a ligação do E₂ ao ER α ou ER β no citoplasma, ocorre

uma mudança conformacional induzindo a dimerização do receptor. Este complexo é então translocado para o núcleo, onde se liga à cromatina em sequências ERE, regiões potenciadoras dentro ou perto de promotores e/ou regiões 3'UTR não traduzidas de genes alvo caracterizado pela sequência específica do DNA – CAGGTCA (Figura 10) (LE DILY; BEATO, 2018).

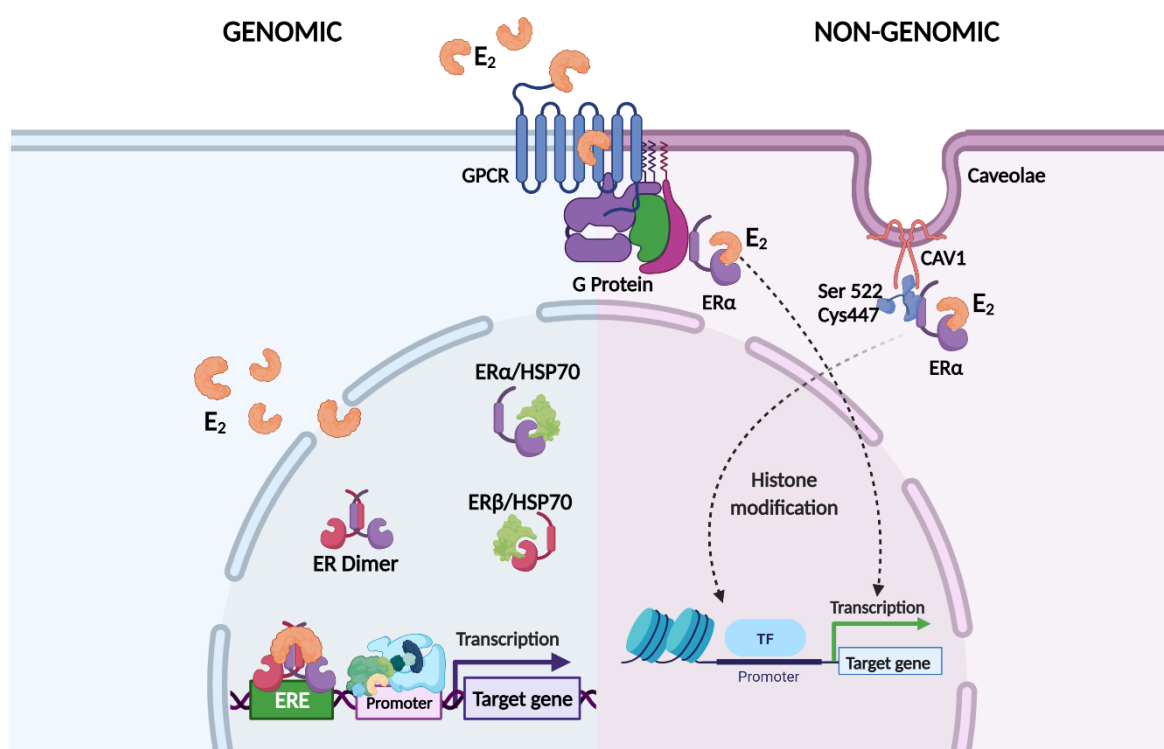


Figura 10: Mecanismo genômico e não genômico de atuação do E₂. Na sinalização genômica, E₂ se liga aos receptores ERα e ERβ no citoplasma, que sofrem uma mudança conformacional, dimerizam e são translocados para o núcleo. ERα e ERβ atuam como fatores de transcrição, e o complexo E₂/ER liga-se a sequências de ERE próximas à região promotora, induzindo a transcrição. Na sinalização não genômica, os receptores da membrana plasmática ativam PI3K/AKT. A subunidade ERα se liga à Cys447 e também se liga à caveola através de Ser522, induzindo atividade transcricional devido à modificação de histonas. E₂ também possui uma ligação com GPCRs que interage com o complexo E₂/ER e induz a ativação transcricional. Fonte: a autora, 2022.

A transcrição de vários genes que não contêm EREs em suas regiões promotoras também pode ser regulada pelo E₂, sem necessidade da ligação direta dos ERs ao DNA. De fato, cerca de 35% dos genes alvos do E₂ não possuem as sequências ERE completas, podendo possuir apenas parte da sequência (VRTAČNIK et al., 2014). Nestes, os mecanismos pelos quais o E₂ afeta a

expressão gênica são coletivamente conhecidos como "sinalização genômica indireta" ou "conversa cruzada transcricional" e são baseados na ativação da expressão gênica por ERs que não se ligam diretamente ao DNA. Em vez disso, esses receptores atuam por meio de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição e elementos de resposta. Desta forma, a sinalização indireta do E₂ influencia na ativação ou supressão da expressão dos genes alvo (Figura 10) (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

Os ERs no mecanismo não genômico promovem respostas mais rápidas (em minutos) através de receptores na membrana plasmática e são frequentemente associados à ativação de cascatas de proteína-quinase, como fosfoinosítideo 3-quinase com proteína quinase B (PI3K/AKT), intracelular mobilização de cálcio, geração de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), modulação da corrente de potássio, ativação da fosfolipase C e produção de NO (Figura 10) (TRENTI et al., 2018).

O mecanismo não clássico, também conhecido como sinalização por esteroide iniciada por membrana (MISS), é mediado por uma subunidade de ER α associada a um sítio palmitoilado (Cys 447 em humanos) com a porção citosólica da membrana plasmática. Na membrana, o ER α está conectado à caveola por conexão direta com a caveolina-1 (CAV-1) através de Ser 522, realizando atividade transcricional uma vez que MISS leva à modificação da histona e estrutura da cromatina (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005; PÉREZ-CREMADES et al., 2018).

2.3.2 E₂ e Tuberculose

A TB é um dos modelos mais estudados de dimorfismo sexual nas infecções do trato respiratório. Embora a prevalência da TB em homens dependa da região geográfica, há uma tendência geral para a proporção homem/mulher afetando mais homens com pior evolução nos países em desenvolvimento, incluindo um maior risco de mortalidade (NHAMOYEBONDE; LESLIE, 2014; NNADI et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Essa prevalência de gênero masculino também é observada quando combinados outros fatores de risco, como infecção pelo HIV, diabetes mellitus e tabagismo (CABRERA-GAYTÁN et al., 2016; KHAN et al., 2015; PIMPIN et al., 2011).

Foi relatado que homens não vacinados com a BCG exibem uma resposta de IFN- γ mais forte no teste tuberculínico de proteína purificada derivada (PPD, do inglês *Purified Protein Derivate*) do que as mulheres, o que sugere que os homens exibem uma resposta imune mais forte que pode estar associada a um processo inflamatório descontrolado e um mau prognóstico durante a infecção por *Mtb* (CABRERA-GAYTÁN et al., 2016).

Durante a infecção por TB, há também uma resposta imune diferencial caracterizada por mulheres que apresentam níveis mais elevados do C-X-C motivo de ligação à quimiocina 9 (do inglês *C-X-C Motif Chemokine Ligand 9 - CXCL9*) enquanto que homens exibem níveis mais elevados do fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B (PDGFB), da proteína C reativa (PCR) sérica e de anticorpos específicos contra o *Mtb*, destacando uma resposta imune inata e humoral mais forte em homens (BROWN et al., 2016; CHAVEZ et al., 2016).

Além disso, os níveis plasmáticos dos medicamentos anti*Mtb*, isoniazida e pirazinamida são mais baixos em homens adultos do que em mulheres. Isso pode estar relacionado ao um pior resultado nos homens tratados (RAMACHANDRAN et al., 2017). Curiosamente, essa maior proporção de homens afetados não é observada em crianças, sugerindo a participação dos hormônios sexuais na patogênese da TB (NEYROLLES; QUINTANA-MURCI, 2009; STIVAL et al., 2014).

Além disso, foi relatado que mulheres idosas com níveis reduzidos de E₂ (mulheres na pós-menopausa) têm um risco aumentado de infecções pulmonares crônicas produzidas por *Mycobacterium* (CHAN; ISEMAN, 2010). Também foi relatada a diminuição dos níveis de dehidroepiandrosterona (DHEA), um intermediário endógeno na conversão de colesterol em estrogênios e androgênios, associada com a infecção com o *M. avium*, uma infecção pulmonar micobacteriana não tuberculosa (DANLEY et al., 2014). Esses estudos sugerem que as infecções não tuberculosas por *Mycobacterium* também são influenciadas por hormônios, o que, por sua vez, explica o dimorfismo sexual nas infecções gerais por *Mycobacterium* no trato respiratório (VÁZQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2018).

A TB miliar ou TB disseminada é um tipo incomum e grave de infecção extrapulmonar por *Mtb*. Esta doença pode levar a resultados catastróficos, como insuficiência adrenal, hepática e pancreática, meningite e esplenomegalia. Com uma alta taxa de mortalidade (15%-20% em crianças e 25%-30% em adultos), sua incidência é difícil de registrar devido à alta subnotificação (ROSENTHAL;

ROTHFIELD; CHAMORRO DAUER, 2019). Por outro lado, pacientes com suscetibilidade genética, imunodeficiência, desnutrição, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), tabagismo e etilismo são mais suscetíveis a essa manifestação clínica. Entre os poucos relatos de casos em pacientes imunocompetentes, a maior frequência é em adolescentes saudáveis (HILAL; HURLEY; MCCORMICK, 2014; ROSENTHAL; ROTHFIELD; CHAMORRO DAUER, 2019). Propõe-se que indivíduos na puberdade tenham maior risco de TB disseminada devido a alterações hormonais que proporcionariam um ambiente de fácil colonização e disseminação do *Mtb* (WILCOX; LAUFER, 1994).

Estudos *in vitro* mostraram que o E₂ é capaz de induzir uma resposta imune pró-inflamatória mediada por Th1 (AHMED et al., 1999), enquanto a testosterona agiria inibindo a resposta imune. Em um estudo com animais, verificou-se que camundongos castrados, que apresentam baixos níveis de andrógenos e testosterona, tiveram um desfecho clínico menos prejudicial do que camundongos não castrados (BINI et al., 2014), o que corrobora os potenciais efeitos imunossupressores dos hormônios andrógenos na TB.

Está bem estabelecido na literatura que as mulheres possuem um sistema imunológico mais eficiente no combate às infecções, e que os hormônios androgênicos, como o E₂, desempenham um papel importante na contenção da doença. Por outro lado, os mecanismos pelos quais esse hormônio realiza essas atividades e quais vias gênicas são ativadas por ele ainda não foram estabelecidos, necessitando de mais estudos.

3 ARTIGO 1 - PATHOGEN RECOGNITION PATHWAY GENE VARIANTS AND INFLAMMASOME SENSORS GENE EXPRESSION IN TUBERCULOSIS PATIENTS UNDER TREATMENT

Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema^{1,2}, Ariane Fernandes da Silva Santos^{1,2}, Sergio Crovella², Michelle Christiane da Silva Rabello³ and Jaqueline de Azevedo Silva^{1,2*}

- 1. Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;*
- 2. Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;*
- 3. Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/IAM), Recife, Pernambuco, Brasil.*

Artigo submetido na revista Gene (IF: 3.913 em 2022)

**Pathogen Recognition Pathway Gene Variants and Inflammasome sensors Gene
Expression in Tuberculosis Patients Under Treatment**

Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema^{1,2}, Ariane Fernandes da Silva Santos^{1,2}, Sergio Crovella², Michelle Christiane da Silva Rabello³ and Jaqueline de Azevedo Silva^{1,2*}

¹*Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana, Departamento de Genética,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;*

²*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brasil;*

³*Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/IAM), Recife, Pernambuco, Brasil.*

***Address correspondence to:**

PhD. Jaqueline de Azevêdo de Silva

ORCID: 0003-1660-7299

e-mail: jaqueline.azevedo@ufpe.br

Telephone/Fax 55 81 21268484

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife/Brazil

CEP 50760-901

ABSTRACT

Several epidemiological studies have suggested that genetic variations in genes encoding pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll Like Receptors (TLRs) and their signaling products, may influence the susceptibility, severity and outcome of tuberculosis (TB). After sensing pathogen, the cell responds producing an inflammatory response, in order to restrain pathogen's successful course of infection. Herein we assessed single nucleotide polymorphisms (SNP) and gene expression from pathogen recognition and inflammasome pathways in Brazilian TB patients. For genetic association analysis we included *MYD88* and *TLR4*, PRRs sensing proteins. Allele distribution for *MYD88* rs6853 (A>G) and *TLR4* rs7873784 (C>G) presented conserved among the tested samples with statistically differential distribution in TB patients *versus* controls. However, when testing according sample ethnicity origin (African or Caucasian-derived individuals) we identified that the rs6853 G/G genotype was associated with a lower susceptibility to TB in Caucasian population. Meanwhile, the rs7873784 G/G genotype was associated with a higher susceptibility in Afro-descendant ethnicity individuals. We also aimed to verify *MYD88* and the inflammasome genes *NLRP1* and *NLRC4* expression in order to connect to active TB and/or clinical aspects. We identified that inflammasome gene expression in TB patients under treatment display similar pattern as in controls, indicating that treatment did not influences upon NLRP1 inflammasome activation.

Key-words: Inflammasome; NLRP1; NLRC4; MyD88 and TLR4.

1. INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a worldly leading cause of death by a single pathogen, according to latest epidemiology status from World Health Organization (World Healthy Organization, 2021). The *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is primarily a lung pathogen however it can infect any other organ from the host. A striking feature of TB is that only about 5% to 15% of infected individuals will develop the active disease after months or a few years. Several factors influence upon this outcome such as immunity, coexisting diseases, age and the individual's genetic profile, as well as virulence of the bacteria (Pai et al., 2016).

Among innate immunity pattern recognition receptors (PRRs) able to recognize *Mtb* components, there are some members of the Toll-Like Receptors (TLRs) family that includes TLR 1-9 (Werling et al., 2009). The recognition of *Mtb* ligands by TLR2, TLR4, or TLR9 initiates the release of several inflammatory mediators, expression of adhesion molecules and subsequent recruitment of other cells to the site of infection (Ahmad, 2010). These coordinated responses are induced by a pathway dependent of the myeloid differentiation primary response protein (MyD88). The Myd88 signaling cascade activates the nuclear translocation of the *nuclear factor-kappa* β (NF- κ B) transcription factor and activated gene expression of several inflammatory genes such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF) and IL-6 cytokines (Akira et al., 2001), therefore, being crucial to restrain *Mtb* infection (Fremond et al., 2004). TLR4 has been identified as crucial for controlling the chronic stage of infection and was also associated with autophagy and formation of phagolysosome independently of MyD88 (Xu et al., 2007).

Another important pathway of host defense against *Mtb* is the inflammasome. Through the activation of caspase-1, it leads to the processing of the IL-1 family of the pro-inflammatory cytokines, into their bioactive forms, namely IL-1 β and IL-18. Several NOD-like receptors (NLRs) containing a pyrin domain (NALPs) may form different variants of the inflammasome, containing NLRP1, NLRP3 or NLRC4 (Sharma and Kanneganti, 2016).

An appropriate inflammatory response is crucial otherwise if uncontrolled, excessive or prolonged, may cause more problems than the pathogen infection itself. Several epidemiological studies indicated that genetic variations in genes encoding PRRs such as TLRs and their signaling products may influence the susceptibility, severity and tuberculosis' outcome (Basu and Fenton, 2004; Hossain and Norazmi, 2013; Kleinnijenhuis et al., 2011; Mayer-Barber et al., 2010; Singhania et al., 2018). Herein we assessed the single nucleotide polymorphisms (SNP) *MYD88* rs6853 (A> G) and *TLR4* rs7873784 (C> G) and whether their presence influenced upon active TB susceptibility in a Northeast Brazilian

population. We also compared the differential expression of *MYD88* and inflammasome genes *NLRP1* and *NLRC4* among patients with active TB and proper controls.

2. METHODS

2.1. Study population and design

The study group consisted of 144 patients with active TB from different 07 health care clinics and/or hospitals in the metropolitan area of Recife, Pernambuco, Brazil. All included cases presented laboratory and molecular confirmation of the disease. The control group consisted of 210 uninfected exposed individuals (symptomatic controls), with negative clinical and laboratory tests for TB. All individuals in this study signed the informed consent form (ICF).

2.2. Genetic association study

From patients and controls, were collected 4mL of peripheral blood in tube containing Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for extraction of genomic DNA using the Mini Salting-Out adapted method (Lahiri and Numberger, 1991). SNPs rs7873784 (G>C) from *TLR4* and rs6853 (A>G) from *MYD88* were previously selected as possible functional or quantitative alterations in the influence of infectious diseases. The rs7873784 SNP has a minimum allele frequency (MAF) of 0.26 in the Yoruba population and 0.16 in the Caucasian population. While rs6853, has MAF of 0.33 in the population of Yoruba and 0.11 in the Caucasian population. Genotyping was performed using specific TaqMan fluorogenic probes (Thermo Scientific) for each SNP, using the ABI 7500 platform and all reagents and disposables recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, USA).

The Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium of the study population was evaluated by using the Chi-Square Test (χ^2). The correlation of the SNPs with a differentiated susceptibility to the disease was assessed by using Fisher's Exact Test. The correlation of the SNPs with clinical and non-clinical characteristics was assessed by Logistic Regression and calculated in the SPSS program version 23. The software G*Power version 3.1.9.4 was used to assess the statistical power of the population's size to represent the studied SNPs.

2.3. Relative gene expression assay

RNA was extracted from blood samples using TRIzol[®] (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Synthesis of complementary DNA (cDNA) was carried out using the Oligo (dT) kit (Promega). The amount of total RNA input was standard for all samples - 500 ng/ μ l. The reference gene used for relative expression analysis was *Glucuronidase- β* (*GUSB*).

The expression of *MYD88* and *GUSB* was performed by using the SYBR Green reagent (Applied Biosystems, USA) using the following primers sequences for the *GUSB* (forward: CACTGTGGCTGTCACCAAGA; reverse: TCCGCATCCTCATGCTTGTT) and for the *MYD88* (forward: AGCGACTGATCCCCATCAAG; reverse: GGTGTAGTCGCAGACAGTGA). Whereas the *NLRP1* and *NLRC4* expression was assessed using TaqMan® probes with the identifications, Hs00248187_m1 e Hs00892666_m1, respectively. Expression was performed in the ABI 7500 real time PCR platform according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, USA).

All expression assays were performed in biological replicate and technical triplicates for each sample. The analysis of the expression data was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Shapiro-Wilk Test was used to evaluate the distribution of the population in gene expression data, meanwhile, the statistical significance was tested using Student's *t*-test, both analyses were performed through program R version 3.4.1. For all analyses we considered as statistically significant $p < 0.05$ in a 95% confidence interval (CI).

3. RESULTS

The Table 1 describe the social, epidemiological and demographic characteristics from TB patients and controls.

A total of 143 patients with tuberculosis and 210 controls were genotyped for the *MYD88* rs6853 A>G. However, due to the lack of homozygous variants genotypes (G/G) in our studied population the statistic association detected should be seen with caution, once the case group was out of H-W equilibrium, with values of $\chi^2 = 6.9910$ and p -value = 0.0082, as shown in Table 2. The G-Power's result of this population in the codominant model was 0.9008, demonstrating that the population's size is adequate.

The patients and controls also were genotyped for the *TLR4* rs7873784 C>G (Table 2). The results of the χ^2 test of patients and controls show that the populations are in the H-W equilibrium, with χ^2 values = 0.0841 and $p = 0.7718$ for the patients, and $\chi^2 = 0.0291$ and $p = 0.8646$, for the controls. The G-Power's result of this population in the codominant model was 0.3671, demonstrating that for this SNP the population's size might not be sufficient.

When assessing SNP frequencies, we observed that the rs6853 G/G genotype was associated with a lower susceptibility to TB in Caucasian population (OR: 0.18, 95% CI: 0.38-0.93, $p = 0.041$). Meanwhile, the rs7873784 G/G genotype was associated with a higher

susceptibility in Afro-descendant ethnicity individuals (OR: 6.42, 95% CI: 1.5-27.44, $p = 0.012$), 95% CI: 0.51-2.73, $p = 0.001$) (Table 3).

For gene expression analysis we randomly selected 30 samples from cases (TB) and 14 symptomatic controls (SC) to test differential expression of *MYD88*, *NLRP1* and *NLRC4*. The population were normally distributed according to Shapiro-Wilk Test. The results have no significant difference in expression of the *NLRP1* ($p = 0.865$), *NLRC4* ($p = 0.3589$) and *MYD88* ($p = 0.1296$) genes between TB cases and CS (Figure 1).

4. DISCUSSION

The G/G genotype of the rs6853 SNP in the *MYD88* gene was associated with a lower susceptibility to active TB, however, since we were not able to detect any G/G genotype in patient' population our analysis became limited and out of H-W equilibrium, which makes this result not conclusive. For more detailed and robust analysis, we suggest to increase the study population and with different ethnicity.

Nevertheless, the study conducted by Capparelli *et al.* (2013) testing the SNP rs6853 in a population enclosing Italian, Ukrainian and Romanian genetic background individuals reported an association of the A/G genotype, indicating less susceptibility to pulmonary TB. The authors also detected mild levels of IFN- γ , TNF and nitric oxide (NO) associated with rs6853-A/G, which may indicate a biological advantage, since the deficiency or exacerbated expression of these molecules favors TB infection (Capparelli *et al.*, 2013).

In contrast, in a population from Moldova, which is genetically close to the Romanian and Ukrainian, there was no association of either genotype of SNP rs6853 with pulmonary TB (Varzari *et al.*, 2019). In an Egyptian population, it was observed a higher frequency of the variant genotype (G/G) in patients with pulmonary TB than controls, which was associated with a higher risk of developing the disease (El-Hefnawy *et al.*, 2020). In addition, there is a lack of further studies of the influence of the SNP rs6853 in TB, mainly in the Brazilian population.

In our study, we included individuals with at least two phenotypic ethnic backgrounds (African and Caucasian-derived) and assessed genotype distribution in TB patients and controls according this feature. According to the Ensemble database, the frequencies of rs6853 SNP alleles in African population are 71% (A) and 29% (G), meanwhile, this frequency corresponds to 87% (A) and 13% (G) in European population (Hunt *et al.*, 2018).

For the rs7873784 SNP no significant association with TB was found. Our results are in agreement with Li *et al.* (2019), that found correlation with rs7873784 and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), but not with pulmonary TB, in a Chinese Han population (Li *et al.*, 2019). Although, we found an association between *MYD88* rs6853 G/G genotype with lower susceptibility to TB in Caucasian population and, the *TLR4* rs7873784 G/G genotype was also associated with higher susceptibility in Afro-descendant ethnicity individuals; due to the fact that the Brazilian population in general is very miscegenated, it is difficult to characterize based only on phenotype without the use of genetic markers. Thus, to affirm whether there is a real relationship between these genotypes and the differential susceptibility to TB in different ethnicities, a better genetic characterization of the population in relation to ancestry would be necessary.

An *in vitro* study using a human monocyte lineage reported a functionality of the rs7873784 SNP due to the minor allele (C) creating a binding site for the PU.1 transcription factor, which leads to an increase in *TLR4* transcription (Korneev *et al.*, 2020). As with *MYD88* rs6853 SNP, there are no further studies of *TLR4* rs7873784 in relation to TB in the Brazilian population.

When assessing *MYD88* and inflammasomes *NLRP1* and *NLRC4* gene expression, no difference in mRNA levels were detectable when comparing samples from TB patients and controls. It should be noted that *NLRP1* and *NLRC4* have not yet had their well-defined roles in the pathogenesis of TB, with no concrete data in the literature on the activation of these receptors by *Mtb*. However, it has already been shown that the depletion of *NLRC4* in macrophages impaired IL-1 β secretion in the face of stimulation of ESAT-6 proteins and AG85 of *Mtb*, which may indicate an involvement of this inflammasome in the production of IL-1 β during the course of infection (Mishra *et al.*, 2010).

Since all patients included in this study were under TB treatment these results suggests that inflammation may be controlled in those patients, with *MYD88*, inflammasome *NLRP1* and *NLRC4* levels similar as in controls. Once TB treatment is started it directly influences upon disease's clinical stage, which affects the expression levels not only of the tested genes but many others immune-related ones (Gebremicael *et al.* 2019).

5. CONCLUSIONS

Despite the known samples' limitations, this study may help to understand how the genetic variations may influence the pathogenesis and outcome of *Mtb* infection. Since TB still has alarming data in Brazil, studies in this population are shown to be important, and

may have an impact on the development of future groups of genetic markers of differential susceptibility, as well as new therapeutic strategies.

6. COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

6.1. Funding

This work was supported by the Foundation of Science and Technology Support of Pernambuco (FACEPE) under grant number APQ 0952-2.02/15.

6.2. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

6.3. Ethical approval

All procedures performed herein had no impact on medical treatment and the participation in the study was voluntary and in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards (National Ethical committee for research using human biological samples – PLATAFORMA BRASIL, under reference number: 3066.7014.5.0000.5208).

6.4. Informed consent

The informed consent form was signed by all study participants.

7. AUTHOR CONTRIBUTIONS

Maria Eduarda de Albuquerque Borborema (M.E.A.B.) and Jaqueline de Azevêdo Silva (J.A.S.) conceived and designed the study and wrote the manuscript. M.E.A.B. and Ariane Fernandes da Silva Santos (A.F.S.S.) performed the study and analysed the data. Michelle Christiane da Silva Rabello (M.C.S.R.) provided the patients and review the article. Sergio Crovella (S.C) provided part of the probes used. J.A.S revised and adjusted the written material. All authors approved the manuscript.

8. REFERENCES

Ahmad, S., 2010. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir. Res.* 11, 169. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-169>

- 269 Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate
270 and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675–680. <https://doi.org/10.1038/90609>
- 271 Basu, S., Fenton, M.J., 2004. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am. J.*
272 *Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 286, L887–L892.
273 <https://doi.org/10.1152/ajplung.00323.2003>
- 274 Capparelli, R., De Chiara, F., Di Matteo, A., Medaglia, C., Iannelli, D., 2013. The MyD88
275 rs6853 and TIRAP rs8177374 polymorphic sites are associated with resistance to
276 human pulmonary tuberculosis. *Genes Immun.* 14, 504–511.
277 <https://doi.org/10.1038/gene.2013.48>
- 278 El-Hefnawy, S.M., Mostafa, R.G., Kasemy, Z.A., Eid, H.A., Elgizawy, E.I., Omar, T.A., EL
279 Naidany, S.S., 2020. Association of TIRAP (rs8177374) and MyD88 (rs6853) genetic
280 polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis and treatment response.
281 *Gene Reports* 21, 100825. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100825>
- 282 Fremond, C.M., Yeremeev, V., Nicolle, D.M., Jacobs, M., Quesniaux, V.F., Ryffel, B.,
283 2004. Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response
284 in the absence of MyD88. *J. Clin. Invest.* 114, 1790–1799.
285 <https://doi.org/10.1172/JCI21027>
- 286 Hossain, M.M., Norazmi, M.-N., 2013. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in
287 Mycobacterium tuberculosis Infection—The Double-Edged Sword? *Biomed Res. Int.*
288 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/179174>
- 289 Hunt, S.E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Parton,
290 A., Armean, I.M., Trevanion, S.J., Flicek, P., Cunningham, F., 2018. Ensembl
291 variation resources. *Database* 2018. <https://doi.org/10.1093/database/bay119>
- 292 Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Van Crevel, R., 2011. Innate
293 Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 1–
294 12. <https://doi.org/10.1155/2011/405310>
- 295 Korneev, K. V., Sviriaeva, E.N., Mitkin, N.A., Gorbacheva, A.M., Uvarova, A.N.,
296 Ustiugova, A.S., Polanovsky, O.L., Kulakovskiy, I. V., Afanasyeva, M.A., Schwartz,
297 A.M., Kuprash, D. V., 2020. Minor C allele of the SNP rs7873784 associated with
298 rheumatoid arthritis and type-2 diabetes mellitus binds PU.1 and enhances TLR4
299 expression. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866, 165626.
300 <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165626>

- Lahiri, D.K., Numberger, J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444–5444. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>
- Li, Z., Mao, X., Liu, Q., Song, H., He, B., Shi, P., Zhang, Q., Li, X., Wang, J., 2019. Functional variations of the TLR4 gene in association with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary tuberculosis. *BMC Pulm. Med.* 19, 184. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0939-y>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mayer-Barber, K.D., Barber, D.L., Shenderov, K., White, S.D., Wilson, M.S., Cheever, A., Kugler, D., Hieny, S., Caspar, P., Núñez, G., Schlueter, D., Flavell, R.A., Sutterwala, F.S., Sher, A., 2010. Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 β Production Is Critical for Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. *J. Immunol.* 184, 3326–3330. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904189>
- Mishra, B.B., Moura-Alves, P., Sonawane, A., Hachohen, N., Griffiths, G., Moita, L.F., Anes, E., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell. Microbiol.* 12, 1046–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01450.x>
- Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M., 2016. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2, 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Sharma, D., Kanneganti, T.-D., 2016. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J. Cell Biol.* 213, 617–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>
- Singhania, A., Wilkinson, R.J., Rodrigue, M., Haldar, P., O’Garra, A., 2018. Transcriptomics in TB: the immune response and diagnosis. *Nat. Immunol.* 19, 1159. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0225-9>
- Varzari, A., Deyneko, I. V., Vladei, I., Grallert, H., Schieck, M., Tudor, E., Illig, T., 2019. Genetic variation in TLR pathway and the risk of pulmonary tuberculosis in a Moldavian population. *Infect. Genet. Evol.* 68, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.005>

- 334 Werling, D., Jann, O.C., Offord, V., Glass, E.J., Coffey, T.J., 2009. Variation matters: TLR
335 structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol.* 30, 124–130.
336 <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.001>
- 337 World Healthy Organization, 2021. Global Tuberculosis Report.
- 338 Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K.E., Eissa, N.T., 2007.
339 Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity.
340 *Immunity* 27, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.022>

Table 1: Demographic and clinical characteristics from TB patients and respiratory symptomatic controls.

<i>Characteristics</i>	<i>Patients n (%)</i>	<i>Controls n (%)</i>
Sex	143 (100%)	210 (100%)
Male	44 (31%)	70 (33%)
Female	35 (24%)	58 (28%)
Not informed	64 (45%)	82 (39%)
Ethnic group		
Black	22 (15%)	40 (19%)
Brown	17 (12%)	33 (16%)
White	15 (10%)	43 (20%)
Not informed	89 (62%)	94 (45%)
Smoking		
Yes	32 (22%)	33 (16%)
No	33 (23%)	64 (30%)
Not informed	78 (55%)	113 (54%)
Drug use		
Yes	36 (25%)	40 (19%)
No	29 (20%)	58 (28%)
Not informed	78 (55%)	112 (53%)
Site of infection		
Pulmonary	37 (26%)	-
Extrapulmonary	20 (14%)	-
Not informed	86 (60%)	-

Table 2: Allelic and genotypic distribution of SNPs in TB patients and symptomatic respiratory controls.

SNP ID	TB Patients	Controls	OR (95%CI)	p-value
rs6853 (A>G)	n= 143	n= 210		
Allele ^δ				
A	234 (0.818)	339 (0.807)	Ref.	
G	99 (0.182)	81 (0.193)	0.93 (0.62-1.39)	0.7698
Codominant ^δ				
AA	91 (0.636)	58 (0.652)	Ref.	
AG	52 (0.364)	79 (0.31)	1.19 (0.75-1.96)	0.4219
GG	0 (0.0)	24 (0.038)	0.00 (0.00-0.78)	0.02037*
rs7873784 (G>C)	n=143	N=210		
Allele ^δ				
G	241 (0.843)	340 (0.810)	Ref.	
C	45 (0.157)	80 (0.190)	0.79 (0.52-1.20)	0.2708
Codominant ^δ				
GG	102 (0.713)	138 (0.657)	Ref.	
GC	37 (0.259)	64 (0.305)	0.78 (0.47-1.29)	0.3361
CC	4 (0.028)	8 (0.038)	0.86 (0.18-3.50)	1

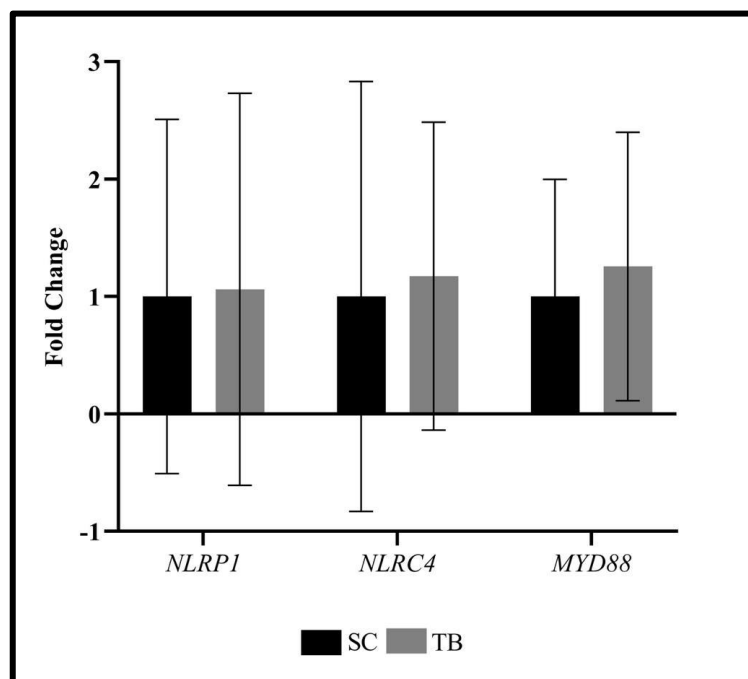
* $p < 0,05$: Statistically significant. δ : Power > 0.9. CI: Confidence interval. RR: Odds Ratio.

Table 3: Logistic regression analysis of the rs6853 (*MYD88*) and rs787384 (*TLR4*) SNPs and demographic and clinical characteristics.

MYD88				
Genotypes	G/G		A/G	
Variable	p-value	OR (CI 95%)	p-value	OR (CI 95%)
Ethnicity White	0.041	0.18 (0.38-0.93)	0.047	5.33 (1.07-26,61)
TLR4				
Genotypes	G/C			
Variable	p-value		OR (CI 95%)	
Ethnicity Brown	0.017		5.60 (1.35-23.14)	

$p < 0,05$: Statistically significant. CI: Confidence interval. RR: Odds Ratio.

Figure 1: Analysis of the expression of *NLRP1*, *NLRC4* and *MYD88* genes in individuals with active TB and symptomatic controls (SC).



4 ARTIGO 2 - GENE EXPRESSION PROFILE OF STEROID RECEPTORS AND THE ACTION OF THEIR LIGANDS IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* INFECTION (IN VITRO)

Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{1,2}, Thays Maria Costa de Lucena^{1,2}, Michelle Christiane da Silva Rabello³, Jaqueline de Azevêdo Silva^{1,2}

¹*Laboratory of Human Genetics and Molecular Biology, Genetics Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

²*Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

³*Laboratory of Immunoparasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil.*

Artigo submetido na revista *Frontiers in Immunology: Caveolins in Inflammation, Infections, and Disease Research Topic* (IF: 8.786)

**Article Title: Gene expression profile of steroid receptors and
the action of their ligands in *Mycobacterium tuberculosis*
infection (*in vitro*)**

**Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{1,2*}, Thays Maria Costa de Lucena^{1,2},
Michelle Christiane da Silva Rabello³, Jaqueline de Azevêdo Silva^{1,2}**

¹Laboratory of Human Genetics and Molecular Biology, Genetics Department, Federal
University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brazil

³Laboratory of Immunoparasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz
Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

***Corresponding Author:**

PhD. Jaqueline de Azevêdo Silva

Jaqueline.azevedo@ufpe.br

ORCID: 0000-0003-1660-7299

Running title: “*VD₃ and E₂ influences Tuberculosis*”

ABSTRACT

Although tuberculosis (TB) is an infectious disease, its pathology is multifactorial. Immunological, genetic and environmental factors influence the clinical outcome of the host. The immunomodulatory role attributed to steroid hormones, such as vitamin D₃ (VD₃) and 17 β -estradiol (E₂), highlighted the role of these hormones against *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) infection. Through the action of their respective receptors, these hormones are able to modulate a specific response against *Mtb*. Therefore, the aim of this work was to evaluate the expression profile of the *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1* and *ESR2* in *Mtb* infection. For this, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and plated in culture medium. Cells were treated with VD₃ or E₂ and infected by *H37Rv Mtb* or stimulated with lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. After 24h and 72h of infection the *Mtb* viability in macrophages test was performed, as well the extraction of total RNA for analysis of gene expression by RT-qPCR of the target genes. As result, VD₃ and E₂ were able to modulate gene expression of steroid receptors against *Mtb* infection. We observed that, regardless of hormone treatment, when cells were infected, the expression of *VDR* and *ESR2* was upregulated, indicating the important role of these receptors and their ligands in the response to *Mtb*. Finally, this work reinforces the evidence that steroid receptors play a central role in the host response against the *Mtb*.

Key-words: Tuberculosis; vitamin D₃; 17 β -estradiol; Vitamin D Receptor; Estrogen receptors and Retinoic acid receptors.

1 INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that mainly affects the lungs, but can occur in other organs and tissues (Mathema *et al.*, 2017). Caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), TB affects about a quarter of the world's population, accounting for about 1.3 million deaths in 2020. TB affects men and women in all age groups, but a higher incidence is observed in men aged 15 years or older, corresponding to 56% of cases, while women in the same age group, corresponding to 33% (World Healthy Organization, 2021). This difference in the number of cases is also reflected in the rate of complications and deaths, with the hormonal difference between the sexes being an important modulating factor (Kovats, 2015). Drug-resistant TB is a major public health challenge worldwide, with 2,2 million new cases of rifampicin-resistant TB (RR-TB) identified in 2019 alone, of which 132.222 cases were multidrug-resistant (MDR) (World Healthy Organization, 2021).

The immunopathology of TB begins when infectious nuclei with bacilli inhaled by the individual reach the pulmonary alveoli and are phagocytosed by macrophages, internalizing them and forming the phagolysosome by fusing the phagosome to the lysosome in an attempt to contain the infection (Koch and Mizrahi, 2018). This is considered the primary control mechanism of *Mtb* infection and occurs through the action of interferon gamma (IFN γ), but it can also be activated by the steroid hormone 1,25 α -dihydroxyvitamin D₃ or Vitamin D₃ (VD₃) action through the vitamin D receptor, the VDR (Fogel, 2015). Simultaneously, the bacilli are presented to CD4⁺ T lymphocytes by the major histocompatibility complex class II (MHC-II), present in macrophages, dendritic cells (DCs) and B lymphocytes, which produce inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and interleukins (IL) of the IL-1 family, capable of recruiting neutrophils and monocytes. Macrophages also activate a specific immune response against TB, releasing IL-12 and IL-18, which predominantly stimulate CD4⁺ T lymphocytes to release IFN- γ , which in turn stimulates *Mtb* phagocytosis (Cliff *et al.*, 2015; Gupta, Kumar and Agrawal, 2018).

VDR is a steroid hormone receptor, the superfamily of steroid receptors includes receptors from retinoic acid (RXRs), thyroid hormone, sex hormones (ERs) and adrenal steroids (Margolis and Christakos, 2010; Wang, Zhu and DeLuca, 2012). The action of VD₃ is mediated by the binding to VDR, which acts as a transcription factor after forming a heterodimer with the α and β retinoic acid receptors (RXR α and RXR β). This heterodimer complex formed by VD₃/VDR/RXRs binds to the promoter regions of target genes or at enhancers through vitamin D response element (VDRE), thus regulating their expression (Wang, Zhu and DeLuca, 2012; Gil, Plaza-Diaz and Mesa, 2018).

Regulation of inflammation is a critical factor that determines the outcome of *Mtb* infection. Excessive inflammation impairs cellular immunity, damages lung tissue, and can lead to lung cavitation and increased transmission. Conversely, decreased inflammation can impair bacterial control by delaying the induction of innate and adaptive immunity (Novikov *et al.*, 2011). New roles of steroid hormones have been studied from their immunomodulatory action to their role in the direct inhibition of microorganisms (Baeke *et al.*, 2010; Lang and Aspinall, 2017). Among these hormones, VD₃ and 17 β -estradiol (E₂) stand out, the latter being the most abundant hormone in women of childbearing age. These hormones may affect *Mtb* infection by several immune defense mechanisms, and these are important targets of study to contain the infection (Bini *et al.*, 2014).

TB is one of the most studied models of sexual dimorphism in respiratory tract infections. Although the prevalence of TB in men depends on geographic region, there is a general trend for the male/female ratio affecting more males with worse outcomes in developing countries, including a higher risk of mortality (Nhamoyebonde and Leslie, 2014; Nnadi *et al.*, 2016; World Healthy Organization, 2021). Interestingly, this higher proportion of affected males is not observed in children, suggesting the role of sex hormones in the

pathogenesis of TB (Neyrolles and Quintana-Murci, 2009; Stival *et al.*, 2014). In addition to the effects of E₂ on normal cells and normal physiology, this hormone also plays an important role in various pathological processes such as cancer, metabolic diseases, and inflammation (Pérez-Cremades *et al.*, 2018). All of the physiological functions performed by this hormone are mediated by estrogen receptors (ER α and ER β) (Moulton, 2018).

Therefore, we investigated the influence of the steroid hormones VD₃ and E₂ in the response against *Mtb* through gene expression from the receptors *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1* and *ESR2*, and upon *Mtb* viability *in vitro*.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Study design and ethical statements

For this study we used eight female subjects with a mean age of 26 years ($\pm$ 4.5) without TB, confirmed by a negative PPD test. All individuals involved in the research were healthy, without inflammatory, infectious or metabolic diseases and agreed to participate in the study by signing the informed consent form (ICF). All procedures performed were in accordance with the 1964 Helsinki declaration and the ethical standards of the institutional and national research committee (National Ethical committee for research using human biological samples – PLATAFORMA BRASIL, under reference number CAAE: 52519821.0.0000.5208).

The cell culture and *Mtb* infection assays were carried out in a laboratory with biosecurity level 3 (NB3) located in the Aggeu Magalhães Institute. The gene expression assays were performed in the Human Genetics and Molecular Biology Laboratory (LGBMH) and in the Molecular Biology sector of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory, both located at the Federal University of Pernambuco (UFPE).

The present study was carried out in three phases:

- a. Culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) previously treated with steroid hormones (VD₃ or E₂) and then infected with *Mtb H37Rv* or stimulated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS);
- b. *Mtb* viability assay in cell culture (24h and 72h after infection);
- c. Relative gene expression assays of *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1* and *ESR2* genes (24h and 72h after infection);

2.2 Cell culture assay

2.2.1 PBMC isolation

PBMCs were isolated from 8mL of peripheral whole blood collected in a tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) using Ficoll® Paque Plus (Cytiva, USA) and following the manufacture instructions. After isolation, cells were counted in a Neubauer chamber (10 μ L of cells + 10 μ L of Trypan Blue (0.4%) – 2x dilution), by direct optical microscope, counting only live cells (not blue). Cells were resuspended in Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 5% penicillin/streptomycin (100Ui), so that the final concentration of PBMCs was 2x10⁵ cells in 500 μ L of media per well in a 24 wells plate. The plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 4h until the treatment. The cell culture assay is summarized in Figure 1.

2.2.2 PBMC treatment

After the 4h incubation period, the PBMCs were treated with VD₃ (50ng/mL from Sigma-Aldrich) or with E₂ (100nM/mL from Sigma-Aldrich), returning to the CO₂ incubator for 12h (5% CO₂ and 37°C) until the stimulus/infection was performed. To verify whether the response triggered in the present experiment is exclusive to *Mtb* or occurs against

pathogens in general, PBMCs were stimulated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS from Thermo Fisher Scientific) solution at a concentration of 50ng/mL at the same time the cells were infected with *Mtb H37Rv* (12h after hormone treatment). The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ until RNA extraction and supernatant collection were performed (24h and 72h post-stimulation/infection) (Figure 1).

2.2.3 Culture and *Mtb* infection

A pre-culture of *Mtb H37Rv* (UFPEDA 82) was performed in Middlebrook 7H9 medium (Becton Dickinson) supplemented with 10% v/v OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase from Becton Dickinson) and 0.05% v/v Tween 80 (polysorbate 80) until reaching an optical density (OD) 600 of 0.6, which represents approximately 1×10^8 bacteria/mL. Cells were resuspended in 1 ml of RPMI medium supplemented with L-glutamine (200mM), gentamicin sulfate (5µg/L) and FBS (10%). The bacterial solution was resuspended eight times in an 1mL syringe to promote the breakdown of bacteria into single cells. Finally, 9 mL of supplemented RPMI media was added at a tenfold dilution to approximately 1×10^7 cells/mL. The PBMC infection process was performed by adding 500µL of medium containing 2×10^6 *Mtb* cells per well. The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ until *Mtb* viability assay, RNA extraction and supernatant collection were performed (24h and 72h post-stimulation/infection) (Figure 1).

2.3 Quantification of *Mtb* viability

The wells indicated for viability testing, both 24h and 72h, had the supernatant removed (Figure 1), were washed with Phosphate Buffered Saline 1X (PBS) and lysed with lysis buffer (0.1% v/v Tween 80 in deionized water) sterilized with a 0.22 µm. After addition of the lysis buffer, the cells were incubated at 37°C and observed under an inverted light microscope. From the bacterial suspension, a serial dilution in 0.5% v/v Tween 80 in sterile PBS (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}). Then, 50 µL of the undiluted sample and each of the dilutions was added to a quadrant plate with 7H10 agar medium (Becton Dickinson), autoclaved and supplemented with 10% v/v OADC, as appropriate for growth of *Mtb H37Rv*. The lysate solution was spread on the plate with the disposable inoculation loop. This procedure was performed in duplicate. The plates were incubated at 37°C. Colony forming units (CFUs) were counted after 21 days.

2.4 Relative gene expression assay

2.4.1 RNA extraction and cDNA synthesis

After 24h and 72h of infection with *Mtb H37Rv* or stimulation with LPS, total RNA was extracted from PBMCs with TRIzol[®] reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. The quality control of the samples was performed using spectrophotometry (Nanodrop 2000c – Thermo Scientific) for quantification of nucleic acids and by electrophoresis to verify the integrity of the material. Electrophoresis was performed in 0.8% agarose gel, 0.5x TBE buffer (tris, boric acid and EDTA) with RNase free ethidium bromide (1%), for 20 minutes at 60 volts, for later visualization of the sample on the transilluminator. Samples were stored at -80°C.

The standard concentration of total RNA for cDNA synthesis used in this work was 500ng. cDNA was synthesized using the commercial GoScript[™] Reverse Transcription Mix kit, Oligo(dT) (Promega) and following the manufacturer's instructions.

2.4.2 qPCR assays

Gene expression assays were performed according to standards proposed by Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Specific fluorogenic probes of the Taqman type (Thermo

Fisher Scientific) were used for the target genes *VDR* (Hs00172113_m1), *ESR1* (Hs01046816_m1), *ESR2* (Hs01100353_m1), *RXR α* (Hs01067640_m1) and *RXR β* (Hs00232774_m1). The reference genes *90 kDa heat shock protein (HSP90)* and *Beta-2-Microglobulin (B2M)* expression was performed using SyBR Green (Thermo Fisher Scientific) and the respective primers (table 1). The selection of the best reference genes was performed by GeNorm, and the two were used in the normalization of the expression analysis.

Assays were performed in biological and technical triplicate. All relative quantification assays were performed on the ABI7500 instrument (Applied Biosystems). The analysis of relative gene expression was performed by the ΔCq method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.5 Statistical analysis

To analyze the distribution of the groups of the *Mtb* viability test and the gene expression assays, the Shapiro-Wilk test was performed. After determining the normality of the groups, for the *Mtb* viability test, the ANOVA Two Way test was performed. For gene expression assays, One Way ANOVA was used when normalized and Kruskal-Wallis when not normalized. For all tests, *p-values* < 0.05 at a confidence interval (CI) of 95% were considered statistically significant. The analyzes were performed using the R Studio software version 4.1.2 and the graphs using the Graph Pad Prism version 9.0.0.

3 RESULTS

3.1 *Mtb* viability assay in cell culture

The *H37Rv Mtb* viability test was performed in all groups at 24h and 72h after infection (Figure 2). After 24 hours of culture, the growth of colony forming units (CFU) was observed in all groups, with a decrease in growth of 35% in the group previously treated with E_2 , compared to the control that was only infected with the *H37Rv Mtb* strain and no treatment (Figure 3). When analyzed the amount of CFUs after 72h of infection, a decrease of 28,5% was observed in the group treated with VD_3 and of 40,3% in the group treated with E_2 compared to the 24h counting (Figure 3). These results were not statistically significant.

3.2 Relative gene expression

3.2.1 Gene expression profile from *Mtb* infected and LPS stimulated cells

The expression profile of the *VDR*, *RXR α* , *RXR β* , *ESR1* and *ESR2* genes was accessed according VD_3 and E_2 treatment (Figures 4 and 5).

The *VDR* was downregulated after 24h of *Mtb* infection when compared to not infected groups (-5.65fold change (FC), $p= 0.03389$ and -8.03FC, $p= 0.0004$) (Figures 4A and 5A). The same downregulation profile was found 72h after infection when compared to cells treated with E_2 (-5.27FC, $p= 0.0338$) (Figure 5A).

After 24h of infection with *Mtb*, a decrease in *RXR α* expression of -3.83FC ($p= 0.0038$) was observed, this downregulation was intensified after 72h of infection, verifying a decrease of -30.84FC in the expression of this receptor ($p= 1.05 \times 10^{-5}$) when compared to noninfected cells. Cells stimulated with LPS present a downregulation of *RXR α* after 72h (-11.43FC, $p= 0.0007$). The same expression profile was found in cells infected or stimulated in comparison with E_2 treated group (Figure 5B).

Interestingly, after 24h of infection with *Mtb*, a downregulation of -4.66FC and -5.8FC ($p= 0.0133$ and $p= 0.0020$) of *RXR β* expression was observed when compared to the uninfected groups. On the other hand, after 72h of infection, an upregulation of *RXR β*

expression was observed (2.55FC, $p=0.1450$ and 1.35FC, $p=0.5241$). However, these results were not statistically significant (Figures 4C and 5C).

Cells stimulated with LPS present an upregulation of 1.82FC of *RXR β* when compared to non-stimulated cells ($p=0.2089$) after 72h (Figure 4C). *Mtb* infected cells after 72h of infection also present an upregulation of *RXR β* expression when compared to 24h period (30.10FC, $p=0.0011$).

Regarding ERs α and β , encoded by *ESR1* and *ESR2* genes, respectively, a differential expression profile was observed. The *ESR1* gene had its expression decreased after 72h of infection with *Mtb* and stimulation with LPS (-12.21FC, $p=0.0036$ and -4.37FC, $p=0.0082$, respectively) (Figure 4D). The same expression profile was observed when compared to cells treated with E_2 (-15.04FC, $p=0.0023$ and -5.38FC, $p=0.0008$, respectively) (Figure 5D).

When accessing the *ESR2* gene expression profile we observed an increase of its expression after 24 and 72h of *Mtb* infection (2.38FC, $p=0.1573$ and 6.08FC, $p=0.0009$, respectively) when compared to the uninfected, but VD_3 treated group (Figure 4E). The same profile of expression was found in infected cells (24h and 72h) compared to the group treated with E_2 (1.45FC, $p=0.7237$ and 10.19FC, $p=7.75 \times 10^{-5}$, respectively) (Figure 5E). *Mtb* infected cells present an upregulation of *ESR2* gene expression after 72h when compared to 24h (5.00FC, $p=0.0338$). In addition, when cells were stimulated with LPS, an increase of *ESR2* expression was observed (1.63FC, $p=0.0338$) (Figures 4E and 5E).

3.2.2 Gene expression profile from cells under VD_3 treatment

PBMCs treated with VD_3 were infected after the 12h treatment period with *H37Rv* *Mtb* strain or stimulated with LPS. When the *VDR* gene expression was verified, a statistically significant increase of 10.29FC ($p=0.03389$) was observed between the group previously treated with this hormone ($VD_3 + Mtb$) and the only infected group (*Mtb*). However, after 72h of infection in cells treated with VD_3 there was a -5.52FC decrease in *VDR* expression compared to 24h ($p=0.03389$). When accessed *VDR* expression in cells after 72h of stimulation with LPS, there was an increase of *VDR* expression of 1.50FC for the $VD_3 + LPS$ group compared to the only stimulated with LPS ($p=0.0071$) (Figure 4A).

When the expression of *RXR α* was evaluated, a downregulation of this gene was observed in all groups after 72h of infection with *Mtb* or stimulation with LPS. However, when *Mtb* infected cells were previously treated with VD_3 , an increase by 8.04FC of *RXR α* expression ($p=0.0001$) was observed after 24h. Interestingly, after 72h of infection the same VD_3 treated cells showed a decrease in the expression of this gene (-1.70FC, $p=0.0218$) when compared to infected and untreated cells (Figure 4B).

Regarding the expression levels of *RXR β* , after 24h of infection with *Mtb*, cells treated with VD_3 present an increased expression of 7.44FC ($p=0.0028$) when compared to untreated but infected cells. After 72h of infection, $VD_3 + Mtb$ group of cells present a downregulation of *RXR β* (-3.07FC, $p=0.0138$). In cells previously treated with VD_3 and stimulated with LPS, there was an increase in the expression of this receptor of 1.82FC ($p=0.0048$) after 72h (Figure 4C).

ESR1 expression in 24h was upregulated in groups previously treated with VD_3 and infected with *Mtb* or stimulated with LPS (2.90FC, $p=0.0929$ and 1.36, $p=0.0056$). Interestingly, even observing the increase in *ESR1* expression in cells treated with VD_3 and infected with *Mtb*, when compared to the uninfected group, a downregulation of -4.20FC was observed ($p=0.0103$) (Figure 4D).

ESR2 expression in VD_3 treated and *Mtb* infected cells was increased compared to the uninfected but treated with VD_3 group at 24h (2.84FC, $p=0.0495$). After 72h of infection a downregulation of -9.53FC ($p=4.55 \times 10^{-6}$) compared to untreated infected cells was

observed. The same profile was found in cells treated with VD₃, but stimulated with LPS (-2.75FC, $p=0.2888$), however this result was not statistically significant (Figure 4E). When compared VD₃ + *Mtb* group of cells after 24h and 72h of infection a down regulation of *ESR2* was observed (-2.27FC, $p=0.0495$).

3.2.3 Gene expression profile from cells under E₂ treatment

PBMCs were also treated with E₂ and infected with *H37Rv Mtb* strain or stimulated with LPS after the 12h treatment period. We accessed the expression of the following genes: *VDR*, *RXR*, *RXR*, *ESR1* and *ESR2*.

After 24h of infection with *Mtb*, cells treated with E₂ presented *VDR* upregulation of 22.59FC, $p=0.0003$ when compared to only infected cells. However, after 72h of infection was observed a downregulation of this gene of -3.96FC ($p=0.0209$) in *Mtb*+E₂ group versus *Mtb* only. This same expression trend was found in LPS+E₂ group (-2.83FC, $p=0.0209$) (Figure 5A).

Cells previously treated with E₂ and infected with *Mtb* had their *RXRα* expression increased after 24h (10.37FC, $p=4.82\times10^{-5}$). However, after 72h of infection, cells treated with E₂ showed a downregulation of -26.03FC ($p=0.0013$). The same was observed when E₂ treated cells were stimulated with LPS (-2.69FC, $p=0.0336$) (Figure 5B).

By verifying the expression of *RXRβ* in cells treated with E₂ and infected with *Mtb*, we verified a decreased expression of -3.23FC ($p=9.46\times10^{-5}$) compared to not infected cells (24h). On the other hand, after 72h of infection, we observed an increase of *RXRβ* expression in 2.38FC ($p=0.0104$) compared to 24h (Figure 5C).

Previous treatment with E₂ in cells infected with *Mtb* caused a downregulation of the *ESR1* gene expression when compared to only infected cells (24h). On the other hand, in the same comparison, but taking into account the time of 72h post-infection, there was an increase in 3.02FC *ESR1* expression ($p=0.0034$). The same was observed when the treated cells were stimulated with LPS, observing a decrease in *ESR1* mRNA levels after 24h of stimulation (-4.01FC, $p=0.0291$) and a decrease after 72h (-4.01FC, $p=0.0291$) (Figure 5D).

E₂ treated and *Mtb* infected cells altered the *ESR2* gene expression profile at -3.13FC ($p=0.0104$) when compared to infected and untreated cells. When E₂ treated cells were stimulated with LPS, *ESR2* had its expression diminished after 72h compared to 24h post-stimulation (-2.11FC, $p=0.0209$) (Figure 5E).

4 DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that the steroid hormones VD₃ and E₂ influence upon *VDR*, *RXRα*, *RXRβ*, *ESR1* and *ESR2* gene expression in PBMCs cultures infected with *H37Rv Mtb*. In order to verify if this expression variation is specific for *Mtb* infection or as general pathogen infection response, cells were also stimulated with LPS, mimicking the infection by other pathogens.

VD₃ upregulates steroid receptors expression 24h after *Mtb* infection

VD₃ or 1,25α-dihydroxyvitamin D₃ is a steroid hormone that, through its receptor, *VDR*, has the ability to play immunomodulatory activities, by genomic mechanisms or not (Wang, Zhu and DeLuca, 2012). Deficient levels of VD are considered pandemic, in which 1 billion people worldwide are affected. Deficiency of this hormone has been associated with several disorders such as autoimmune, metabolic and infectious diseases (vinh quốc Luong and Nguyễn, 2012; Strange, Shipman and Ramachandran, 2015; Zhou *et al.*, 2018). More specifically, VD is necessary for the proper functioning of the immune system (Carlberg, 2019; Dedicoat, 2020).

The association between VD and TB is not new and in the last decades roles for VD₃ against infectious diseases have been extensively investigated as well (Selvaraj, 2011; Junaid *et al.*, 2016). Two main VD₃ mechanisms of action against *Mtb* infection are already well described: 1) the activation of phagolysosome fusion by an interferon gamma-independent pathway (IFN- γ) and 2) modulation of *hCAP18* expression, which has as a final product the catelecidin LL-37 (Rivas-Santiago *et al.*, 2008; Bucki *et al.*, 2010). This hormone exerts its functions by binding to VDR, which heterodimerizes with retinoic acid receptors (RXR α , RXR β , RXR γ) forming a transcriptional activation complex of several genes by binding to the vitamin D response elements (VDRE) in DNA (Mangelsdorf and Evans, 1995; Koszewski, Herberth and Malluche, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Christakos *et al.*, 2016).

In our study, PBMCs from childbearing age healthy women with a negative PPD test were treated with VD₃ and infected with *H37Rv Mtb*. It is important to emphasize that the presence of this hormone in the infection upregulates expression of: *VDR*, *RXR α* and *RXR β* gene receptors. The increase in mRNA levels of these genes is observed 24h after infection, which would corroborate with the fact that VD₃ be necessary for the immediate responses triggered against *Mtb* (phagolysosome activation and LL-37 production) (Lalvani and Connell, 2012; Xu *et al.*, 2014; de Albuquerque Borborema *et al.*, 2020).

After 72h of infection, a decrease in mRNA levels from *VDR*, *RXR α* and *RXR β* is observed suggesting: 1) a possible low availability of VD₃ since the cells received the treatment only once and 12h before infection and/or 2) mRNA consumption - the half-life of these transcripts is on average 8h for the *VDR* (Kongsbak *et al.*, 2014) and 2h for the *RXRs* (Alarid, 2006).

Interestingly, VD₃ was able to upregulate the *ESR2* gene expression 24h after *Mtb* infection. However, after 72h of infection a downregulation was observed in *ESR1* and *ESR2* mRNA levels. Al-Hendi *et al.* described that this hormone is able to reduce estrogen receptor alpha (ER α) levels in human uterine leiomyoma (HuLM) cells, the same was observed by us in *Mtb* infected PBMCs (Al-Hendy *et al.*, 2015). Importantly, VD₃ in the absence of E₂ was able to induce the expression of the *ESR2* receptor 24h after infection. In activated macrophages, VD₃ is able to downregulate the production of pro-inflammatory cytokines, significantly decreasing aromatase activity, especially in the presence of an estrogenic environment. This would highlight the regulatory role of VD₃ in the action of E₂ and the consequent expression of its receptors (Villaggio, Soldano and Cutolo, 2012; Zanatta *et al.*, 2017).

***Mtb*-infected PBMCs express ERs even in the absence of E₂**

The relationship between the steroid hormone 17 β -estradiol (E₂) and *Mtb* infection has not yet been well elucidated. Although epidemiological data show that men are at greater risk of complications and death from TB than women (World Healthy Organization, 2021), the role of sex hormones such as E₂ in modulating the immune system against infections has only recently been highlighted in the pathogenesis of TB. The development of active TB occurs twice as often in men as in women. This difference has been attributed to sexual dimorphism and social, cultural and economic barriers (Bini *et al.*, 2014).

It is noteworthy that the difference in the incidence of TB is observed in adults, but not in children or the elderly (Neyrolles and Quintana-Murci, 2009), suggesting steroid sex hormones as immune response modulators. Macrophages and lymphocytes express several hormone receptors, including ER α and ER β and E₂, acts on development and differentiation/function of both. In addition, it influences the clinical outcome of infectious diseases (Bini *et al.*, 2014). The difference between men and women in the response against infections in general has been associated with the intensity of the inflammatory response,

which is apparently advantageous in infectious processes, but acts as a double-edged sword, causing a higher incidence of autoimmune diseases in women (Ahmed *et al.*, 1999; CUTOLO *et al.*, 2002).

The fact that E₂ induces a pro-inflammatory immune response associated with a Th1 profile may help to explain why women have a lower incidence of TB (Neyrolles and Quintana-Murci, 2009), but experimental models (*in vivo* or *in vitro*) about the influence of this hormone on *Mtb* infection are poorly studied.

TB patients have significantly elevated levels of E₂ compared to healthy individuals (Bottasso *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2016). It is known that E₂ can regulate autophagy through the production of reactive oxygen species (ROS) (Xiang *et al.*, 2019; Ouyang *et al.*, 2020). This hormone acts depending on the environment, promoting or inhibiting autophagy (Totta *et al.*, 2016). As an example, when cellular autophagy is stimulated by hypoxia or LPS, E₂ inhibits the expression of genes associated with this process (Lin *et al.*, 2016). Previous studies have reported that E₂/ER complex suppresses intracellular growth of *Mtb* by inducing autophagy in infected macrophages (Ouyang *et al.*, 2020). Our results reinforce this statement since E₂ was able to reduce by up to 40% the *Mtb* viability, demonstrating that in fact this hormone is able to improve the host response to *Mtb*.

Our results demonstrated that E₂ is able to upregulate VDR expression in *Mtb* infected cells, even in the absence of VD₃. It is important to highlight that this upregulation is seen only in infected cells but not after E₂ stimuli alone. This suggests that VDR upregulation may act to contain *Mtb* infection even in the absence of its main ligand VD₃. In general, TB patients have low levels of VD₃, which may favor towards critical conditions of the disease. This leads us to hypothesize that the ability of E₂ to modulate VDR mRNA levels in women may be an additional protective factor (Nnoaham and Clarke, 2008). Our results also corroborate the findings of Gan *et al.*, that the administration of E₂ reduced the viability of *Mtb* in cells of the human bronchial epithelial cell line 16HBE also after 72h of infection (Gan *et al.*, 2022).

The RXRs form heterodimers with several nuclear hormone receptors such as ERs and the VDR, after heterodimerization occurs the formation of a complex that modulates the expression of several genes by binding to hormonal response elements such as VDREs or estrogen response elements (EREs) (Segars *et al.*, 1993). Therefore, genomic responses triggered by the VDR or ERs are dependent on heterodimerization with RXRs (α and/or β) (Germain *et al.*, 2006).

In our cell culture assays, we observed that the expression of *RXR α* was upregulated after 24h and downregulated 72h after infection with *Mtb* in cells previously treated with E₂. Our findings are in agreement with Saini *et al.*, who identified an upregulation of *RXR α* in murine macrophages and dendritic cells infected with *H37Rv Mtb* 48h after infection (Saini *et al.*, 2018). This same trend was observed in VDR gene expression. On the other hand, the *RXR β* was downregulated in the E₂ treated cells (24h and 72h after infection). Segars *et al.*, found that *RXR β* in E₂ treated MCF-7 cells inhibits transcriptional activation mediated by ERs/EREs binding by binding to EREs. Indicating that E₂/ER responsive genes can be downregulated by the *RXR β* (Segars *et al.*, 1993). Therefore, our results may suggest that the downregulation of *RXR β* found is a consequence of E₂ stimuli that modulates responsive genes to *Mtb* infection.

As expected, cells treated with E₂ showed a higher expression of *ESR1* and *ESR2*. However, for *ESR1* when cells treated with E₂ were infected with *Mtb* or stimulated with LPS, a downregulation was observed after 72h. This decrease in the expression of this receptor may be due to the treatment with E₂ having been performed only once and 12 hours before the infection/stimulus, or due to the half-life of this mRNA being 7.4 hours (Amaral *et al.*, 2009).

On the other hand, even in the absence of E₂, cells infected with *Mtb* upregulated *ESR2* expression after 24h of infection, with an even greater increase in mRNA levels after 72h, which was not observed when cells were stimulated with LPS, indicating that the response triggered by this receptor is specific for *Mtb*.

5 CONCLUSIONS

Finally, our findings demonstrate that ER α and ER β receptors are expressed in *Mtb*-infected cells even in the absence of its ligand E₂, or VD₃. VD₃ treatment upregulated VDR, RXR α , RXR β and *ESR2* gene expression in *Mtb* infected PBMCs. It was also possible to identify that treatment with E₂ inhibits the expression of *RXR β* in *Mtb* infected cells. Our results demonstrate that VD₃ and E₂ play a direct role in the response to *Mtb* infection. However, further studies are needed to clarify by which mechanisms these hormones act.

6 CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7 AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: JAS MEAB MR. Performed the experiments: MEAB MR TMCL. Analyzed the data: MEAB TMCL. Wrote the paper: MEAB TMCL JAS.

8 FUNDINGS

This work was funded by FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), grant number APQ 0952-2.02/15 and Public notice for research productivity from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant number 312366/2021-3.

9 REFERENCES

- Ahmed, S. A. et al. (1999) 'Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds.', *Environmental Health Perspectives*, 107(suppl 5), pp. 681–686. doi: 10.1289/ehp.99107s5681.
- Al-Hendy, A. et al. (2015) '1,25-Dihydroxyvitamin D3 Regulates Expression of Sex Steroid Receptors in Human Uterine Fibroid Cells', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(4), pp. E572–E582. doi: 10.1210/jc.2014-4011.
- Alarid, E. T. (2006) 'Lives and Times of Nuclear Receptors', *Molecular Endocrinology*, 20(9), pp. 1972–1981. doi: 10.1210/me.2005-0481.
- de Albuquerque Borborema, M. E. et al. (2020) 'Differential distribution in vitamin D receptor gene variants and expression profile in Northeast Brazil influences upon active pulmonary tuberculosis', *Molecular Biology Reports*. doi: 10.1007/s11033-020-05762-3.
- de Almeida, C. J. G. (2017) 'Caveolin-1 and Caveolin-2 Can Be Antagonistic Partners in Inflammation and Beyond', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01530.
- Amaral, S. et al. (2009) 'The promoter C specific ER α isoform is associated with tamoxifen outcome in breast cancer', *Breast Cancer Research and Treatment*, 118(2), pp. 323–331. doi: 10.1007/s10549-008-0241-9.
- Apt, A. S., Logunova, N. N. and Kondratieva, T. K. (2017) 'Host genetics in susceptibility to and severity of mycobacterial diseases', *Tuberculosis*, 106, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.tube.2017.05.004.

- Baeke, F. et al. (2010) 'Vitamin D: modulator of the immune system.', *Current opinion in pharmacology*, 10(4), pp. 482–96. doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001.
- Bini, E. I. et al. (2014) 'The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis', *PLoS ONE*. Edited by L. Mariño-Ramírez, 9(4), p. e93831. doi: 10.1371/journal.pone.0093831.
- Boonyaratanakornkit, V. (2011) 'Scaffolding proteins mediating membrane-initiated extra-nuclear actions of estrogen receptor', *Steroids*. doi: 10.1016/j.steroids.2011.02.017.
- Bottasso, O. et al. (2007) 'The Immuno-endocrine Component in the Pathogenesis of Tuberculosis', *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), pp. 166–175. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01962.x.
- Brites, D. and Gagneux, S. (2015) 'Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens', *Immunological Reviews*, 264(1), pp. 6–24. doi: 10.1111/imr.12264.
- Bucki, R. et al. (2010) 'Cathelicidin LL-37: A multitask antimicrobial peptide', *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, pp. 15–25. doi: 10.1007/s00005-009-0057-2.
- Carlberg, C. (2019) 'Vitamin D Signaling in the Context of Innate Immunity: Focus on Human Monocytes', *Frontiers in Immunology*, 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.02211.
- de Chastellier, C. (2009) 'The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages', *Immunobiology*, 214(7), pp. 526–542. doi: 10.1016/j.imbio.2008.12.005.
- CHESKIS, B. et al. (2008) 'MNAR plays an important role in ERα activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways', *Steroids*, 73(9–10), pp. 901–905. doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.028.
- Christakos, S. et al. (2016) 'Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects', *Physiological Reviews*, 96(1), pp. 365–408. doi: 10.1152/physrev.00014.2015.
- Cliff, J. M. et al. (2015) 'The human immune response to tuberculosis and its treatment: A view from the blood', *Immunological Reviews*, 264(1), pp. 88–102. doi: 10.1111/imr.12269.
- Cohen, A. W. et al. (2004) 'Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease', *Physiological Reviews*, 84(4), pp. 1341–1379. doi: 10.1152/physrev.00046.2003.
- CUTOLO, M. et al. (2002) 'Androgens and Estrogens Modulate the Immune and Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966(1), pp. 131–142. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04210.x.
- Dedicoat, M. (2020) 'Where next with for vitamin D and tuberculosis?', *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 24(3), pp. 265–265. doi: 10.5588/ijtld.20.0045.
- Dudău, M. et al. (2020) 'Caveolae as Potential Hijackable Gates in Cell Communication', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi: 10.3389/fcell.2020.581732.
- Fernández, R. et al. (2016) 'An adverse immune-endocrine profile in patients with tuberculosis and type 2 diabetes', *Tuberculosis*, 101, pp. 95–101. doi: 10.1016/j.tube.2016.09.001.
- Fogel, N. (2015) 'Tuberculosis: A disease without boundaries', *Tuberculosis*. Elsevier Ltd, 95(5), pp. 527–531. doi: 10.1016/j.tube.2015.05.017.
- Gan, Y. et al. (2022) 'Estradiol inhibits autophagy of Mycobacterium tuberculosis -infected 16HBE cells and controls the proliferation of intracellular Mycobacterium tuberculosis', *Molecular Medicine Reports*, 25(6), p. 196. doi: 10.3892/mmr.2022.12712.
- Germain, P. et al. (2006) 'International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors', *Pharmacological Reviews*, 58(4), pp. 760–772. doi: 10.1124/pr.58.4.7.
- Gil, Á., Plaza-Díaz, J. and Mesa, M. D. (2018) 'Vitamin D: Classic and Novel Actions', *Annals of Nutrition and Metabolism*, 72(2), pp. 87–95. doi: 10.1159/000486536.

- Gupta, N., Kumar, R. and Agrawal, B. (2018) 'New players in immunity to tuberculosis: The host microbiome, lung epithelium, and innate immune cells', *Frontiers in Immunology*, 9(APR), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2018.00709.
- Hitkova, I. et al. (2013) 'Caveolin-1 Protects B6129 Mice against *Helicobacter pylori* Gastritis', *PLoS Pathogens*. Edited by S. R. Blanke, 9(4), p. e1003251. doi: 10.1371/journal.ppat.1003251.
- Junaid, K. et al. (2016) 'Vitamin D deficiency associates with susceptibility to tuberculosis in Pakistan, but polymorphisms in VDR, DBP and CYP2R1 do not', *BMC Pulmonary Medicine*, 16(1), p. 73. doi: 10.1186/s12890-016-0240-2.
- Koch, A. and Mizrahi, V. (2018) 'Mycobacterium tuberculosis', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 26(6), pp. 555–556. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.012.
- Kongsbak, M. et al. (2014) 'Vitamin D Up-Regulates the Vitamin D Receptor by Protecting It from Proteasomal Degradation in Human CD4+ T Cells', *PLoS ONE*. Edited by M. Bradl, 9(5), p. e96695. doi: 10.1371/journal.pone.0096695.
- Koszewski, N. J., Herberth, J. and Malluche, H. H. (2010) 'Retinoic acid receptor gamma 2 interactions with vitamin D response elements.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. Elsevier Ltd, 120(4–5), pp. 200–207. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.04.016.
- Kotzé, L. A. et al. (2020) 'Mycobacterium tuberculosis and myeloid-derived suppressor cells: Insights into caveolin rich lipid rafts', *EBioMedicine*, 53, p. 102670. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102670.
- Kovats, S. (2015) 'Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways', *Cellular Immunology*. Elsevier Inc., 294(2), pp. 63–69. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.01.018.
- Lalvani, A. and Connell, D. W. (2012) 'Dissecting the immunological, antimicrobial and clinical effects of vitamin D therapy in tuberculosis', *Pathogens and Global Health*, 106(7), pp. 378–379. doi: 10.1179/2047772412Z.000000000087.
- Lang, P. O. and Aspinall, R. (2017) 'Vitamin D Status and the Host Resistance to Infections: What It Is Currently (Not) Understood', *Clinical Therapeutics*, 39(5), pp. 930–945. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.04.004.
- Lin, C.-W. et al. (2016) 'Inhibition of Autophagy by Estradiol Promotes Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury in Rats', *Neuroscience Bulletin*, 32(2), pp. 137–144. doi: 10.1007/s12264-016-0017-x.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. (1995) 'The RXR heterodimers and orphan receptors', *Cell*, 83(6), pp. 841–850. doi: 10.1016/0092-8674(95)90200-7.
- Margolis, R. N. and Christakos, S. (2010) 'The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1), pp. 208–214. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05227.x.
- Mathema, B. et al. (2017) 'Drivers of Tuberculosis Transmission', *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_6), pp. S644–S653. doi: 10.1093/infdis/jix354.
- Moulton, V. R. (2018) 'Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease', 9(October), pp. 1–21. doi: 10.3389/fimmu.2018.02279.
- Neyrolles, O. and Quintana-Murci, L. (2009) 'Sexual Inequality in Tuberculosis', *PLoS Medicine*, 6(12), p. e1000199. doi: 10.1371/journal.pmed.1000199.
- Nhamoyebonde, S. and Leslie, A. (2014) 'Biological Differences Between the Sexes and Susceptibility to Tuberculosis', *Journal of Infectious Diseases*, 209(suppl 3), pp. S100–S106. doi: 10.1093/infdis/jiu147.

- 649 Nnadi, C. D. et al. (2016) 'Mind the gap: TB trends in the USA and the UK, 2000–2011',
 650 *Thorax*, 71(4), pp. 356–363. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207915.
- 651 Nnoaham, K. E. and Clarke, A. (2008) 'Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a
 652 systematic review and meta-analysis', *International Journal of Epidemiology*, 37(1), pp.
 653 113–119. doi: 10.1093/ije/dym247.
- 654 Novikov, A. et al. (2011) 'Mycobacterium tuberculosis Triggers Host Type I IFN
 655 Signaling To Regulate IL-1 β Production in Human Macrophages', *The Journal of*
 656 *Immunology*, 187(5), pp. 2540–2547. doi: 10.4049/jimmunol.1100926.
- 657 Ouyang, Q. et al. (2020) 'Bazedoxifene Suppresses Intracellular *Mycobacterium*
 658 *tuberculosis* Growth by Enhancing Autophagy', *mSphere*. Edited by C. L. Stallings, 5(2).
 659 doi: 10.1128/mSphere.00124-20.
- 660 Patel, H. H., Murray, F. and Insel, P. A. (2008) 'Caveolae as Organizers of
 661 Pharmacologically Relevant Signal Transduction Molecules', *Annual Review of*
 662 *Pharmacology and Toxicology*, 48(1), pp. 359–391. doi:
 663 10.1146/annurev.pharmtox.48.121506.124841.
- 664 Pérez-Cremades, D. et al. (2018) 'MiRNA as a new regulatory mechanism of estrogen
 665 vascular action', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). doi:
 666 10.3390/ijms19020473.
- 667 Potje, S. R. et al. (2019) 'Reduced caveolae density in arteries of SHR contributes to
 668 endothelial dysfunction and ROS production', *Scientific Reports*, 9(1), p. 6696. doi:
 669 10.1038/s41598-019-43193-8.
- 670 Rivas-Santiago, B. et al. (2008) 'Expression of Cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium*
 671 *tuberculosis* Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and
 672 Epithelial Cells', *Infection and Immunity*, 76(3), pp. 935–941. doi: 10.1128/IAI.01218-07.
- 673 Saini, A. et al. (2018) 'An Accord of Nuclear Receptor Expression in *M. tuberculosis*
 674 Infected Macrophages and Dendritic Cells', *Scientific Reports*, 8(1), p. 2296. doi:
 675 10.1038/s41598-018-20769-4.
- 676 Segars, J. H. et al. (1993) 'Inhibition of estrogen-responsive gene activation by the retinoid
 677 X receptor beta: evidence for multiple inhibitory pathways.', *Molecular and Cellular*
 678 *Biology*, 13(4), pp. 2258–2268. doi: 10.1128/MCB.13.4.2258.
- 679 Selvaraj, P. (2011) 'Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Cathelicidin in the Treatment of
 680 Tuberculosis', in, pp. 307–325. doi: 10.1016/B978-0-12-386960-9.00013-7.
- 681 Stival, A. et al. (2014) 'Sexual Dimorphism in Tuberculosis Incidence: Children Cases
 682 Compared to Adult Cases in Tuscany from 1997 to 2011', *PLoS ONE*. Edited by O.
 683 Neyrolles, 9(9), p. e105277. doi: 10.1371/journal.pone.0105277.
- 684 Strange, R. C., Shipman, K. E. and Ramachandran, S. (2015) 'Metabolic syndrome: A
 685 review of the role of vitamin D in mediating susceptibility and outcome.', *World journal of*
 686 *diabetes*, 6(7), pp. 896–911. doi: 10.4239/wjd.v6.i7.896.
- 687 Totta, P. et al. (2016) 'Dynamin II is required for 17 β -estradiol signaling and autophagy-
 688 based ER α degradation', *Scientific Reports*, 6(1), p. 23727. doi: 10.1038/srep23727.
- 689 Tsai, T.-H. et al. (2011) 'Impaired Cd14 and Cd36 Expression, Bacterial Clearance, and
 690 Toll-Like Receptor 4-Myd88 Signaling in Caveolin-1-Deleted Macrophages and Mice',
 691 *Shock*, 35(1), pp. 92–99. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181ea45ca.
- 692 Villaggio, B., Soldano, S. and Cutolo, M. (2012) '1,25-dihydroxyvitamin D3
 693 downregulates aromatase expression and inflammatory cytokines in human macrophages.',
 694 *Clinical and experimental rheumatology*, 30(6), pp. 934–8. Available at:
 695 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253631>.
- 696 vinh quốc Luong, K. and Nguyễn, L. T. H. (2012) 'The beneficial role of vitamin D in
 697 systemic lupus erythematosus (SLE)', *Clinical rheumatology*, 31(10), pp. 1423–35. doi:
 698 10.1007/s10067-012-2033-1.

- Wang, Y., Zhu, J. and DeLuca, H. F. (2012) 'Where is the vitamin D receptor?', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Elsevier Inc., 523(1), pp. 123–133. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001.
- World Healthy Organization (2021) Global Tuberculosis Report. Available at: file:///C:/Users/samsung/Downloads/9789240037021-eng (2).pdf.
- Xiang, J. et al. (2019) 'How does estrogen work on autophagy?', *Autophagy*, 15(2), pp. 197–211. doi: 10.1080/15548627.2018.1520549.
- Xu, G. et al. (2014) 'Insights into battles between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages', *Protein & Cell*, 5(10), pp. 728–736. doi: 10.1007/s13238-014-0077-5.
- Zanatta, A. P. et al. (2017) 'Interactions between oestrogen and 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 signalling and their roles in spermatogenesis and spermatozoa functions', *Basic and Clinical Andrology*, 27(1), p. 10. doi: 10.1186/s12610-017-0053-z.
- Zhang, J. et al. (2011) 'DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR–RXR complex', *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), pp. 556–563. doi: 10.1038/nsmb.2046.
- Zhou, S.-H. et al. (2018) 'Influence of vitamin D deficiency on T cell subsets and related indices during spinal tuberculosis', *Experimental and Therapeutic Medicine*. doi: 10.3892/etm.2018.6203.

TABLES

Table 1: Primer sequences.

Gene	Primer sequence
<i>HSP90</i>	F: 5'-GGCCAACTCAGCTTTTGTGG-3' R: 5'-CATGGTGGAGTTGTCCCGAA-3'
<i>B2M</i>	F: 5'- AGATGAGTATGCCTGCCGTG-3' R: 5'- ACATGTCTCGATCCCACCTTAAC-3'

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Methodology description. Schematically, 8mL of whole blood were collected from 8 women who were followed for the isolation of PBMCs using the Ficoll methodology. Confluency of 2×10^5 cells with complete RPMI medium was added per well and rested for 4h in the CO₂ incubator. After this period cells were treated with steroid hormones, and after 12h were infected or stimulated with *Mtb H37Rv* and LPS, respectively. Upon reaching the times of 24h and 72h, the cells proceeded to cell viability analysis and gene expression assay.

Figure 2: Representative graph of *H37Rv Mtb* cell growth and viability in macrophages when treated with steroid hormones and evaluated at 0h, 24h and 72h after infection.

Figure 3: *Mtb* infected cells visualized by optical microscopy exhibit cell viability. A and B) Cell viability of *Mtb* at 24 and 72h, respectively. C and D) Viability of *Mtb* with VD₃ treatment at 24h and 72h, respectively. E and F) Viability of *Mtb* with E₂ treatment at 24h and 72h, respectively.

Figure 4: PBMC cells infected with *Mtb* or stimulated with LPS exhibit differential expression when treated with VD₃ and analyzed at 24h and 72h. A) *VDR* gene expression; B) *RXRα* gene expression; C) *RXRβ* gene expression; D) *ESR1* gene expression; E) *ESR2* gene expression. The square brackets with * demonstrate the comparative analyzes performed with statistical significance ($p < 0.05$, 95% CI).

Figure 5: PBMC cells infected with *Mtb* or stimulated with LPS exhibit differential expression when treated with E₂ and analyzed at 24h and 72h. A) *VDR* gene expression; B) *RXRα* gene expression; C) *RXRβ* gene expression; D) *ESR1* gene expression; E) *ESR2* gene expression. The square brackets with * demonstrate the comparative analyzes performed with statistical significance ($p < 0.05$, 95% CI).

Figure 1:

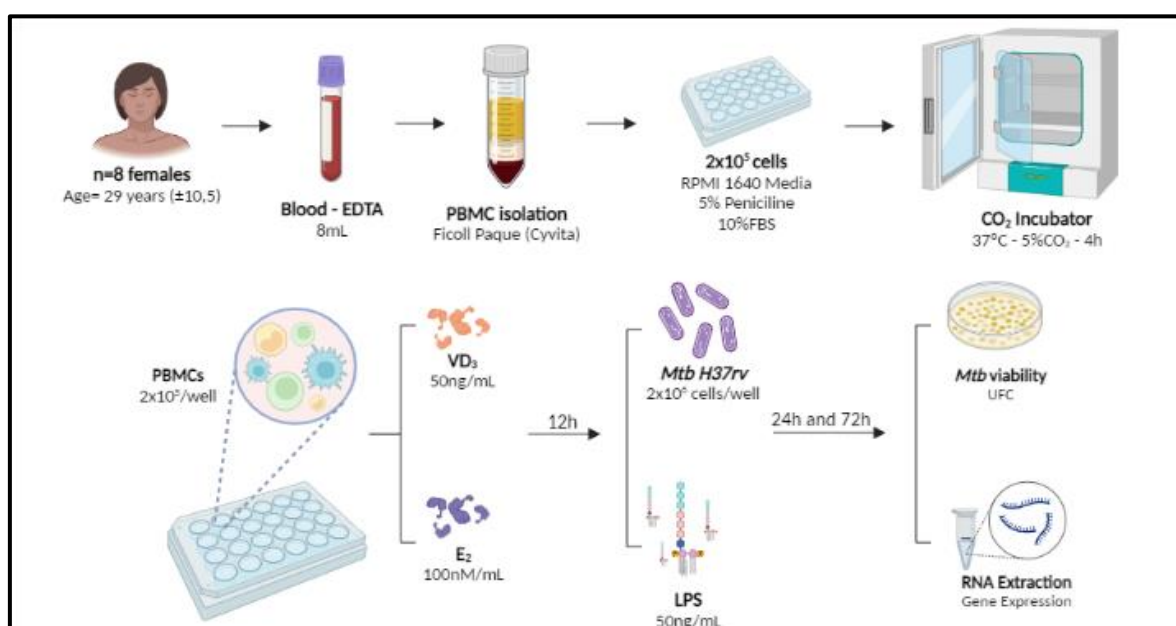


Figure 2:

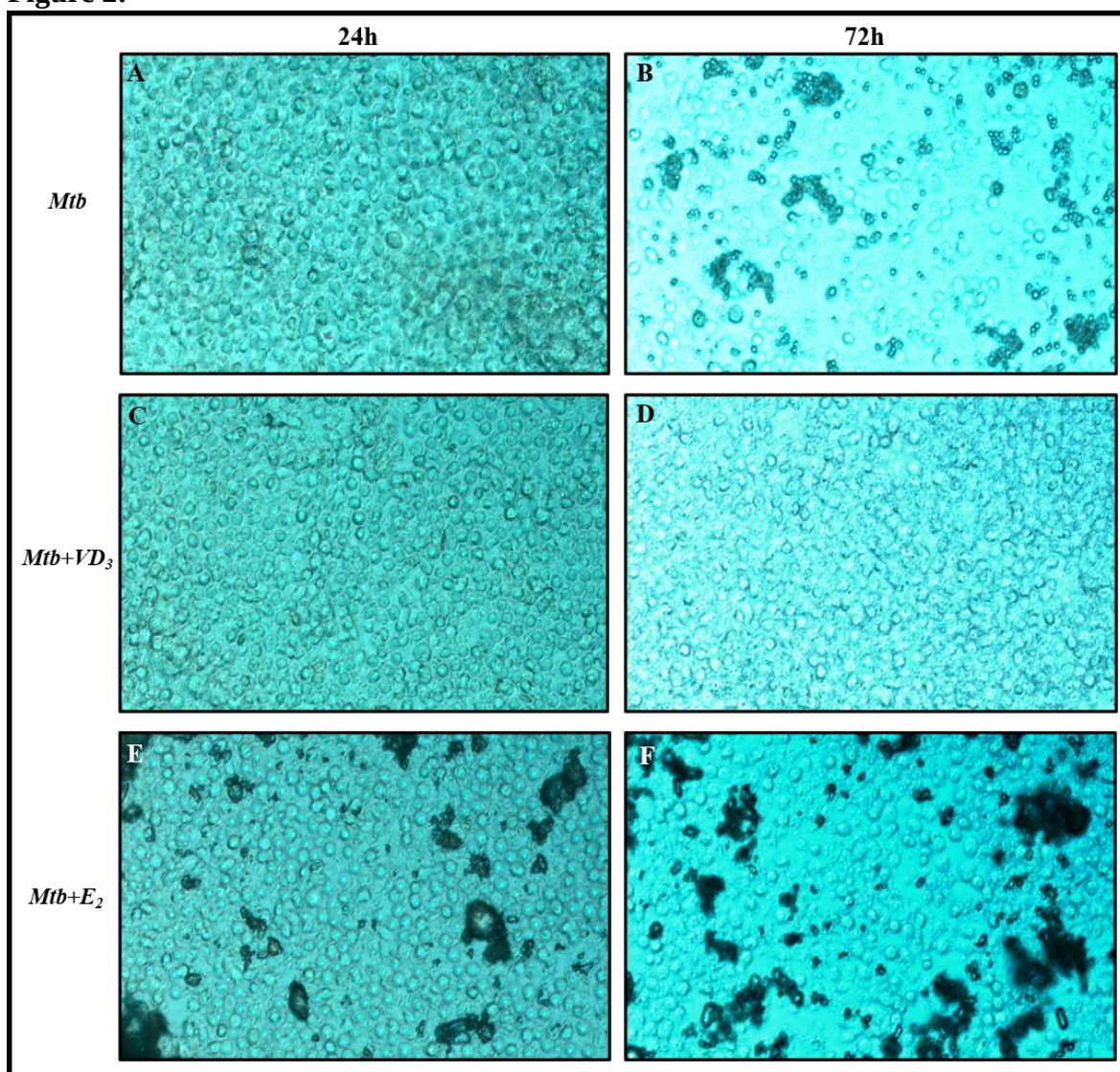
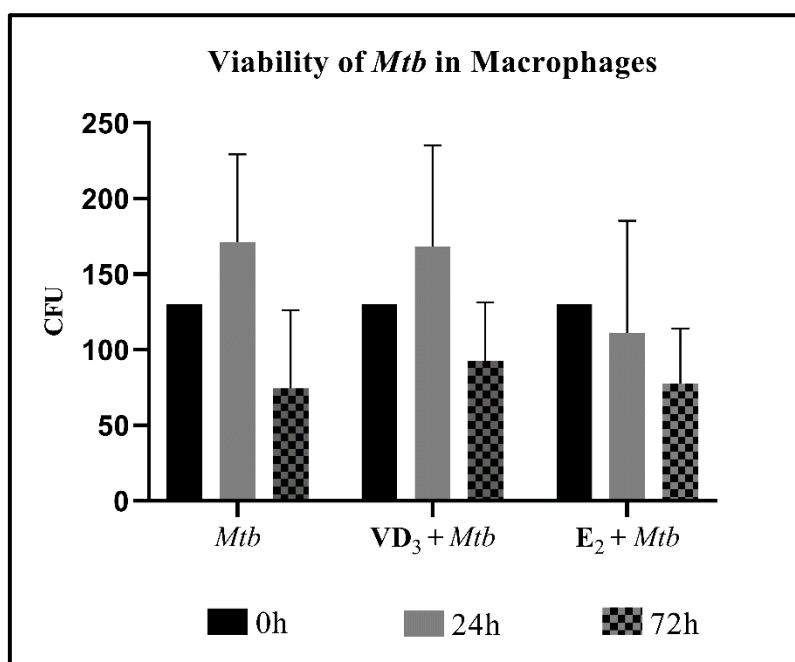


Figure 3:



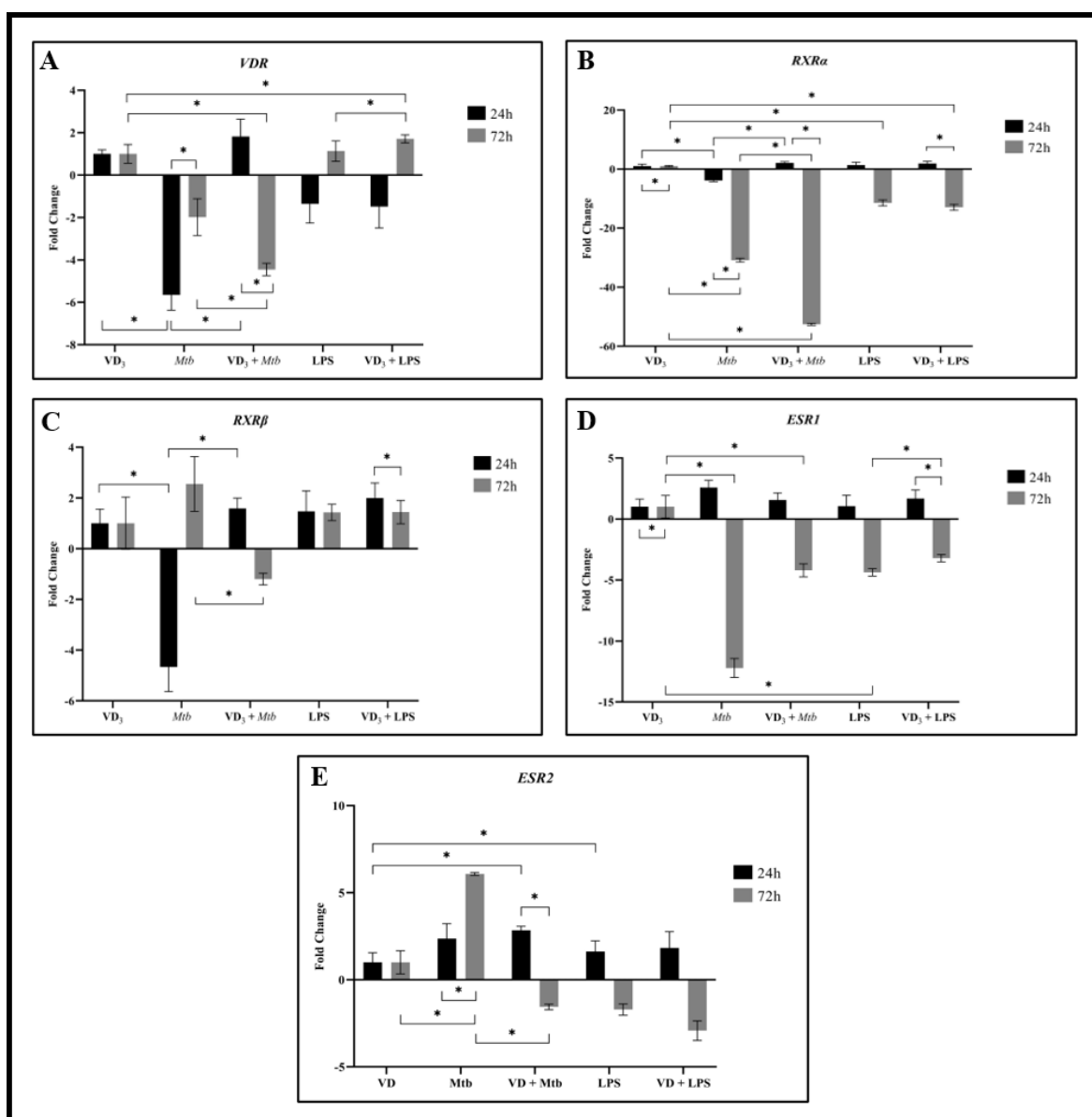
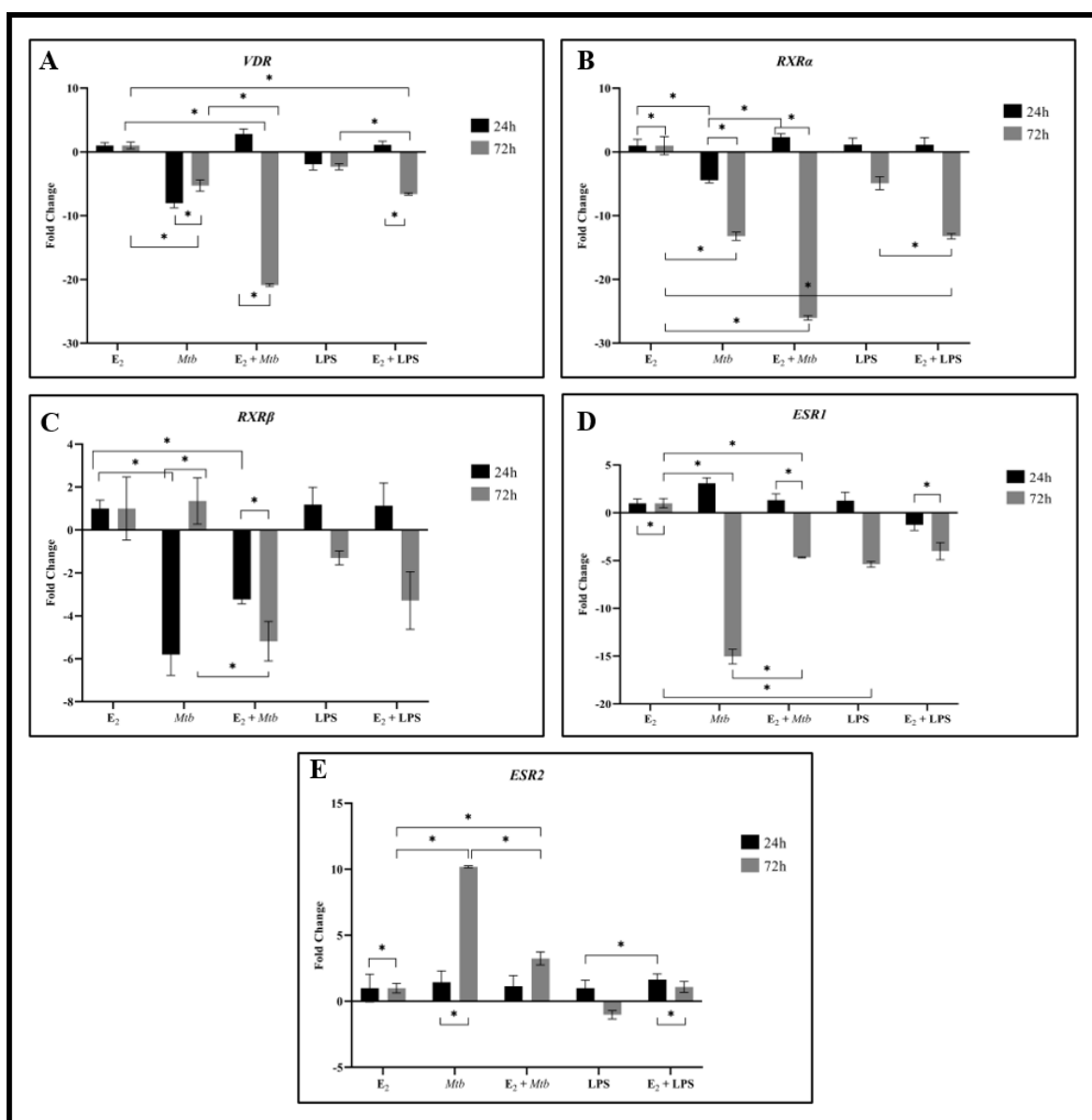
843 **Figure 4:**

Figure 5:

**5 ARTIGO 3 - STEROID HORMONES MODULATE PATTERN RECOGNITION
RECEPTORS EXPRESSION IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
INFECTED CELLS**

Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{1,2*}, Thays Maria Costa de Lucena^{1,2},
Virgínia Maria Barros de Lorena³, Michelle Christiane da Silva Rabello³, Jaqueline
de Azevêdo Silva^{1,2}

¹*Laboratory of Human Genetics and Molecular Biology, Genetics Department,
Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

²*Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brazil.*

³*Laboratory of Immunoparasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz
Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil*

Artigo a ser submetido na revista *Frontiers in Immunology* (IF: 8.786)

Article Title: Steroid hormones modulate Pattern Recognition Receptors expression in *Mycobacterium tuberculosis* infected cells

**Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{1,2*}, Thays Maria Costa de Lucena^{1,2},
Virgínia Maria Barros de Lorena³, Michelle Christiane da Silva Rabello³, Jaqueline
de Azevêdo Silva^{1,2}**

¹Laboratory of Human Genetics and Molecular Biology, Genetics Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³Laboratory of Immunoparasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

***Corresponding Author:**

PhD. Jaqueline de Azevêdo Silva

Jaqueline.azevedo@ufpe.br

ORCID: 0000-0003-1660-7299

Running title: “*Hormones influences PRRs in Tuberculosis*”

ABSTRACT

The role of steroid hormones in modulating the immune response in infectious diseases has been widely studied, especially in tuberculosis (TB). Through mechanisms that directly inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) or by immunomodulatory action, the hormones vitamin D₃ (VD₃) and 17 β -estradiol (E₂) are molecules of interest as therapeutic adjuvants in the treatment of TB. Thus, the objective of this work was to evaluate whether the steroid hormones VD₃ and E₂ influence the immune and inflammatory response against *Mtb* in vitro. For this, we accessed by RT-qPCR the gene expression levels of pattern recognition receptors (PRRs) NLRP3 and DC-SIGN and the cytokines activated by them, IL-1 β and IL-10 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) previously treated with the hormones and infected with the *Mtb* H37Rv strain. The measurement of cytokines IL-10, TNF, IFN- γ and IL-4 was also performed by cytometric bead assay from the culture supernatant. As main results, we found that VD₃ and E₂ downregulated the *NLRP3*, *IL-1 β* and *IL-10* expression in *Mtb* infected cells. In contrast, *DC-SIGN* expression was upregulated 24h post infection. Finally, VD₃ increased the release of the cytokine IFN- γ in *Mtb* infected cells. Therefore, our results demonstrate the immunoregulatory role of this hormone against *Mtb* infection *in vitro*.

Key-words: Tuberculosis; Vitamin D3; 17 β -estradiol; NLRP3; DC-Sign; IL-10; IL-1 β .

1 INTRODUCTION

Over the last decades, epidemics of respiratory diseases caused by pathogens, whether viruses or bacteria, have been a major public health problem, especially tuberculosis (TB), which has one of the highest global mortality (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2021).

TB is a communicable diseases and epidemiological data on the profile of the infected population, including complication rates and deaths, have been collected worldwide. Although infection rates in these diseases are similar between men and women, it is observed that sex and age may influence the clinical outcome of these diseases, since women of childbearing age, compared to men in the same age group, have lower rates of infection complications and death (NEYROLLES; QUINTANA-MURCI, 2009; NHAMOYEBONDE; LESLIE, 2014).

Steroid hormones have been the target of recent studies due to their immunomodulatory role in inflammation in cardiovascular and autoimmune diseases, as well as in infectious ones (CHOCANO-BEDOYA; RONNENBERG, 2009; KOVATS, 2015a; LOPES MARQUES, 2010; TRENTI et al., 2018). The main female hormone, 17 β -estradiol (E₂), stands out in this context, since women of childbearing age present high levels, but its production declines considerably after menopause, the age when women in general become more susceptible to cardiovascular and infectious diseases. Aging and menopause also influence the functioning of the immune system, with a significant reduction in the synthesis of sex steroid hormones and a concomitant decrease in the levels of immune cells and their functional capacity (CARR, 2003; DEGUCHI et al., 2001; KOVATS, 2018; PATEL et al., 2018).

Sex hormones are able to directly modulate immune system cells behavior (SUBA, 2020). Estrogens, mainly E₂, the most important female hormone, has a wider and stronger signaling among immune system cells towards a pro-inflammatory response, making women more prone in restraining infectious diseases during childbearing ages (SUBA, 2020).

Another steroid hormone with important immunomodulatory role in TB is the cholecalciferol or vitamin D₃ (VD₃), which has important effects on the respiratory system and can affect lung cell biology as well the host immune response against the *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (DEDICOAT, 2020; DINI; BIANCHI, 2012; KUWABARA et al., 2020). Several studies show that the deficiency of this hormone leads to a greater susceptibility in the development of respiratory infectious diseases, specially TB (CHARAN et al., 2012; SAEED et al., 2021; SELVARAJ, 2011).

The immunopathology of TB starts when infectious nuclei with bacilli inhaled by the individual reach the pulmonary alveoli and are phagocytosed by macrophages, which activates phagolysosome formation in an attempt to contain the *Mtb* infection (DRUSZCZYŃSKA et al., 2012). This is considered the primary control mechanism and occurs through the action of interferon gamma (IFN γ), but it can also be activated by VD₃ (FOGEL, 2015; SELVARAJ, 2011). The bacilli are simultaneously presented to CD4⁺ T lymphocytes by the major histocompatibility complex class II (MHC-II), expressed by macrophages, dendritic cells and B lymphocytes, which produce inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) and interleukins (IL) of the IL-1 family, capable of recruiting neutrophils and monocytes. Macrophages also activate a specific immune response against TB, releasing IL-12 and IL-18, which predominantly stimulate CD4⁺ T lymphocytes to release IFN- γ , which in turn stimulates *Mtb* phagocytosis and phagolysosome activation (CLIFF et al., 2015; GUPTA; KUMAR; AGRAWAL, 2018).

Mtb is recognized by a variety of pattern recognition receptors (PRRs) such as the nucleotide oligomerization receptors (NLRs) and the C-type leptin receptor (DC-SIGN or

CD209). Both receptors trigger their own immune and inflammatory response cascades to contain *Mtb* infection, whether in the activation of the inflammasome complex by NLRP3 resulting in the release of inflammatory cytokines such as IL-1 β , to the DC-SIGN that induces intracellular signalling of *Mtb* by secretion of an anti-inflammatory cytokine important in containing *Mtb* infection IL-10 (BARREIRO et al., 2006; DORHOI et al., 2012).

Regulation of inflammation is a critical factor that determines the outcome of *Mtb* infection. Excessive inflammation impairs cellular immunity, damages lung tissue, and can lead to lung cavitation and increased transmission. Conversely, decreased inflammation can impair bacterial control by delaying the induction of innate and adaptive immunity (NOVIKOV et al., 2011). New roles of steroid hormones have been studied from their immunomodulatory action to their role in the direct inhibition of microorganisms (BAEKE et al., 2010; LANG; ASPINALL, 2017).

In this way, investigating the influence of VD₃ and E₂ in the immune and inflammatory pathways triggered against *Mtb* infection can be an important weapon in the investigation of molecules that may help in the improvement of the host's immune response as well as in a containment of inflammation in these individuals.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Study design and ethical statements

Eight female individuals with a mean age of 26 years ($\pm$ 4.5) without TB, confirmed by a negative PPD test were used. As criteria, all subjects were healthy, without inflammatory, infectious or metabolic diseases and agreed to participate in the study by signing the informed consent form (ICF). All the procedures were in accordance with the 1964 Helsinki declaration and the ethical standards of the institutional and national research committee (National Ethical committee for research using human biological samples – PLATAFORMA BRASIL, under reference number CAAE: 52519821.0.0000.5208).

The cell culture and *Mtb* infection assays were carried out in a laboratory with biosecurity level 3 (NB3) located in the Aggeu Magalhães Research Institute. The gene expression assays were performed in the Human Genetics and Molecular Biology Laboratory (LGBMH) and in the Molecular Biology sector of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory, both located at the Federal University of Pernambuco (UFPE).

The present study was carried out in three phases:

1. Culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) previously treated with steroid hormones VD₃ or E₂, and after 12h of treatment cells were infected with *Mtb* H37Rv or stimulated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS);
2. Relative gene expression assays of *NLRP3*, *DC-SIGN* (CD209), *IL-1 β* and *IL-10* 24h and 72h after infection/stimulation;
3. Cytometric Bead Assay (CBA) for IFN γ , IL-10, TNF and IL-4 cytokines from cells supernatant 24h and 72h after infection/stimulation.

2.2 Cell culture assay

2.2.1 PBMC isolation and treatment

PBMCs were isolated from 8mL of peripheral whole blood collected in a tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) by Ficoll® Paque Plus methodology (Cytiva, USA). Cells were resuspended in Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 5% penicillin/streptomycin (100Ui), in a final concentration

of PBMCs of 2×10^5 cells per well in a 24 wells plate. The plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 4h until the treatment.

After the 4h incubation period, the PBMCs were treated with VD₃ (50ng/mL from Sigma-Aldrich) or with E₂ (100nM/mL from Sigma-Aldrich), returning to the CO₂ incubator for 12h (5% CO₂ and 37°C) until the stimulus/infection was performed. To verify whether the response triggered in the present experiment is exclusive to *Mtb* or occurs against pathogens in general, PBMCs were stimulated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS from Thermo Fisher Scientific) solution at a concentration of 50ng/mL at the same time the cells were infected with *Mtb H37Rv* (12h after hormone treatment). The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ until RNA extraction and supernatant collection were performed (24h and 72h post-stimulation/infection).

2.2.3 Culture and *Mtb* infection

A pre-culture of *Mtb H37Rv* (UFPEDA 82) was realized in Middlebrook 7H9 media (Becton Dickinson) supplemented with 10% v/v OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase from Becton Dickinson) and 0.05% v/v Tween 80 (polysorbate 80) until reaching an optical density (OD) 600 of 0.6, which represents approximately 1×10^8 bacteria/mL. *Mtb* cells were resuspended in RPMI supplemented with L-glutamine (200mM), gentamicin sulfate (5µg/L) and FBS (10%) in a 1×10^6 cells/mL concentration. per well infected. The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ until *Mtb* viability assay, RNA extraction and supernatant collection were performed (24h and 72h post-stimulation/infection).

2.3 Relative gene expression assay

2.3.1 RNA extraction and cDNA synthesis

After 24h and 72h of infection with *Mtb H37Rv* or stimulation with LPS, total RNA was extracted from PBMCs by TRIzol® methodology (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. The spectrophotometry (Nanodrop 2000c – Thermo Scientific) for quantification of nucleic acids and electrophoresis to verify the integrity of the material was used as quality control of the samples. Samples were stored at -80°C.

A standard concentration of 500ng from total RNA was used for cDNA synthesis performed by commercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

2.3.2 qPCR assays

Gene expression assays were performed according to standards proposed by Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Taqman fluorogenic probes (Thermo Fisher Scientific) were used for the target genes *NLRP3* (Hs00918082_m1), *DC-SIGN* (Hs01588349_m1), *IL-1β* (Hs01555410_m1) and *IL-10* (Hs00961622_m1). The reference genes *90 kDa heat shock protein (HSP90)* and *Beta-2-Microglobulin (B2M)* expression was performed using SyBR Green (Thermo Fisher Scientific) and the respective primers (*HSP90*= F: 5'-GGCCAACTCAGCTTTTGTGG-3', R: 5'-CATGGTGGAGTTGTCCCGAA-3' and *B2M*= F: 5'-AGATGAGTATGCCTGCCGTG-3', R: 5'-ACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3').

Assays were performed in biological and technical triplicate. All qPCR assays were performed on the ABI7500 instrument (Applied Biosystems). The analysis of relative gene expression was performed by the ΔCq method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.4 Cytometric Bead Assay for Th1 and Th2 cytokines

The supernatant levels of IFN-γ, IL-10, TNF and IL-4 were analyzed. Assays were performed by flow cytometry using FACSCalibur™ and BD™ Cytometric Bead Array

(CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences, USA) following the manufacture instructions. Standard curves were derived from standards and cytokine levels expressed as pg/mL. The CBA data was analysed using FCAP Array Software v.3.0.19.2091.

2.5 Statistical analysis

To analyze the distribution from the groups of the gene expression and CBA assays, the Shapiro-Wilk test was performed. After determining the normality of the groups T test and One Way ANOVA were used to normalized groups, Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests when not normalized. For all tests, *p-values* < 0.05 at a confidence interval (CI) of 95% were considered statistically significant. The analyzes were performed using the R Studio software version 4.1.2 and the graphs using the Graph Pad Prism version 9.0.0.

3 RESULTS

Gene expression profile from Mtb infected PBMCs

As seen in Figure 1, the steroid hormones VD₃ and E₂ were able to modulate a differential expression profile of the inflammation genes *NLRP3*, *DC-SIGN*, *IL-1B* and *IL-10*.

VD₃ treatment in cells infected with the *H37Rv Mtb* strain inhibited the expression of *NLRP3* (-3.48fold change - FC, *p*= 7x10⁻⁶), however this downregulation was only observed after 24h of infection, since after 72h infected PBMCs presented an increased expression of this gene (5.20FC, *p*= 3x10⁻⁶). When cells were stimulated with LPS, VD₃ downregulated the expression of this gene at both times (24h: -1.23FC, *p*= 0.3504 and 72h: -1.20FC, *p*= 0.0095) (Figure 1A).

This same expression profile found in cells infected with *Mtb* and previously treated with VD₃ was observed when cells were previously treated with E₂. A downregulation of -3.57FC (*p*= 0.0005) after 24h of infection and an upregulation of 3.55FC (*p*= 0.0001) after the 72h period was observed in *NLRP3* mRNA levels (Figure 1A).

For the *DC-SIGN* gene, we observed that VD₃ in *Mtb* infection was able to increase its expression after a period of 24h (3.24FC, *p*= 0.0135), observing a downregulation of this gene after 72h (-3.85FC, *p*= 0.0162). This expression profile was observed exclusively in *Mtb* infected cells, since in the presence of LPS a downregulation was observed after 24h (-1.4FC, *p*= 0.9031) and 72h (-2.56FC, *p*= 0.1081) of stimulation (Figure 1B).

When assessed this gene mRNA levels in cells previously treated with E₂, we observed the same gene expression profile found in cells treated with VD₃ after 24h of infection (4.90FC, *p*= 0.0043). On the other hand, after 72h of infection, E₂ was able to maintaining the upregulation of this gene in comparison to infected and untreated cells (1.84FC, *p*= 0.1432), however this result was not statistically significant. An upregulation of *DC-SIGN* was also observed in cells pretreated with E₂ and stimulated with LPS (24h: 2.11FC, *p*= 0.0016; and 72h: 1.94FC *p*= 0.0415) (Figure 1B).

Previous treatment with VD₃ decreased *IL-1B* gene expression 24h after infection with *Mtb* (-3.20FC, *p*= 0.0055) or stimulation with LPS (-1.34FC, *p*= 0.5456). On the other hand, after 72h period, an increase in mRNA levels of this gene was observed in both groups (VD₃ + *Mtb*: 6.54FC, *p*= 7x10⁻⁵; and VD₃ + LPS: 1.38FC, *p*= 0.9758) (Figure 1C).

When checking the expression of *IL-1B* in PBMCs previously treated with E₂, we observed a downregulation in all groups at both times: 24h (E₂ + *Mtb*: -2.55FC, *p*= 0.0033; and E₂ + LPS: -1.35FC, *p*= 0.0471) and 72h (E₂ + *Mtb*: -1.86FC, *p*= 0.0131; and E₂ + LPS: -1.00FC, *p*= 0.9706) (Figure 1C).

Interestingly, VD₃ decreased by -5.34FC (*p*= 0.0041) the expression of cytokine *IL-10* after 24h of infection with *Mtb*, the same profile was observed after 72h period (-6.43FC,

$p=8 \times 10^{-5}$). In contrast, after 72h of stimulation with LPS, VD₃ upregulated the expression of this cytokine at transcriptional level (2.9FC, $p=0.0934$) (Figure 1D).

When analyzed the expression of *IL-10* in cells previously treated with E₂, a downregulation of -1.40FC ($p=0.1123$) and -3.61FC ($p=0.0016$) was also observed after 24h and 72h of infection with *Mtb*, respectively. On the other hand, when cells treated with E₂ were stimulated with LPS, an upregulation of *IL-10* was observed at both times (24h: 1.31FC, $p=0.7792$; and 72h: 2.09FC, $p=0.004$) (Figure 1D).

Cytokine supernatant levels

By measuring the levels of IFN- γ , IL-10, TNF and IL-4 cytokines from the culture supernatant it was possible to observe that the steroid hormones VD₃ and E₂ are able to modulate the levels of these cytokines in the immune response against the *Mtb*.

VD₃ increased the concentration of IFN- γ in cells infected with *Mtb* (255.14pg/mL, $p=0.0001$), on the other hand, E₂ inhibited the release of this cytokine (13.05pg/mL, $p=1.3 \times 10^{-5}$) (Figure 2A).

When we evaluated the levels of IFN- γ in cells stimulated with LPS, the immunomodulatory effect generated by VD₃ and E₂ decreased the levels of this cytokine (737.91 pg/mL, $p=0.0078$ and 146.62 pg/mL, $p=0.0078$) (Figure 2A).

When IL-10 levels were measured in cells previously treated with VD₃, no difference was observed in *Mtb* infection or LPS stimulation. On the other hand, when cells were previously treated with E₂, we observed a decrease of 50% in the levels of this cytokine (24.76 pg/mL, $p=0.0476$) after 24h of *Mtb* infection. After 72h of infection, this decrease was even greater (13.69 pg/mL, $p=2.5 \times 10^{-5}$). This immunoregulatory effect of E₂ was also observed 24h after LPS stimulation (120.27 pg/mL, $p=0.0028$). Interestingly, after 72h of LPS stimuli, an increase in the levels of this cytokine was observed (197.47 pg/mL, $p=0.0009$) (Figure 2B).

VD₃ did not interfere with TNF release in *Mtb* infected cultures (1499.7 pg/mL, $p=0.2731$), however, when cells were stimulated with LPS, this hormone negatively regulated TNF release (5671.8 pg/mL, $p=3.86 \times 10^{-6}$) when compared to untreated group (8106.6 pg/mL) (Figure 2C).

On the other hand, E₂ was able to decrease TNF levels in cultures infected with *Mtb* (296.3 pg/mL, $p=5.52 \times 10^{-6}$) and in cells stimulated with LPS (2303.8 pg/mL, $p=8.08 \times 10^{-9}$) when compared to untreated group (Figure 2C).

We also measured IL-4 levels. However, no variation was observed between the levels of this cytokine in the analyzed groups (Figure 2D).

4 DISCUSSION

Steroid hormones such as VD₃ and E₂ have been important targets of recent studies due to their immunomodulatory role in inflammation in infectious diseases, especially TB (CHOCANO-BEDOYA; RONNENBERG, 2009; KOVATS, 2015a; LOPES MARQUES, 2010; TRENTI et al., 2018). In this work, we verified the role of these hormones in modulating a differential gene expression profile of *NLRP3*, *DC-SIGN*, *IL-1 β* and *IL-10* in *Mtb* infection *in vitro*.

VD₃ and E₂ downregulates NLRP3 and IL-1 β expression in *Mtb* infection

In TB, inflammasome activation is necessary for the activation/release of IL-1 β cytokine and consequent maintenance of the pro-inflammatory state (DORHOI et al., 2012). Several studies demonstrated that *Mtb* infection is able to activate the NLRP3 inflammasome

in vitro and in different cell types such as THP-1 monocyte-derived macrophages (MISHRA et al., 2010) and primary human macrophages derived from PBMCs (WONG; JACOBS JR, 2011). Furthermore, its activation restricts mycobacterial growth in macrophages (MISHRA et al., 2010).

For the activation of the NLRP3 inflammasome two signals are required, the first one occurs when PAMPs and other inflammatory mediators such as IL-1 β and TNF, bind to their respective receptors, and induce the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B), which promotes the transcription of genes dependent on this pathway, such as *NLRP3* and *IL-1 β* . A second signal can be initiated through various extracellular stimuli, such as cholesterol and uric acid crystals, which induce the release of reactive oxygen species (ROS) and trigger mitochondrial damage, promoting the oligomerization of NLRP3, inflammasome activation and IL-1 β release (LÓPEZ-REYES et al., 2020).

We accessed the mRNA levels of *NLRP3* and *IL-1 β* from *Mtb* infected cells and observe a decrease in the expression of these genes when the PBMCs were previously treated with VD₃. By binding to its receptor, the VDR, VD₃ acts by inhibiting the inflammatory effects triggered by NF- κ B, negatively regulating its activity and consequently the transcription of genes activated by this pathway, including *NLRP3* and *IL-1 β* (JIANG et al., 2021). VD₃/VDR also inhibits the formation of the NLRP3 inflammasome by translocating to the nucleus and forming a complex with this receptor, blocking its oligomerization (HUANG et al., 2018).

Although activation of NLRP3 with consequent release of IL-1 β is necessary to contain *Mtb* infection, regulation of inflammatory response is crucial for a more favorable clinical outcome for the host (KLEINNIJENHUIS et al., 2009). In our study, the regulation of these genes' expression by VD₃ was not exclusive to *Mtb* infection, since its downregulation was also observed when the cells were stimulated with LPS, indicating that the immunoregulatory role of VD₃ is not exclusive to *Mtb*.

The inhibitory effect of *NLRP3* and *IL-1 β* transcription generated by VD₃ was only observed in our study after 24h of infection. After 72h of *Mtb* infection an increase at mRNA levels of these genes was observed. We believe that as the treatment with VD₃ was performed only once and 12 hours before infection, after 72h of infection its availability had already decreased, and consequently the activities performed by it.

When *Mtb* infected cells were previously treated with E₂, the same gene expression profile of *NLRP3* was found, indicating the immunoregulatory role of this hormone in *Mtb* infection. To the best of our knowledge, this is the first *in vitro* study using E₂ as an immunoregulator against *Mtb*. However, in a study performed with Murine macrophage cells (RAW 264.7) stimulated with LPS and treated with E₂, downregulation of *NLRP3* was observed, corroborating with our findings. Zhang *et al.* (2021) attributed this downregulation to miR-29a-5p, which when stimulated with LPS has its expression inhibited, but is upregulated in the presence of E₂. In this way, miR-29a-5p upregulation induced by E₂ diminished RAW 264.7 cell inflammation response by inhibiting miR-29a-5p repression of *NLRP3* transcription. Corroborating our findings, Zhang *et al* found that E₂ downregulated *NLRP3* in a time-dependent manner, with a maximum decrease at 24 h after treatment (ZHANG et al., 2021).

In this same study, Zhang *et al.* observed the downregulation of *IL-1 β* when LPS-stimulated cells were treated with E₂ (ZHANG et al., 2021). In a study performed with human peripheral blood monocytes (HPBM) infected with *Staphylococcus aureus*, E₂ decreased the gene expression and production of proinflammatory cytokines, such as TNF and IL-1 β by inhibiting NF- κ B pathway (SOUZA et al., 2021). The same expression profile for *IL-1 β* and TNF levels were observed in our study when cells were stimulated with LPS

and infected with *Mtb*, these findings suggest that this hormone may be acting as a key immunoregulator of the pathogen-induced immune response.

VD₃ increases IFN- γ activity in *Mtb* infection

Mtb escapes of the macrophage-mediated antimicrobial response by blocking phagosome maturation and phagolysosome fusion, preventing lysosomal acidification and release of its products as antimicrobial peptides (MCDONOUGH; KRESS; BLOOM, 1993). A possible host mechanism to overcome this escape is the autophagy, with the creation of autophagosomes and subsequent fusion with lysosomes (SINGH et al., 2006). This mechanism is activated by IFN- γ , a pro-inflammatory cytokine produced and released by T lymphocytes after recognition of *Mtb* by the toll-like receptor 2 (TLR2) (DUTTA et al., 2012). In TB, this cytokine is produced during the first twenty days of infection, indicating that its action is required in the initial phase of infection (FOGEL, 2015).

In our experiments, treatment with VD₃ increased IFN- γ release when cells were infected with *Mtb*, but not when LPS stimulated, indicating an anti-*Mtb* mechanism. Fabri *et al* demonstrated that activation of autophagolysosomes is performed by IFN- γ in a VD₃/VDR-dependent pathway, and when in monocytes and macrophages, triggers the production of CYP27B1-hydroxylase, the enzyme responsible for converting VD₂ into VD₃, the active form of this hormone (FABRI et al., 2011). Interestingly, IFN- γ is able to increase the expression and release of antimicrobial peptides such as β -defensin 2 (*DEFB4*) and other cathelicidines in *Mtb* infection. On the other hand, this regulation depends of VD₃/VDR, which acts as an activation complex for the transcription of genes such as *DEFB4* and *hCAP18*, which has as final product the LL-37, a specific cathelicidin against *Mtb* (LIU et al., 2009; RIVAS-SANTIAGO et al., 2008; WAN et al., 2014).

Several studies have shown that IFN- γ stimulates not only the local production of VD₃, but of TNF, both of which play an active role in combating *Mtb* also by generating reactive oxygen and nitrogen intermediates, which are toxic to the bacillus (BOTTASSO et al., 2007; DENIS, 2008; FABRI et al., 2011; ROOK et al., 1986).

Thus, we believe that VD₃ seems to act, by mechanisms not yet known, regulating the expression/release of IFN- γ exclusively in *Mtb* infection, thus improving the responsiveness against *Mtb* in the initial phase of infection. It is noteworthy that this regulatory mechanism is a two-way street, since IFN- γ may regulate the local production of VD₃ and VDR expression (FABRI et al., 2011).

While VD₃ increases IFN- γ levels in our *Mtb*-infected cultures, E₂ inhibited the release of this cytokine in *Mtb* infected and LPS stimulated cells. Several studies highlight E₂ as an important immunoregulatory molecule and associate this response to a pro-inflammatory profile, however it is believed that this regulatory function of E₂ depends is concentration-dependent and varies according to target cell (KOVATS, 2015a; SOUZA et al., 2021; STRAUB, 2007). This is the first study to show *in vitro* influence of E₂ in response to *Mtb*. However, in a study carried out by Samimi *et al*, PBMCs from asthmatic patients who did not use medication had higher levels of IFN- γ when treated with E₂ (NEJATBAKHSH SAMIMI et al., 2021). On the other hand, a study conducted by Fox *et al*, showed that the expression of *IFN- γ* gene is upregulated by E₂ lymphoid cells that express estradiol receptors (ER), however this study did not evaluate the role of this hormone in an *Mtb* infected condition (FOX; BOND; PARSLow, 1991).

DC-SIGN is upregulated by VD₃ and E₂ in *Mtb* infection

DC-SIGN is one of the main receptors in the response against *Mtb*, however the response triggered by it act as a double-edged sword, since the Th2 response mediated by it can serve as an escape mechanism for *Mtb*. Variations in *DC-SIGN* gene expression can have

a strong impact on TB susceptibility and pathogenesis (HOSSAIN; NORAZMI, 2013; MÖLLER; HOAL, 2010; NEYROLLES; GICQUEL; QUINTANA-MURCI, 2006).

Both hormones used in our experiments increased the expression of *DC-SIGN* in *Mtb* infected cells after 24h and decreased after 72h. Afsal *et al*, founded a downregulation of *DC-SIGN* expression modulated by VD_3 in monocytes/macrophages after 72h of *Mtb* infection (AFSAL; SELVARAJ, 2016). The same expression profile was founded in VD_3 treated THP1 cells (PUIG-KRÖGER *et al.*, 2004). Some studies have shown that the recognition of *Mtb* by DC-SIGN inhibits the immunosuppressive function of the dendritic cell and the differentiation of monocytes/macrophages in these cells (GEIJTENBEEK *et al.*, 2003). This last mechanism would be related to a possible decrease in the number of dendritic cells with a consequent decrease in the expression of *DC-SIGN*.

As far as we know, this is the first research that relates the immunoregulatory role of E_2 with the recognition of *Mtb* or any other pathogen by DC-SIGN. After 24h of infection with *Mtb*, E_2 upregulated the expression of DC-SIGN, however, after 72h a decrease in the mRNA levels of this gene was observed. On the other hand, *Mtb* is able to use DC-SIGN as escape mechanism from immune response, increasing the release of IL-10, polarizing a Th2 response and compromising the efficiency of the host's immune response against the bacilli (GEIJTENBEEK *et al.*, 2003; HOSSAIN; NORAZMI, 2013). Since VD_3 and E_2 were able to downregulated *DC-SIGN* expression, the use of these hormones can be an important ally in preventing the use of this pathway by *Mtb* as an escape mechanism from the immune response.

As the main female hormone, E_2 plays anti-inflammatory, antioxidant and organ-protective roles in the organism. Recently, this hormone has been study as a therapeutic drug in many diseases, such as inflammatory bowel disease (CHEN *et al.*, 2019) and obesity (BHARDWAJ *et al.*, 2019), and it may become an important ally in the treatment of infectious diseases as TB.

VD_3 downregulated *IL-10* gene expression, however did not change protein levels. This result was not what was expected since this hormone positively regulates the transcriptional and protein expression of this cytokine (CANTORNA, 2010; KHOO *et al.*, 2011). We believe that because it is an anti-inflammatory cytokine with a critical role in establishing the chronic phase of TB, the time observed and the experimental model used were not adequate. In contrast, in infection by other pathogens mimicked by LPS stimulation, VD_3 and E_2 increased *IL-10* mRNA levels. Indicating that the mechanism of IL-10 release suppression in the acute phase of infection is specific for *Mtb*.

5 CONCLUSIONS

VD_3 and E_2 have been studied as therapeutic adjuvants for the treatment of many inflammatory diseases. The results presented here are strong evidence of the role of these hormones in the regulation of the immune and inflammatory response against *Mtb* infection. More studies are needed to define the best strategy for using these hormones and improve TB treatment.

6 CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7 AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: JAS MEAB MR. Performed the experiments: MEAB MR TMCL. Performed CBA analyses: VMBL MEAB TMCL. Analyzed the data: MEAB TMCL. Wrote the paper: MEAB TMCL JAS.

8 FUNDINGS

This work was funded by FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), grant number APQ 0952-2.02/15 and public notice for research productivity from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant number 312366/2021-3.

9 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities.

10 REFERENCES

- Afsal, K., Selvaraj, P., 2016. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of mannose receptor, DC-SIGN and autophagy genes in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 99, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.010>
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Mathieu, C., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.001>
- Barreiro, L.B., Neyrolles, O., Babb, C.L., Tailleux, L., Quach, H., McElreavey, K., Helden, P.D. van, Hoal, E.G., Gicquel, B., Quintana-Murci, L., 2006. Promoter Variation in the DC-SIGN–Encoding Gene CD209 Is Associated with Tuberculosis. *PLoS Med.* 3, e20. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030020>
- Bhardwaj, P., Ikeda, T., Zhou, X.K., Wang, H., Zheng, X.E., Giri, D.D., Elemento, O., Verma, A., Miyazawa, M., Mukherjee, S., Falcone, D.J., Wendel, N.K., Scherr, D.S., Dannenberg, A.J., 2019. Supplemental estrogen and caloric restriction reduce obesity-induced periprosthetic white adipose inflammation in mice. *Carcinogenesis* 40, 914–923. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz088>
- Bottasso, O., Bay, M.L., Besedovsky, H., del Rey, A., 2007. The Immuno-endocrine Component in the Pathogenesis of Tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 66, 166–175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01962.x>
- Cantorna, M.T., 2010. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 69, 286–289. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001722>
- Carr, M.C., 2003. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2404–2411. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030242>
- Charan, J., Goyal, J., Saxena, D., Yadav, P., 2012. Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 3, 300. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.103685>
- Chen, C., Gong, X., Yang, X., Shang, X., Du, Q., Liao, Q., Xie, R., Chen, Y., Xu, J., 2019. The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease (Review). *Oncol. Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10983>
- Chocano-Bedoya, P., Ronnenberg, A.G., 2009. Vitamin D and tuberculosis. *Nutr. Rev.* <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00195.x>
- Cliff, J.M., Kaufmann, S.H.E., Mcshane, H., van Helden, P., O’Garra, A., 2015. The human immune response to tuberculosis and its treatment: A view from the blood. *Immunol. Rev.* 264, 88–102. <https://doi.org/10.1111/imr.12269>
- Dedicoat, M., 2020. Where next with for vitamin D and tuberculosis? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 24, 265–265. <https://doi.org/10.5588/ijtld.20.0045>

- Deguchi, K., Kamada, M., Irahara, M., Maegawa, M., Yamamoto, S., Ohmoto, Y., Murata, K., Yasui, T., Yamano, S., Aono, T., 2001. Postmenopausal changes in production of type 1 and type 2 cytokines and the effects of hormone replacement therapy. *Menopause* 8, 266–273. <https://doi.org/10.1097/00042192-200107000-00008>
- DENIS, M., 2008. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin. Exp. Immunol.* 84, 200–206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb08149.x>
- Dini, C., Bianchi, A., 2012. The potential role of vitamin D for prevention and treatment of tuberculosis and infectious diseases. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48, 319–327. https://doi.org/10.4415/ANN_12_03_13
- Dorhoi, A., Nouailles, G., Jörg, S., Hagens, K., Heinemann, E., Pradl, L., Oberbeck-Müller, D., Duque-Correa, M.A., Reece, S.T., Ruland, J., Brosch, R., Tschopp, J., Gross, O., Kaufmann, S.H.E., 2012. Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* 42, 374–384. <https://doi.org/10.1002/eji.201141548>
- Druszczyńska, M., Kowalewicz-Kulbat, M., Fol, M., Włodarczyk, M., Rudnicka, W., 2012. Latent *M. tuberculosis* infection - Pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies. *Polish J. Microbiol.* 61, 3–10. <https://doi.org/10.33073/pjm-2012-001>
- Dutta, R.K., Kathania, M., Raje, M., Majumdar, S., 2012. IL-6 inhibits IFN- γ induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 942–954. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.021>
- Fabri, M., Stenger, S., Shin, D.-M., Yuk, J.-M., Liu, P.T., Realegeno, S., Lee, H.-M., Krutzik, S.R., Schenk, M., Sieling, P.A., Teles, R., Montoya, D., Iyer, S.S., Bruns, H., Lewinsohn, D.M., Hollis, B.W., Hewison, M., Adams, J.S., Steinmeyer, A., Zugel, U., Cheng, G., Jo, E.-K., Bloom, B.R., Modlin, R.L., 2011. Vitamin D Is Required for IFN- γ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. *Sci. Transl. Med.* 3, 104ra102–104ra102. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003045>
- Fogel, N., 2015. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* 95, 527–531. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.017>
- Fox, H.S., Bond, B.L., Parslow, T.G., 1991. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J. Immunol.* 146, 4362 LP – 4367.
- Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmelk, B., van Kooyk, Y., 2003. *Mycobacteria* Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J. Exp. Med.* 197, 7–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20021229>
- Gupta, N., Kumar, R., Agrawal, B., 2018. New players in immunity to tuberculosis: The host microbiome, lung epithelium, and innate immune cells. *Front. Immunol.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00709>
- Hossain, M.M., Norazmi, M.-N., 2013. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection—The Double-Edged Sword? *Biomed Res. Int.* 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/179174>
- Huang, H., Hong, J.-Y., Wu, Y.-J., Wang, E.-Y., Liu, Z.-Q., Cheng, B.-H., Mei, L., Liu, Z.-G., Yang, P.-C., Zheng, P.-Y., 2018. Vitamin D receptor interacts with NLRP3 to restrict the allergic response. *Clin. Exp. Immunol.* 194, 17–26. <https://doi.org/10.1111/cei.13164>
- Jiang, S., Zhang, H., Li, X., Yi, B., Huang, L., Hu, Z., Li, A., Du, J., Li, Y., Zhang, W., 2021. Vitamin D/VDR attenuate cisplatin-induced AKI by down-regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 206, 105789. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105789>

- Khoo, A.-L., Chai, L.Y.A., Koenen, H.J.P.M., Oosting, M., Steinmeyer, A., Zuegel, U., Joosten, I., Netea, M.G., van der Ven, A.J.A.M., 2011. Vitamin D3 down-regulates proinflammatory cytokine response to *Mycobacterium tuberculosis* through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production. *Cytokine* 55, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.04.016>
- Kleinnijenhuis, J., Joosten, L.A.B., van de Veerdonk, F.L., Savage, N., van Crevel, R., Kullberg, B.J., van der Ven, A., Ottenhoff, T.H.M., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., 2009. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 39, 1914–1922. <https://doi.org/10.1002/eji.200839115>
- Kovats, S., 2018. Sex Hormones Regulate Innate Immune Cells and Promote Sex Differences in Respiratory Virus Infection 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01653>
- Kovats, S., 2015. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>
- Kuwabara, A., Tsugawa, N., Ao, M., Ohta, J., Tanaka, K., 2020. Vitamin D deficiency as the risk of respiratory tract infections in the institutionalized elderly: A prospective 1-year cohort study. *Clin. Nutr. ESPEN* 40, 309–313. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2020.08.012>
- Lang, P.O., Aspinall, R., 2017. Vitamin D Status and the Host Resistance to Infections: What It Is Currently (Not) Understood. *Clin. Ther.* 39, 930–945. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.04.004>
- Liu, P.T., Schenk, M., Walker, V.P., Dempsey, P.W., Kanchanapoomi, M., Wheelwright, M., Vazirnia, A., Zhang, X., Steinmeyer, A., Zügel, U., Hollis, B.W., Cheng, G., Modlin, R.L., 2009. Convergence of IL-1 β and VDR Activation Pathways in Human TLR2/1-Induced Antimicrobial Responses. *PLoS One* 4, e5810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005810>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopes Marques, C., 2010. The Importance of vitamin D levels in autoimmune disease. *Bras J Rheumatol* 50, 67–80. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000100007>
- López-Reyes, A., Martínez-Armenta, C., Espinosa-Velázquez, R., Vázquez-Cárdenas, P., Cruz-Ramos, M., Palacios-Gonzalez, B., Gomez-Quiroz, L.E., Martínez-Nava, G.A., 2020. NLRP3 Inflammasome: The Stormy Link Between Obesity and COVID-19. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.570251>
- McDonough, K.A., Kress, Y., Bloom, B.R., 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* 61, 2763–2773. <https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2763-2773.1993>
- Mishra, B.B., Moura-Alves, P., Sonawane, A., Hacohen, N., Griffiths, G., Moita, L.F., Anes, E., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell. Microbiol.* 12, 1046–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01450.x>
- Möller, M., Hoal, E.G., 2010. Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 90, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.02.002>
- Nejabatbakhsh Samimi, L., Fallahpour, M., Khoshmirsafa, M., Moosavi, S.A.J., Bayati, P., Baharlou, R., Falak, R., 2021. The impact of 17 β -estradiol and progesterone therapy on peripheral blood mononuclear cells of asthmatic patients. *Mol. Biol. Rep.* 48, 297–306. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06046-6>

- Neyrolles, O., Gicquel, B., Quintana-Murci, L., 2006. Towards a crucial role for DC-SIGN in tuberculosis and beyond. *Trends Microbiol.* 14, 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.007>
- Neyrolles, O., Quintana-Murci, L., 2009. Sexual Inequality in Tuberculosis. *PLoS Med.* 6, e1000199. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000199>
- Nhamoyebonde, S., Leslie, A., 2014. Biological Differences Between the Sexes and Susceptibility to Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 209, S100–S106. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu147>
- Novikov, A., Cardone, M., Thompson, R., Shenderov, K., Kirschman, K.D., Mayer-Barber, K.D., Myers, T.G., Rabin, R.L., Trinchieri, G., Sher, A., Feng, C.G., 2011. Mycobacterium tuberculosis Triggers Host Type I IFN Signaling To Regulate IL-1 β Production in Human Macrophages. *J. Immunol.* 187, 2540–2547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100926>
- Patel, S., Homaei, A., Raju, A.B., Meher, B.R., 2018. Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. *Biomed. Pharmacother.* 102, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.078>
- Puig-Kröger, A., Serrano-Gómez, D., Caparrós, E., Domínguez-Soto, A., Relloso, M., Colmenares, M., Martínez-Muñoz, L., Longo, N., Sánchez-Sánchez, N., Rincon, M., Rivas, L., Sánchez-Mateos, P., Fernández-Ruiz, E., Corbí, A.L., 2004. Regulated Expression of the Pathogen Receptor Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin in THP-1 Human Leukemic Cells, Monocytes, and Macrophages. *J. Biol. Chem.* 279, 25680–25688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311516200>
- Rivas-Santiago, B., Hernandez-Pando, R., Carranza, C., Juarez, E., Contreras, J.L., Aguilar-Leon, D., Torres, M., Sada, E., 2008. Expression of Cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 76, 935–941. <https://doi.org/10.1128/IAI.01218-07>
- Rook, G.A., Steele, J., Fraher, L., Barker, S., Karmali, R., O’Riordan, J., Stanford, J., 1986. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. *Immunology* 57, 159–63.
- Saeed, B.Q., Jairoun, A.A., Ashraf Khamis, A., Abdulrahim, L., Abobakr Aljomhi, A., Adrees, A.O., Saeed Fahady, K., Al-Hajjaj, M., 2021. Vitamin D Deficiency and Insufficiency Among University Students: Prevalence, Risk Factors, and the Association Between Vitamin D Deficiency and Episodes of Respiratory Tract Infections. *Risk Manag. Healthc. Policy* Volume 14, 2733–2741. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S308754>
- Selvaraj, P., 2011. Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Cathelicidin in the Treatment of Tuberculosis, *Vitamins and Hormones*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386960-9.00013-7>
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., Deretic, V., 2006. Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria. *Science* (80-.). 313, 1438–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1129577>
- Souza, C.L.S. e, Barbosa, C.D., Coelho, H.I.L.N., Santos Júnior, M.N., Barbosa, E.N., Queiroz, É.C., Teles, M.F., dos Santos, D.C., Bittencourt, R.S., Soares, T. de J., Oliveira, M.V., Timenetsky, J., Campos, G.B., Marques, L.M., 2021. Effects of 17 β -Estradiol on Monocyte/Macrophage Response to Staphylococcus aureus: An In Vitro Study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.701391>
- Straub, R.H., 2007. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr. Rev.* 28, 521–574. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>

- Suba, Z., 2020. Prevention and Therapy of COVID-19 via Exogenous Estrogen Treatment for Both Male and Female Patients ; An Opinion Paper 75–85.
- Trenti, A., Tedesco, S., Boscaro, C., Trevisi, L., Bolego, C., Cignarella, A., 2018. Estrogen, angiogenesis, immunity and cell metabolism: Solving the puzzle. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030859>
- Wan, M., van der Does, A.M., Tang, X., Lindbom, L., Agerberth, B., Haeggström, J.Z., 2014. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* <https://doi.org/10.1189/jlb.0513304>
- WHO, 2022. The top 10 causes of death [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed 2.16.22).
- Wong, K., Jacobs Jr, W.R., 2011. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 13, 1371–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01625.x>
- World Healthy Organization, 2021. Global Tuberculosis Report.
- Zhang, Man-li, Chen, H., Yang, Z., Zhang, Man-na, Wang, X., Zhao, K., Li, X., Xiu, N., Tong, F., Wang, Y., 2021. 17 β -Estradiol Attenuates LPS-Induced Macrophage Inflammation In Vitro and Sepsis-Induced Vascular Inflammation In Vivo by Upregulating miR-29a-5p Expression. *Mediators Inflamm.* 2021, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2021/9921897>

FIGURES

Figure 1:

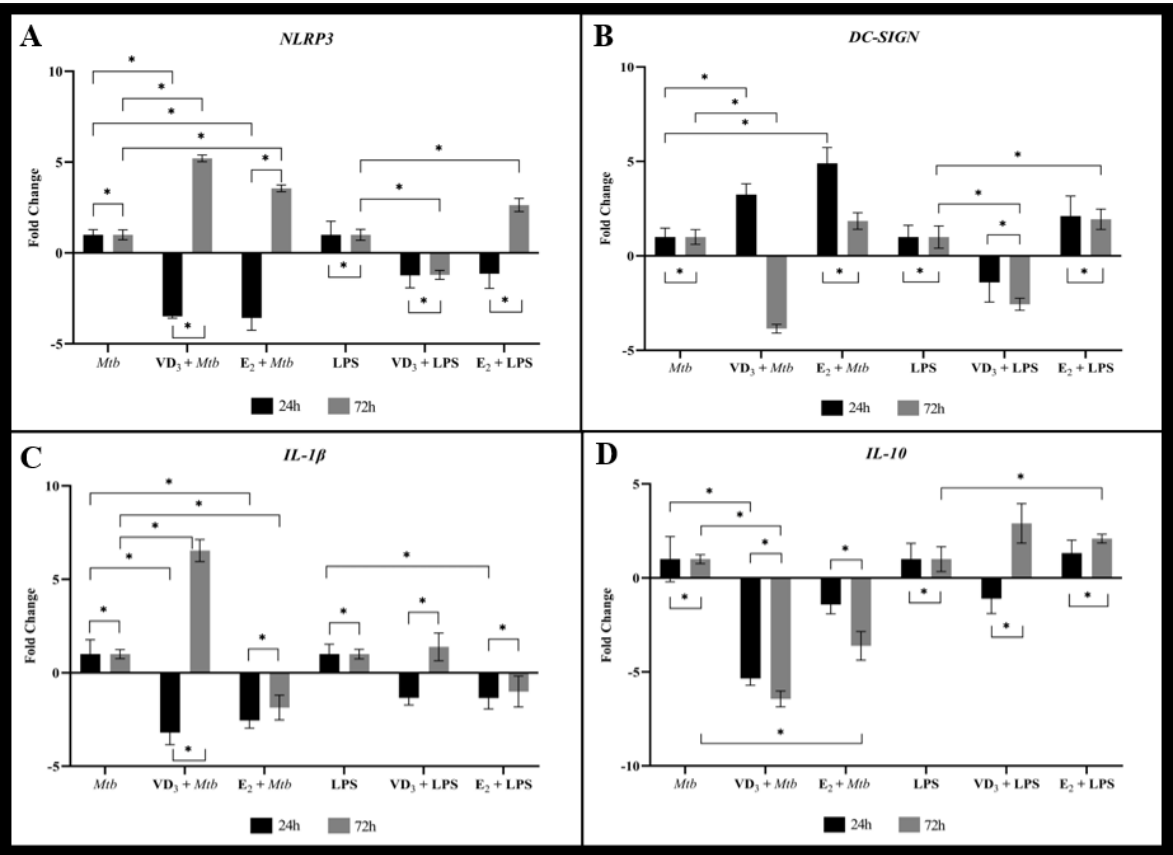


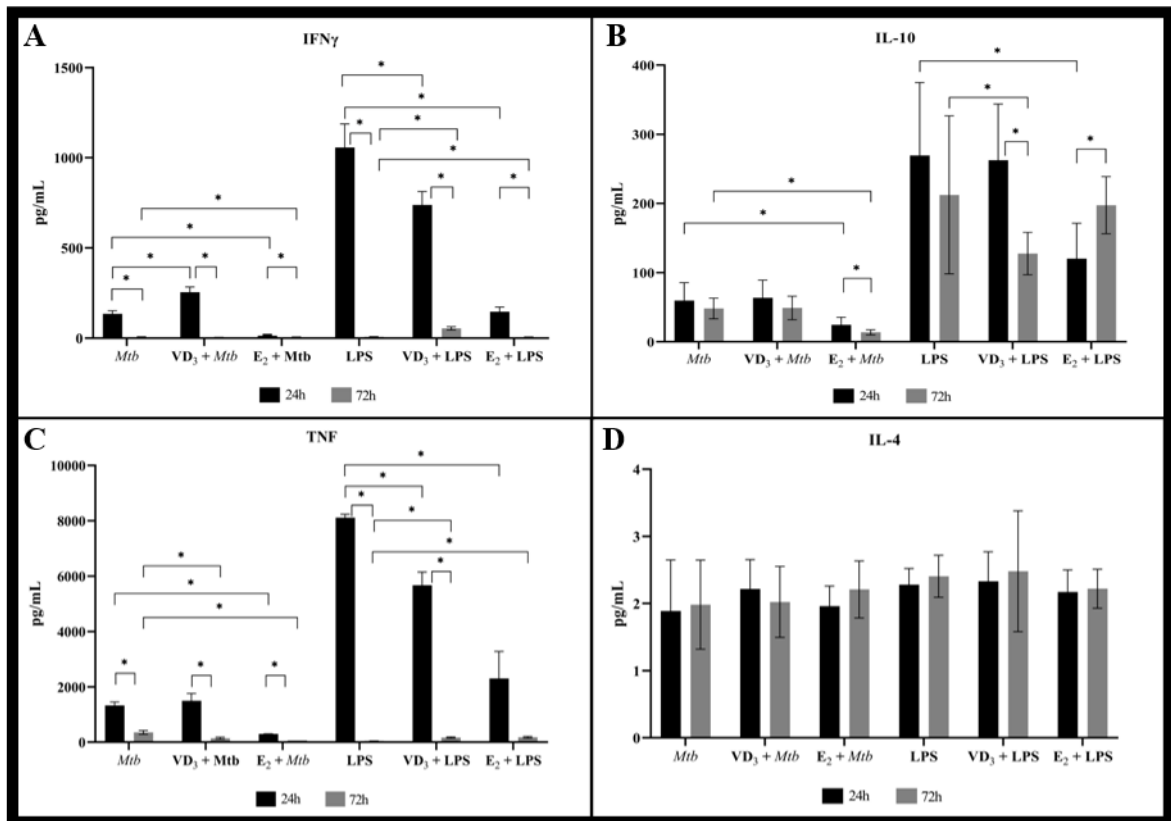
Figure 2:**FIGURES LEGENDS**

Figure 1: Gene expression profile from PBMCs pretreated with VD₃/E₂ and *Mtb* infected or LPS stimulated. **A:** *NLPR3* expression profile; **B:** *DC-SIGN* expression profile; **C:** *IL-1 β* expression profile; **D:** *IL-10* expression profile. * $p < 0.05$; Gene expression from *Mtb* and LPS, but non treated groups, was normalized to 1.

Figure 2: Cytokine levels from supernatant of PBMCs pretreated with VD₃/E₂ and *Mtb* infected or LPS stimulated. **A:** IFN- γ ; **B:** IL-10; **C:** TNF; **D:** IL-4. * $p < 0.05$;

6 DISCUSSÃO GERAL

Para testar a hipótese de que os hormônios esteroides (VD₃ e E₂) são capazes de modular uma resposta imune mais favorável ao indivíduo frente à infecção pelo *Mtb*, o presente estudo avaliou desde a influência de SNPs do *VDR* e de genes da inflamação (*TLR4* e *MYD88*) na susceptibilidade a TB, até a influência da VD₃ e do E₂ na resposta à infecção pelo *Mtb in vitro*.

O primeiro capítulo desta tese se trata de um estudo de associação entre polimorfismos do *VDR* e a susceptibilidade à TB ativa. Neste trabalho foram selecionados três TagSNPs e dois SNPs funcionais do *VDR* (*FokI* e *Cdx2*) que, por desequilíbrio de ligação, cobrem todo o gene. Observamos a associação entre o alelo T e o genótipo T/T do SNP *FokI* (rs2228570) do *VDR* com uma menor susceptibilidade à TB ativa. Este polimorfismo é capaz de gerar um sítio da iniciação da tradução (AUG - metionina) três códons à montante do códon original, resultando como produto uma proteína três aminoácidos (aa) maior (427aa). De acordo com estudos realizados *in silico*, a isoforma mais longa do *VDR* interage de forma mais eficiente com o fator de transcrição II B (TFIIB), o que pode levar a uma atividade mais intensa do maquinário transcricional (DZHEBIR et al., 2016). Uma vez que a presença da variante T deste SNP pode aumentar a interação do complexo VD₃/*VDR*, isso potencializaria a resposta imune dependente da VD₃, dificultando o estabelecimento da infecção e aumentando a resistência do hospedeiro.

O TagSNP rs4760648 do *VDR* marca seis outros polimorfismos, entre eles o rs2853564 que está relacionado a uma maior susceptibilidade à asma com hiper-reatividade dos brônquios e bronquíolos. Em nosso trabalho, o genótipo T/T está associado a uma maior susceptibilidade à TB ativa. Essa variante pode estar

relacionada à suscetibilidade diferencial às doenças pulmonares, correlacionando-se com a diminuição da capacidade de resposta imune de macrófagos e pneumócitos no estabelecimento da infecção (WJST, 2005), o que acarretaria numa menor resistência do hospedeiro.

Ainda como resultado do estudo de associação de polimorfismos do VDR (Capítulo I), verificamos que, para a população estudada, o alelo T e o genótipo T/T do TagSNP rs1540339 estão associados a uma menor susceptibilidade à TB ativa. Este TagSNP marca três outros SNPs, dentre eles o rs2239181, que, em estudo que avaliou a resposta imune adaptativa de crianças vacinadas contra o sarampo na população Alemã, a presença dessa variante foi relacionada a um aumento na atividade e nos níveis de IFN- γ nesses indivíduos (OVSYANNIKOVA et al., 2012). Com base nesta associação, o mesmo pode estar ocorrendo na população estudada, uma vez que o IFN- γ é uma das primeiras citocinas da resposta imune celular que surge para conter o processo de infecção pelo *Mtb* (BERRY et al., 2010). Esse SNP pode estar relacionado à menor predisposição a TB ativa, uma vez que esses indivíduos apresentam um fator associado ao aumento da atividade dessa citocina (CHANG; LEUNG, 2010).

Por fim, no capítulo I verificamos uma regulação negativa da expressão do VDR em pacientes com TB em comparação a indivíduos saudáveis, e que ao estratificarmos o grupo de pacientes de acordo com os genótipos do SNP *FokI*, um aumento da expressão deste gene foi observado em portadores do alelo variante (T). Entretanto esse resultado não foi estatisticamente significativo. Esta falta de significância estatística pode ser devido ao número limitado de pacientes envolvidos no estudo. No entanto, em um estudo conduzido por Panda et al., níveis de mRNA do VDR também estavam aumentados nos portadores do alelo T, bem

como os níveis da catelecidina LL-37 (PANDA et al., 2019). Como dito anteriormente, a isoforma variante (427aa) interage mais fortemente com o TFIIB, o que pode levar a um aumento da transcrição dos genes modulados pelo complexo VD₃/VDR, dentre eles o próprio VDR e o gene *hCAP18*, que tem como um dos produtos a catelecidina LL-37.

O Capítulo II desta tese foi realizado um estudo de associação de polimorfismos dos genes da inflamação *TLR4* e *MYD88* com a susceptibilidade à TB ativa. Ao observamos a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos rs6853 (A>G) do *MYD88* e rs7873784 (C>G) do *TLR4*, ambas se apresentaram conservadas na população estudada (Nordeste brasileiro). Entretanto, quando verificadas as frequências de acordo com a etnia dos indivíduos envolvidos no estudo, identificamos que o genótipo G/G do SNP rs6853 do *MYD88* está associado a uma menor susceptibilidade na população caucasiana. Em contrapartida, o genótipo variante homozigoto do rs7873784 (G/G) está associado a uma maior susceptibilidade em indivíduos que se autodeclararam afrodescendentes. Devido a população do nordeste brasileiro apresentar uma alta miscigenação, é difícil caracterizar a etnia com base apenas no fenótipo sem o uso de marcadores genéticos. Assim, para afirmar se existe uma real relação entre esses genótipos e a suscetibilidade diferencial à TB nas diferentes etnias, seria necessária uma melhor caracterização genética da população em relação à ancestralidade.

O Capítulo III desta tese demonstrou que os hormônios esteróides VD₃ e E₂ influenciam na expressão gênica do VDR, *RXRα*, *RXRβ*, *ESR1* e *ESR2* em culturas de PBMCs infectadas com a cepa *H37Rv Mtb*. No intuito de verificar se essa variação de expressão é específica na infecção pelo *Mtb* ou é uma resposta geral

à infecção por diferentes patógenos, células também foram estimuladas com LPS, mimetizando a infecção por outros patógenos.

Observamos que a VD_3 regula positivamente a expressão do *VDR*, *RXR α* e *RXR β* na infecção pelo *Mtb*. Este aumento observado após 24h de infecção pode ser explicado devido ao papel central desse hormônio na resposta imediata ao *Mtb*: a ativação do fagolisossomo (LALVANI; CONNELL, 2012; XU et al., 2014). Em contrapartida, após 72h da infecção, observamos uma diminuição nos níveis de mRNA desses genes sugerindo uma possível baixa disponibilidade de VD_3 , uma vez que as células receberam o tratamento uma única vez 12h antes da infecção. Além disso, o tempo médio de meia vida desses transcritos é de 8h para o *VDR* (KONGSBAK et al., 2014) e 2h para os *RXRs* (ALARID, 2006). O que nos permite hipotetizar que a VD_3 disponível foi utilizada nas primeiras horas de infecção, consequentemente observando uma redução nos níveis de mRNA dos genes por ela regulados.

Interessantemente, a VD_3 foi capaz de regular positivamente a expressão do gene *ESR2* que tem como produto o $ER\beta$ na infecção pelo *Mtb*, mesmo na ausência do seu ligante o E_2 . No entanto, após 72h de infecção foi observada uma regulação negativa tanto do *ESR2*, como do *ESR1*, que codifica o $ER\alpha$. Não existe, até o momento, registros na literatura de como se comporta a expressão desses receptores na infecção pelo *Mtb*, apenas em um estudo realizado por Al-Hendi e colaboradores foi possível observar a regulação negativa do *ESR1* em células de leiomioma uterino humano (HuLM) tratadas com a VD_3 (AL-HENDY et al., 2015). Em contrapartida, em macrófagos ativados a VD_3 é capaz de regular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo significativamente a atividade da aromatase, especialmente na presença de um ambiente estrogênico. Nossos

resultados corroboram com a hipótese de Zanatta e colaboradores de que a VD₃ exerceria papel regulador em ações promovidas pelo E₂ e na consequente expressão de seus receptores (ZANATTA et al., 2017).

A relação entre o E₂ e a infecção pelo *Mtb* ainda não foi bem elucidada. Sabe-se que macrófagos e linfócitos expressam vários receptores hormonais, incluindo ER α e ER β . O E₂ atua por meio desses receptores promovendo o desenvolvimento e diferenciação dessas células (BINI et al., 2014). O fato do E₂ induzir uma resposta pró-inflamatória associada a um perfil Th1 pode ajudar a explicar porque as mulheres têm menor incidência de TB e menor risco de doenças infecciosas (NEYROLLES; QUINTANA-MURCI, 2009), mas modelos experimentais (*in vivo* ou *in vitro*) sobre a influência desse hormônio na infecção pelo *Mtb* são pouco estudados.

Sabe-se que E₂ pode regular a autofagia através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que essa ação é pleiotrópica, a depender do microambiente e da sua concentração (OUYANG et al., 2020; TOTTA et al., 2016; XIANG et al., 2019). Estudo anterior conduzido por Ouyang e colaboradores relatou que o complexo E₂/ER suprime o crescimento intracelular de *Mtb* induzindo autofagia em macrófagos infectados (OUYANG et al., 2020). Nossos resultados reforçam essa afirmação, uma vez que as células previamente tratadas com E₂ foram capazes de reduzir em até 40% a viabilidade do *Mtb*, demonstrando que de fato esse hormônio é capaz de melhorar a resposta do hospedeiro à infecção.

Nossos achados mostram que E₂ é capaz de regular a expressão do VDR em células infectadas com *Mtb*, mesmo na ausência da VD₃. É importante destacar que essa regulação positiva do E₂ foi vista apenas em células infectadas com o *Mtb*. Isso sugere que a regulação positiva do VDR pode atuar para conter a infecção

por *Mtb* mesmo na ausência de seu principal ligante e que essa via pode ser regulada por outro hormônio que não a VD₃. Em geral, os pacientes com TB apresentam baixos níveis de VD₃, o que pode favorecer condições críticas da doença. Isso nos leva a supor que a capacidade do E₂ de modular os níveis de mRNA do VDR em mulheres pode ser um fator protetor adicional (NNOAHAM; CLARKE, 2008). Nossos resultados também corroboram os achados de Gan et al., em que o tratamento com E₂ reduziu a viabilidade do *Mtb* em células da linha celular epitelial brônquica humana 16HBE também após 72h de infecção (GAN et al., 2022).

Além do VDR, o E₂ foi capaz de regular positivamente a expressão de *RXRα* nas primeiras 24h de infecção, entretanto uma diminuição da expressão desse receptor foi observada após 72h de infecção. Nossos achados estão de acordo com Saini et al., que identificaram uma regulação positiva deste gene em macrófagos murinos e células dendríticas infectadas com *H37Rv Mtb* 48h após a infecção (Saini et al., 2018). Essa mesma tendência foi observada na expressão do gene VDR. Por outro lado, o *RXRβ* foi regulado negativamente nas células tratadas com E₂ (24h e 72h após a infecção). Segars e colaboradores descobriram que o *RXRβ* em células MCF-7 tratadas com E₂ atua inibindo a ativação transcricional mediada pela ligação de ERs/EREs ao se ligar as EREs de genes alvo. Indicando que os genes responsivos a E₂/ER podem ser regulados negativamente pelo *RXRβ* (SEGARS et al., 1993). Nossos resultados podem sugerir que a regulação negativa de *RXRβ* encontrada é consequência do tratamento com E₂, desta forma regulando a expressão de genes responsivos à infecção pelo *Mtb*.

Como esperado, as células tratadas com E₂ apresentaram maior expressão de *ESR1* e *ESR2*. No entanto, para *ESR1*, quando as células tratadas com E₂ foram

infectadas com o *Mtb* ou estimuladas com LPS, uma regulação negativa foi observada após 72h. Essa diminuição na expressão desse receptor pode ser devido ao tratamento com E₂ ter sido realizado apenas uma vez e 12 horas antes da infecção/estímulo, ou pela meia-vida desse mRNA ser de 7,4 horas (AMARAL et al., 2009).

Por outro lado, mesmo na ausência de E₂, células infectadas com *Mtb* aumentaram a expressão de *ESR2* após 24h de infecção, com aumento ainda maior nos níveis de mRNA após 72h, o que não foi observado quando as células foram estimuladas com LPS, indicando que a resposta desencadeada por este receptor é específica para o *Mtb*.

Trabalhos que relacionam o papel modulador do E₂ e a infecção pelo *Mtb* ainda são escassos. Entretanto a função imunomoduladora deste hormônio é bastante discutida na literatura. No sistema imune inato, a atividade dos ERs controla as vias de sinalização em células dendríticas e macrófagos. E₂/ER α pode promover a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta à ativação de TLRs nessas células, como a IL-6, IL-23, IL-12 e IL-1 β . Por outro lado, esse hormônio pode desencadear um fenótipo tolerogênico e diminuir a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por meio da regulação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, diminuindo a resposta Th1 e aumentando Th2 (BERESHCHENKO; BRUSCOLI; RICCARDI, 2018; KOVATS, 2015b).

O Capítulo IV desta tese utilizou a mesma metodologia do capítulo anterior, na qual PBMCs foram previamente tratadas com os hormônios VD₃ e E₂, e posteriormente infectadas com o *Mtb*. Neste capítulo o objetivo foi avaliar como esses hormônios influenciam na expressão gênica de dois dos principais PRRs

(NLRP3 e DC-SIGN) e das citocinas por eles ativadas (IL-1 β e IL-10, respectivamente).

Na TB, a ativação do inflamassoma é necessária para a ativação/liberação da citocina IL-1 β e consequente manutenção do estado pró-inflamatório (Dorhoi et al. 2012). Ao acessarmos os níveis de mRNA do *NLRP3* e do *IL-1 β* de células infectadas com *Mtb* foi possível observar uma regulação negativa da expressão desses genes quando as PBMCs foram previamente tratadas com a VD₃. Ao se ligar ao seu receptor, o VDR, sabe-se que a VD₃ atua inibindo os efeitos inflamatórios desencadeados pelo NF- κ B, regulando negativamente sua atividade e consequentemente a transcrição de genes ativados por esta via, incluindo *NLRP3* e *IL-1 β* (Jiang et al., 2021).

Embora a ativação de NLRP3 com consequente liberação de IL-1 β seja necessária para conter a infecção pelo *Mtb*, a regulação da resposta inflamatória é crucial para um desfecho clínico mais favorável ao hospedeiro (Kleinnijenhuis et al., 2009). Em nosso estudo, a regulação da expressão desses genes pelo VD₃ não foi exclusiva da infecção por *Mtb*, uma vez que uma diminuição dos níveis de mRNA do *NLRP3* também foi observada quando as células foram estimuladas com LPS, indicando que o papel imunorregulador da VD₃ não é exclusivo à infecção pelo *Mtb*.

Quando células infectadas foram tratadas com o E₂, o mesmo perfil de expressão gênica do *NLRP3* foi encontrado, indicando o papel imunorregulador desse hormônio na infecção por *Mtb*. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo *in vitro* usando E₂ como componente imunorregulador na infecção pelo *Mtb*. Em um estudo realizado com macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados com LPS e tratados com E₂, observou-se uma diminuição da expressão do *NLRP3*, corroborando com nossos achados. Essa regulação negativa seria desempenhada

pelo miR-29a-5p, que quando estimulado com LPS tem sua expressão inibida, mas na presença do E₂ atua inibindo *NLRP3*. Sugerimos que esse mesmo mecanismo pode estar ocorrendo nas culturas infectadas com o *Mtb*, uma vez que quando infectadas as células tratadas com E₂ apresentaram uma diminuição da expressão deste gene.

Em estudo realizado com monócitos de sangue periférico humano (HPBM) infectados com *Staphylococcus aureus*, o E₂ diminuiu a expressão gênica e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1 β , inibindo a via NF- κ B (Souza et al., 2021). O mesmo perfil de expressão para os níveis de IL-1 β e TNF foi observado em nosso estudo quando as células foram estimuladas com LPS e infectadas com *Mtb*, esses achados sugerem que esse hormônio pode estar atuando como um importante imunorregulador da resposta imune induzida por patógenos de maneira geral.

Em nossos experimentos, o tratamento com VD₃ aumentou a liberação de IFN- γ quando as células foram infectadas com *Mtb*, mas não quando estimuladas com LPS, indicando um mecanismo exclusivo contra o *Mtb*. Fabri et al demonstraram que a ativação de autofagolisossomos é realizada pelo IFN- γ em uma via dependente do complexo VD₃/VDR e, quando em monócitos e macrófagos, desencadeia a produção de CYP27B1-hidroxilase, enzima responsável pela conversão de VD₂ em VD₃ (Fabri et al., 2011). Curiosamente, o IFN- γ é capaz de aumentar a expressão e liberação de peptídeos antimicrobianos como β -defensina 2 (DEFB4) e outras catelecidinas na infecção pelo *Mtb*. Por outro lado, essa regulação depende do VD₃/VDR, que atua como um complexo de ativação para a transcrição de genes como *DEFB4* e *hCAP18*, que tem como produto final

catelecidinas específicas contra o *Mtb* (Liu et al., 2009; Rivas-Santiago et al., 2008; Wan et al., 2014).

Assim, acreditamos que a VD_3 parece atuar, por mecanismos ainda não conhecidos, regulando a expressão/liberação de IFN- γ exclusivamente na infecção pelo *Mtb*, melhorando assim a responsividade contra esse patógeno na fase inicial da infecção. Vale ressaltar que esse mecanismo regulatório é uma via de mão dupla, uma vez que o IFN- γ pode regular a produção local de VD_3 e a expressão do *VDR* (Fabri et al., 2011).

O E_2 inibiu a liberação desta citocina em células infectadas com *Mtb* e nas estimuladas com LPS. Vários estudos destacam o E_2 como uma importante molécula imunorreguladora e associam essa resposta a um perfil pró-inflamatório, porém acredita-se que essa função reguladora do E_2 depende da concentração e varia de acordo com a célula alvo (Kovats, 2015; Souza et al., 2021; Straub, 2007).

Este é o primeiro estudo a mostrar a influência in vitro de E_2 em resposta ao *Mtb*. No entanto, em um estudo realizado por Samimi *et al.* PBMCs de pacientes asmáticos que não faziam uso de medicação apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ quando tratados com esse hormônio (Nejabatbakhsh Samimi et al., 2021).

Ambos os hormônios utilizados em nossos experimentos aumentaram a expressão do *DC-SIGN* em células infectadas com *Mtb* após 24h e diminuíram após 72h. Afsal *et al.* encontraram uma regulação negativa da expressão de *DC-SIGN* modulada por VD_3 em monócitos/macrófagos após 72h de infecção (Afsal e Selvaraj, 2016). Alguns estudos mostram que o reconhecimento do *Mtb* pelo *DC-SIGN* inibe a função imunossupressora da célula dendrítica e a diferenciação de monócitos/macrófagos nestas células (Geijtenbeek et al., 2003). Este último

mecanismo estaria relacionado a uma possível diminuição do número de células dendríticas com consequente diminuição da expressão deste gene.

Como dito anteriormente, esta é a primeira pesquisa que relaciona o papel imunorregulador do E₂ com o reconhecimento do *Mtb* ou qualquer outro patógeno pelo DC-SIGN. E₂ aumentou a expressão desse gene, porém, após 72h observou-se uma diminuição nos seus níveis de mRNA. O *Mtb* é capaz de utilizar o DC-SIGN como mecanismo de escape da resposta imune, aumentando a liberação de IL-10, polarizando uma resposta Th2 e comprometendo a eficiência da resposta imune do hospedeiro contra o bacilo (Geijtenbeek et al., 2003; Hossain e Norazmi, 2013). Uma vez que VD₃ e E₂ foram capazes de regular negativamente a expressão de DC-SIGN, o uso desses hormônios pode ser um importante aliado na prevenção do uso dessa via pelo *Mtb* como mecanismo de escape da resposta imune.

VD₃ regulou negativamente a expressão do gene *IL-10*, porém não alterou os níveis de proteína desta citocina. Esse resultado não foi o esperado, pois esse hormônio regula positivamente a expressão da IL-10 (Cantorna, 2010; Khoo et al., 2011). Acreditamos que por se tratar de uma citocina anti-inflamatória com papel crítico no estabelecimento da fase crônica da TB, o tempo observado e o modelo experimental utilizado não foram adequados. Em contraste, na infecção por outros patógenos mimetizados pelo estímulo com LPS, VD₃ e E₂ aumentaram os níveis de mRNA de IL-10. Indicando que o mecanismo de supressão da IL-10 pelo E₂ na fase aguda da infecção é específico contra o *Mtb*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados são fortes evidências do papel dos hormônios esteroides VD_3 e E_2 na regulação da resposta imune e inflamatória contra a infecção pelo *Mtb*. Entretanto mais estudos são necessários para definir a melhor estratégia de uso desses hormônios ou das vias por eles reguladas no combate a infecção por esse patógeno.

Verificamos a associação entre três polimorfismos do *VDR* e a susceptibilidade à TB ativa. O alelo “T” e o genótipo “T/T” dos SNPs rs2228570 e rs1540339 estão associados a uma menor susceptibilidade à TB ativa enquanto que o genótipo “T/T” do SNP rs4760648 foi associado a maior susceptibilidade em desenvolver a doença na população estudada.

Ao avaliarmos a expressão do *VDR* em pacientes com TB ativa comparando a indivíduos sintomáticos respiratórios encontramos um aumento de cerca de dez vezes da expressão deste gene nos pacientes.

Ao acessarmos a expressão do *VDR* de acordo com os genótipos do polimorfismo *FokI* em pacientes com TB ativa, os resultados não foram estatisticamente significativos.

Encontramos a associação entre o genótipo G/G SNP rs6853 do *MYD88* e a menor susceptibilidade à TB ativa em indivíduos que se autodeclararam caucasoides. O rs773784 do *TLR4* está associado a uma maior susceptibilidade à TB ativa em indivíduos que se autodeclararam afrodescendentes.

Ao verificarmos o perfil de expressão dos genes *NLRC4* e *MYD88* em pacientes com TB ativa não encontramos diferença de expressão.

A VD₃ e o E₂ alteraram o perfil de expressão dos genes *VDR*, *RXRα*, *RXRβ*, *ESR1* e *ESR2* em cultura de PBMCs infectadas com a cepa *Mtb H37Rv*;

O E₂ diminuiu em 40% a viabilidade do *Mtb* em cultura de PBMCs, entretanto este resultado não foi estatisticamente significativo.

A VD₃ e o E₂ regularam a expressão gênica do *NLRP3*, do *DC-SIGN* e dos genes que codificam as citocinas IL-1β e IL-10 em cultura de PBMCs infectadas com a cepa *Mtb H37Rv*, indicando o papel regulador da inflamação e da resposta imune contra este patógeno.

Os níveis das citocinas IL-10, IFN-γ e TNF do sobrenadante das culturas de PBMCs infectadas com a cepa de *Mtb H37Rv* foram regulados pelos hormônios VD₃ e E₂ in vitro.

REFERÊNCIAS

- ABEL, B. et al. Toll-Like Receptor 4 Expression Is Required to Control Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 3155–3162, 15 set. 2002.
- ADAMS, J. S. et al. Vitamin D-Directed Rheostatic Regulation of Monocyte Antibacterial Responses. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 7, p. 4289–4295, 1 abr. 2009.
- ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Update in vitamin D. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 2, p. 471–8, fev. 2010.
- AFSAL, K.; SELVARAJ, P. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of mannose receptor, DC-SIGN and autophagy genes in pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 99, p. 1–10, jul. 2016.
- AHMED, S. A. et al. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. suppl 5, p. 681–686, out. 1999.
- AKHTER, Y. et al. The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: Perhaps more? **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 110–116, jan. 2012.
- AL-HENDY, A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Regulates Expression of Sex Steroid Receptors in Human Uterine Fibroid Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 4, p. E572–E582, abr. 2015.
- ALARID, E. T. Lives and Times of Nuclear Receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 9, p. 1972–1981, set. 2006.
- ALBIGER, B. et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 6, p. 511–528, jun. 2007.
- ALGOOD, H. M. S.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 6, p. 467–477, dez. 2003.
- ALLEN, E. Landmark article Sept 8, 1923. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. By Edgar Allen and Edward A. Doisy. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 250, n. 19, p. 2681–2683, 18 nov. 1983.
- AMARAL, S. et al. The promoter C specific ER α isoform is associated with tamoxifen outcome in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 118, n. 2, p. 323–331, 15 nov. 2009.
- BAEKE, F. et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 482–496, ago. 2010.

- BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715–1724, 19 dez. 2005.
- BARREIRO, L. B. et al. Promoter Variation in the DC-SIGN–Encoding Gene CD209 Is Associated with Tuberculosis. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 2, p. e20, 3 jan. 2006.
- BERESHCHENKO, O.; BRUSCOLI, S.; RICCARDI, C. Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–10, 2018.
- BERRY, M. P. R. et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 973–977, ago. 2010.
- BHARDWAJ, P. et al. Supplemental estrogen and caloric restriction reduce obesity-induced periprosthetic white adipose inflammation in mice. **Carcinogenesis**, v. 40, n. 7, p. 914–923, 20 jul. 2019.
- BIASIZZO, M.; KOPITAR-JERALA, N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, out. 2020.
- BIKLE, D. D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 3, p. 319–329, mar. 2014.
- BINI, E. I. et al. The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93831, 10 abr. 2014.
- BISCHOFF-FERRARI, H. A. Optimal Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels for Multiple Health Outcomes. In: **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 55–71.
- BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 4, p. 833–842, 2005.
- BLOOM, B. R. et al. Tuberculosis. In: **Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 6): Major Infectious Diseases**. [s.l.] The World Bank, 2017. p. 233–313.
- BOTTASSO, O. et al. The Immuno-endocrine Component in the Pathogenesis of Tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 166–175, ago. 2007.
- BOUCHER, B. J. Is vitamin D status relevant to metabolic syndrome? **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 2, p. 212–224, 2012.
- BROWN, J. et al. Variation in C - reactive protein response according to host and mycobacterial characteristics in active tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v.

16, n. 1, p. 265, 10 dez. 2016.

BULUN, S. et al. Aromatase in Aging Women. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 17, n. 04, p. 349–358, 15 dez. 1999.

BULUT, Y. et al. Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins Use Diverse Toll-like Receptor Pathways to Activate Pro-inflammatory Signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 20961–20967, jun. 2005.

CABRERA-GAYTÁN, D. A. et al. Association of Pulmonary Tuberculosis and HIV in the Mexican Institute of Social Security, 2006-2014. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168559, 29 dez. 2016.

CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M.; FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 2017.

CANTORNA, M. T. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 3, p. 286–289, 2 ago. 2010.

CARDONA, P. J. Reactivation or reinfection in adult tuberculosis: Is that the question? **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 4, p. 400–407, 2016.

CARDONA, P. J. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 1, p. 38–46, 2018.

CARR, B. R.; MACDONALD, P. C.; SIMPSON, E. R. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum**Supported in part by USPHS Grants 2-RO1-HD-13234 and 5-P50-HD-11149. **Fertility and Sterility**, v. 38, n. 3, p. 303–311, set. 1982.

CARR, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2404–2411, 2003.

CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician should know. p. 19–43, 2013.

CHAN, E. D.; ISEMAN, M. D. Slender, Older Women Appear to Be More Susceptible to Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. **Gender Medicine**, v. 7, n. 1, p. 5–18, fev. 2010.

CHANG, K. C.; LEUNG, C. C. Systematic review of interferon-gamma release assays in tuberculosis: focus on likelihood ratios. **Thorax**, v. 65, n. 3, p. 271–6, 2010.

CHARAN, J. et al. Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 4, p. 300, 2012.

CHAVEZ, K. et al. Gender biased immune-biomarkers in active tuberculosis and correlation of their profiles to efficacy of therapy. **Tuberculosis**, v. 99, p. 17–24, jul. 2016.

CHEN, C. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms on the risk of tuberculosis, a meta-analysis of 29 case-control studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

CHEN, C. et al. The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease (Review). **Oncology Letters**, 11 out. 2019.

CHEN, X. et al. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. **Clinical Immunology**, v. 123, n. 1, p. 50–59, abr. 2007.

CHENG, J. J. B. J. et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7711–7715, 2004.

CHOCANO-BEDOYA, P.; RONNENBERG, A. G. **Vitamin D and tuberculosis** *Nutrition Reviews*, 2009.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 365–408, jan. 2016.

CLIFF, J. M. et al. The human immune response to tuberculosis and its treatment: A view from the blood. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 88–102, 2015.

COELINGH BENNINK, F. et al. Maternal and fetal estradiol levels during pregnancy. **Climacteric**, v. 11, n. sup1, p. 69–72, 3 jan. 2008.

COELINGH BENNINK, H. J. T. Are all estrogens the same? **Maturitas**, v. 47, n. 4, p. 269–275, abr. 2004.

COHEN, B. I. et al. Dietary fat and fatty acids modulate cholesterol cholelithiasis in the hamster. **Lipids**, v. 27, n. 7, p. 526–32, jul. 1992.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 431–444, dez. 2014.

CRANNEY, A. et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. **Evidence report/technology assessment**, n. 158, p. 1–235, ago. 2007.

CROWLE, A. J.; ROSS, E. J.; MAY, M. H. Inhibition by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 12, p. 2945–2950, 1987.

CRUZ-KNIGHT, W.; BLAKE-GUMBS, L. Tuberculosis. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 40, n. 3, p. 743–756, set. 2013.

DAI, X. et al. PPAR γ mediates innate immunity by regulating the 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**, v. 60, n. 3, p. 179–186, dez. 2010.

DANLEY, J. et al. Normal Estrogen, but Low Dehydroepiandrosterone Levels, in Women with Pulmonary Mycobacterium avium Complex. A Preliminary Study. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 6, p. 908–914, jul. 2014.

DE MARTINO, M.; GALLI, L.; CHIAPPINI, E. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. S1, p. S1, 8 jan. 2014.

DEDICAT, M. Where next with for vitamin D and tuberculosis? **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 24, n. 3, p. 265–265, 1 mar. 2020.

DEGUCHI, K. et al. Postmenopausal changes in production of type 1 and type 2 cytokines and the effects of hormone replacement therapy. **Menopause**, v. 8, n. 4, p. 266–273, jul. 2001.

DELUCA, H. F. Vitamin D: Historical overview. **Vitamins and Hormones**, v. 100, p. 1–20, 2016.

DENIS, M. Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 84, n. 2, p. 200–206, 28 jun. 2008.

DESAI, N. S. et al. Effects of sunlight and diet on vitamin D status of pulmonary tuberculosis patients in Tbilisi, Georgia. **Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 362–366, abr. 2012.

DHAR, N.; MCKINNEY, J.; MANINA, G. Phenotypic Heterogeneity in M1. Dhar N, McKinney J, Manina G (2016) Phenotypic Heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol Spectr* 4: . doi: 10.1128/microbiolspec.TB2-0021-2016. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, 1 dez. 2016.

DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 387, n. 10024, p. 1211–1226, 2016.

DINARDO, A. R.; GUY, E. Reactivation tuberculosis: role of surveillance. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 14, n. 5, p. 501–509, 2016.

DINI, C.; BIANCHI, A. The potential role of vitamin D for prevention and treatment of tuberculosis and infectious diseases. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 48, n. 3, p. 319–327, set. 2012.

DOMINGO-GONZALEZ, R. et al. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 13 out. 2016.

DORHOI, A. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by Mycobacterium tuberculosis is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 374–384, fev. 2012.

DRAIN, P. K. et al. Incipient and subclinical tuberculosis: A clinical review of early stages and progression of infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–24, 2018.

DRENNAN, M. B. et al. Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Succumb to Mycobacterium tuberculosis Infection. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 49–57, jan. 2004.

DRUSZCZYŃSKA, M. et al. Latent M. tuberculosis infection - Pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies. **Polish Journal of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 3–10, 2012.

DUTTA, R. K. et al. IL-6 inhibits IFN- γ induced autophagy in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 6, p. 942–954, jun. 2012.

DZHEBIR, G. et al. Association of vitamin D receptor gene BsmI B/b and FokI F/f polymorphisms with adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus. **International Journal of Dermatology**, v. 55, n. 8, p. e465–e468, 2016.

ENGELMAN, C. D. et al. Genetic and Environmental Determinants of 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Hispanic and African Americans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 9, p. 3381–3388, 1 set. 2008.

FABRI, M. et al. Vitamin D Is Required for IFN- γ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 104, p. 104ra102-104ra102, 12 out. 2011.

FAN, Z. et al. Estrogen and estrogen receptor signaling promotes allergic immune responses: Effects on immune cells, cytokines, and inflammatory factors involved in allergy. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 5, p. 506–512, 2019.

FERRAZ, J. C. et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1387–1397, nov. 2006.

FILARDO, E. J.; THOMAS, P. Minireview: G Protein-Coupled Estrogen Receptor-1, GPER-1: Its Mechanism of Action and Role in Female Reproductive Cancer, Renal and Vascular Physiology. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 2953–2962, 1 jul. 2012.

FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 527–531, 2015.

FOX, H. S.; BOND, B. L.; PARLOW, T. G. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 12, p. 4362 LP – 4367, 15 jun. 1991.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. In: [s.l.: s.n.]. p. 135–170.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10181, p. 1642–1656, 2019.

GAN, Y. et al. Estradiol inhibits autophagy of Mycobacterium tuberculosis -infected 16HBE cells and controls the proliferation of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 25, n. 6, p. 196, 15 abr. 2022.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 1, p. 7–17, 6 jan. 2003.

GIL, Á.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 72, n. 2, p. 87–95, 2018.

GOMBART, A. F.; BORREGAARD, N.; KOEFFLER, H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D 3. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 9, p. 1067–1077, jul. 2005.

GREBE, A.; HOSS, F.; LATZ, E. **NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis** *Circulation Research* Lippincott Williams and Wilkins, , 2018.

GUPTA, N.; KUMAR, R.; AGRAWAL, B. New players in immunity to tuberculosis: The host microbiome, lung epithelium, and innate immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.

HAUSSLER, M. R. et al. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 2, p. 77–98, 11 fev. 2013.

HILAL, T.; HURLEY, P.; MCCORMICK, M. Disseminated tuberculosis with tuberculous meningitis in an immunocompetent host. **Oxford Medical Case Reports**, v. 2014, n. 7, p. 125–128, 27 out. 2014.

HOCHBERG, Z.; HOCHBERG, I. Evolutionary Perspective in Rickets and Vitamin D. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 15 maio 2019.

HOLICK, M. et al. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. **Science**, v. 210, n. 4466, p. 203–205, 10 out. 1980.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1678S-1688S, 1 dez. 2004.

HOLICK, M. F. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 3, p. 353–373, mar. 2006.

HOLICK, M. F. Vitamin D Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266–281, 19 jul. 2007.

HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 1080S-1086S, 1 abr. 2008.

HOLINKA, C. F.; DICZFALUSY, E.; COELINGH BENNINK, H. J. T. Estetrol: A unique steroid in human pregnancy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, n. 1–2, p. 138–143, maio 2008.

HOSSAIN, M. M.; NORAZMI, M.-N. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in Mycobacterium tuberculosis Infection—The Double-Edged Sword? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013.

HOUGARDY, J.-M. et al. In vitro expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low}/– regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 11, p. 1325–1332, set. 2007.

HUANG, H. et al. Vitamin D receptor interacts with NLRP3 to restrict the allergic response. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 194, n. 1, p. 17–26, 26 set. 2018.

HUSSAIN, T. et al. Association of vitamin D receptor TaqI and Apal genetic polymorphisms with nephrolithiasis and end stage renal disease: a meta-analysis. **BMC Medical Genetics**, v. 20, n. 1, p. 193, 10 dez. 2019.

ILD, M. Tuberculose : aspectos imunológicos na infecção e na doença. v. 21, n. 1, p. 42–48, 2011.

JAYACHANDRAN, R. et al. Survival of Mycobacteria in Macrophages Is Mediated by Coronin 1-Dependent Activation of Calcineurin. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 37–50, jul. 2007.

JENSEN, E. V. et al. Estrogen-Binding Substances of Target Tissues. **Science**, v. 158, n. 3800, p. 529–530, 27 out. 1967.

JENSEN, E. V. et al. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 59, n. 2, p. 632–638, 1 fev. 1968.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 557–568, 2015.

JIANG, S. et al. Vitamin D/VDR attenuate cisplatin-induced AKI by down-regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway. **The Journal of**

Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 206, p. 105789, fev. 2021.

JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 582S-586S, 1 ago. 2008.

JONES, G.; PROSSER, D. E.; KAUFMANN, M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 1, p. 13–31, jan. 2014.

JONES, G.; PROSSER, D. E.; KAUFMANN, M. The Activating Enzymes of Vitamin D Metabolism (25- and 1 α -Hydroxylases). In: **Vitamin D**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 57–79.

JOSHI, M. D. et al. DC-SIGN mediated antigen-targeting using glycan-modified liposomes: formulation considerations. **International journal of pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 426–32, 20 set. 2011.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, jul. 2019.

KETATA, W. et al. Les tuberculoses extrapulmonaires. **Revue de Pneumologie Clinique**, v. 71, n. 2–3, p. 83–92, abr. 2015.

KHAN, A. H. et al. Smoking on Treatment Outcomes Among Tuberculosis Patients. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 349, n. 6, p. 505–509, jun. 2015.

KHOO, A.-L. et al. Vitamin D3 down-regulates proinflammatory cytokine response to Mycobacterium tuberculosis through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production. **Cytokine**, v. 55, n. 2, p. 294–300, ago. 2011.

KIM, E. W. et al. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against Mycobacterium leprae. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006608, 2 jul. 2018.

KIM, M.-S. et al. RETRACTED: 1 α ,25(OH)₂D₃-induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 265–266, p. 168–173, fev. 2007.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 7, p. 1914–1922, jul. 2009.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1–12, 2011.

KOCH, A.; MIZRAHI, V. Mycobacterium tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 555–556, 2018.

KONGSBAK, M. et al. Vitamin D Up-Regulates the Vitamin D Receptor by Protecting It from Proteasomal Degradation in Human CD4+ T Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96695, 2 maio 2014.

KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular Immunology**, v. 294, n. 2, p. 63–69, 2015a.

KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular Immunology**, v. 294, n. 2, p. 63–69, abr. 2015b.

KOVATS, S. Sex Hormones Regulate Innate Immune Cells and Promote Sex Differences in Respiratory Virus Infection. v. 9, n. July, p. 1–15, 2018.

KUWABARA, A. et al. Vitamin D deficiency as the risk of respiratory tract infections in the institutionalized elderly: A prospective 1-year cohort study. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 40, p. 309–313, dez. 2020.

LALVANI, A.; CONNELL, D. W. Dissecting the immunological, antimicrobial and clinical effects of vitamin D therapy in tuberculosis. **Pathogens and Global Health**, v. 106, n. 7, p. 378–379, 12 nov. 2012.

LANG, P. O.; ASPINALL, R. Vitamin D Status and the Host Resistance to Infections: What It Is Currently (Not) Understood. **Clinical Therapeutics**, v. 39, n. 5, p. 930–945, maio 2017.

LAWN, S. D. et al. Tuberculosis. **Lancet**, v. 378, n. 8, p. 57–72, 2013.

LE DILY, F.; BEATO, M. Signaling by steroid hormones in the 3D nuclear space. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–16, 2018.

LEE, S. W. et al. VDR and VDBP genes polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 5, p. 783–787, 2016.

LEHMANN, U. et al. Efficacy of fish intake on vitamin D status: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 4, p. 837–847, 1 out. 2015.

LENAERTS, A.; BARRY, C. E.; DARTOIS, V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 288–307, mar. 2015.

LEWIS, S. J.; BAKER, I.; DAVEY SMITH, G. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 10, p. 1174–7, out. 2005.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 15–22, 1 jul. 2010.

LIU, P. T. et al. Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* Is Dependent on the Induction of Cathelicidin. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2060–2063, 15 ago. 2007.

LIU, P. T. et al. Convergence of IL-1 β and VDR Activation Pathways in Human TLR2/1-Induced Antimicrobial Responses. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5810, 5 jun. 2009.

LIU, P. T.; MODLIN, R. L. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 4, p. 371–376, ago. 2008.

LIU, X. et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 153–158, jul. 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LOPES MARQUES, C. The Importance of vitamin D levels in autoimmune disease. **Bras J Rheumatol**, v. 50, n. 1, p. 67–80, 2010.

LÓPEZ-REYES, A. et al. **NLRP3 Inflammasome: The Stormy Link Between Obesity and COVID-19** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , out. 2020.

LUGO-VILLARINO, G. et al. C-type lectins with a sweet spot for *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 1, n. 1, p. 25–40, mar. 2011.

LUGO-VILLARINO, G. et al. The C-Type Lectin Receptor DC-SIGN Has an Anti-Inflammatory Role in Human M(IL-4) Macrophages in Response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 12 jun. 2018.

LYON, S. M.; ROSSMAN, M. D. Pulmonary Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, 1 fev. 2017.

M., C. et al. TUBERCULOSE: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 2, n. 1, 18 out. 2013.

MAI, W.; LIAO, Y. **Targeting IL-1 β in the Treatment of Atherosclerosis** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , dez. 2020.

MANGAN, M. S. J. et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 8, p. 588–606, ago. 2018.

MARGOLIS, R. N.; CHRISTAKOS, S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 208–214, abr. 2010.

MARTINEAU, A. R. et al. Vitamin D in the treatment of pulmonary tuberculosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 3–5, p. 793–798, mar. 2007.

MATHEMA, B. et al. Drivers of Tuberculosis Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_6, p. S644–S653, 3 nov. 2017.

MAYER-BARBER, K. D. et al. Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 β Production Is Critical for Host Resistance to Mycobacterium tuberculosis and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3326–3330, 1 abr. 2010.

MCDONOUGH, K. A.; KRESS, Y.; BLOOM, B. R. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of Mycobacterium tuberculosis with macrophages. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2763–2773, jul. 1993.

MEANS, T. K. et al. Differential Effects of a Toll-Like Receptor Antagonist on Mycobacterium tuberculosis -Induced Macrophage Responses. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4074–4082, 15 mar. 2001.

MEDICINE, I. OF. **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

MILLER, W. L. Steroidogenesis: Unanswered Questions. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 11, p. 771–793, nov. 2017.

MISHRA, B. B. et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046–1063, ago. 2010.

MISHRA, B. B. et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome–dependent processing of IL-1 β . **Nature Immunology**, v. 14, n. 1, p. 52–60, 18 jan. 2013.

MÖLLER, M.; HOAL, E. G. Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 90, n. 2, p. 71–83, 2010.

MORTAZ, E. et al. Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 14 jan. 2015.

MOULTON, V. R. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. v. 9, n. October, p. 1–21, 2018.

MOUSQUER, G. T.; PERES, A.; FIEGENBAUM, M. Pathology of TB/COVID-19 Co-Infection: The phantom menace. **Tuberculosis**, v. 126, p. 102020, jan. 2021.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, N. **Vitamin D - Health Professional Fact Sheet**. Disponível em: <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD->

HealthProfessional/>. Acesso em: 31 ago. 2020.

NEJATBAKHS SH SAMIMI, L. et al. The impact of 17 β -estradiol and progesterone therapy on peripheral blood mononuclear cells of asthmatic patients. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 297–306, 14 jan. 2021.

NEYROLLES, O.; GICQUEL, B.; QUINTANA-MURCI, L. Towards a crucial role for DC-SIGN in tuberculosis and beyond. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 383–387, set. 2006.

NEYROLLES, O.; QUINTANA-MURCI, L. Sexual Inequality in Tuberculosis. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 12, p. e1000199, 22 dez. 2009.

NHAMOYEBONDE, S.; LESLIE, A. Biological Differences Between the Sexes and Susceptibility to Tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. suppl 3, p. S100–S106, 15 jul. 2014.

NNADI, C. D. et al. Mind the gap: TB trends in the USA and the UK, 2000–2011. **Thorax**, v. 71, n. 4, p. 356–363, abr. 2016.

NNOAHAM, K. E.; CLARKE, A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 1, p. 113–119, 1 fev. 2008.

NORMAN, A. W. Vitamin D Receptor: New Assignments for an Already Busy Receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5542–5548, dez. 2006.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 2, p. 491S-499S, ago. 2008a.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 491S-499S, 1 ago. 2008b.

NOSRATABADI, R. et al. Polymorphisms within exon 9 but not intron 8 of the vitamin D receptor are associated with the nephropathic complication of type-2 diabetes. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, n. 6, p. 493–497, dez. 2010.

NOVIKOV, A. et al. Mycobacterium tuberculosis Triggers Host Type I IFN Signaling To Regulate IL-1 β Production in Human Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2540–2547, 1 set. 2011.

ONU. **Progresso global no combate à tuberculose está em risco, afirma OMS | As Nações Unidas no Brasil**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/95855-progresso-global-no-combate-tuberculose-esta-em-risco-afirma-oms>>. Acesso em: 16 abr. 2022.

ÖSTERLUND, M. K.; HURD, Y. L. Estrogen receptors in the human forebrain and

the relation to neuropsychiatric disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 3, p. 251–267, 2001.

OTTENHOFF, T. H. M. et al. Genome-Wide Expression Profiling Identifies Type 1 Interferon Response Pathways in Active Tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45839, 21 set. 2012.

OUYANG, Q. et al. Bazedoxifene Suppresses Intracellular Mycobacterium tuberculosis Growth by Enhancing Autophagy. **mSphere**, v. 5, n. 2, 29 abr. 2020.

OVSYANNIKOVA, I. G. et al. Effects of vitamin A and D receptor gene polymorphisms/haplotypes on immune responses to measles vaccine. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 22, n. 1, p. 20–31, jan. 2012.

PANDA, S. et al. Association of Fok1 VDR polymorphism with Vitamin D and its associated molecules in pulmonary tuberculosis patients and their household contacts. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

PATEL, S. et al. Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, n. October 2017, p. 403–411, 2018.

PÉREZ-CREMADES, D. et al. MiRNA as a new regulatory mechanism of estrogen vascular action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

PIKE, J. W. et al. Genomic Determinants of Vitamin D-Regulated Gene Expression. In: [s.l: s.n.]. p. 21–44.

PIKE, J. W.; MEYER, M. B. The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 255–269, jun. 2010.

PIMPIN, L. et al. Tuberculosis and HIV co-infection in European Union and European Economic Area countries. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 6, p. 1382–1392, 1 dez. 2011.

POMPEI, L. et al. Disparity in IL-12 Release in Dendritic Cells and Macrophages in Response to Mycobacterium tuberculosis Is Due to Use of Distinct TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5192–5199, 15 abr. 2007.

PUIG-KRÖGER, A. et al. Regulated Expression of the Pathogen Receptor Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin in THP-1 Human Leukemic Cells, Monocytes, and Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25680–25688, jun. 2004.

RAJARAM, M. V. S. et al. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 471–485, dez. 2014.

RAMACHANDRAN, G. et al. Factors Influencing Tuberculosis Treatment Outcome in Adult Patients Treated with Thrice-Weekly Regimens in India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, 27 maio 2017.

REUSCHL, A.-K. et al. Innate activation of human primary epithelial cells broadens the host response to Mycobacterium tuberculosis in the airways. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006577, 1 set. 2017.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. Expression of Cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis Infection in Human Alveolar Macrophages, Monocytes, Neutrophils, and Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 935–941, mar. 2008.

ROOK, G. A. et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. **Immunology**, v. 57, n. 1, p. 159–63, jan. 1986.

ROSENTHAL, A. H.; ROTHFIELD, L. D.; CHAMORRO DAUER, L. Disseminated Tuberculosis in a Healthy Adolescent Female. **Cureus**, 21 jun. 2019.

SACZKO, J. et al. Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 227, n. 2, p. 543–556, 2017.

SAEED, B. Q. et al. Vitamin D Deficiency and Insufficiency Among University Students: Prevalence, Risk Factors, and the Association Between Vitamin D Deficiency and Episodes of Respiratory Tract Infections. **Risk Management and Healthcare Policy**, v. Volume 14, p. 2733–2741, jun. 2021.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 374–380, ago. 2005.

SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 231–243, jan. 2015.

SANCHO, D.; REIS E SOUSA, C. Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 491–529, 23 abr. 2012.

SASSI, F.; TAMONE, C.; D'AMELIO, P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1656, 3 nov. 2018.

SCHWABE, J. W. R.; TEICHMANN, S. A. Nuclear Receptors: The Evolution of Diversity. **Science Signaling**, v. 2004, n. 217, p. pe4–pe4, 27 jan. 2004.

SCRIBA, T. J.; COUSSENS, A. K.; FLETCHER, H. A. Human Immunology of Tuberculosis. p. 1–24, 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE | MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico Tuberculose 2021**. [s.l.: s.n.].

SEGARS, J. H. et al. Inhibition of estrogen-responsive gene activation by the

retinoid X receptor beta: evidence for multiple inhibitory pathways. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 4, p. 2258–2268, abr. 1993.

SELVARAJ, P. **Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Cathelicidin in the Treatment of Tuberculosis**. [s.l.: s.n.]. v. 86

SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections . **Gram-Positive Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 1056–1086, 2019.

SINGH, S. B. et al. Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria. **Science**, v. 313, n. 5792, p. 1438–1441, 8 set. 2006.

SINGHANIA, A. et al. Transcriptomics in TB: the immune response and diagnosis. **Nature immunology**, v. 19, n. 11, p. 1159, 2018.

SLATTERY, M. L. et al. CDX2 VDR Polymorphism and Colorectal Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 12, p. 2752–2755, 1 dez. 2007.

SOUZA, C. L. S. E et al. Effects of 17 β -Estradiol on Monocyte/Macrophage Response to Staphylococcus aureus: An In Vitro Study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 14 jul. 2021.

STIVAL, A. et al. Sexual Dimorphism in Tuberculosis Incidence: Children Cases Compared to Adult Cases in Tuscany from 1997 to 2011. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e105277, 25 set. 2014.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 5, p. 521–574, 2007.

SUÁREZ, I. et al. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. **Deutsches Ärzteblatt international**, 25 out. 2019.

SUBA, Z. Prevention and Therapy of COVID-19 via Exogenous Estrogen Treatment for Both Male and Female Patients ; An Opinion Paper. p. 75–85, 2020.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 323–334, jun. 2007.

TIENTCHEU, L. D. et al. Immunological consequences of strain variation within the Mycobacterium tuberculosis complex. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 3, p. 432–445, mar. 2017.

TOPHAM, N. J.; HEWITT, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 7–15, set. 2009.

TOPILSKI, I. et al. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 4, p. 1068–1076, abr. 2004.

TOTTA, P. et al. Dynamin II is required for 17 β -estradiol signaling and autophagy-based ER α degradation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23727, 24 jul. 2016.

TRENTI, A. et al. Estrogen, angiogenesis, immunity and cell metabolism: Solving the puzzle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, 2018.

UITTERLINDEN, A. G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v. 338, n. 2, p. 143–156, set. 2004.

VAN ETEN, E. et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: Functional impact on the immune system. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 2, p. 395–405, fev. 2007.

VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. H. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 697–709, set. 2003.

VASILOVICI, A. et al. Vitamin D receptor polymorphisms and melanoma (Review). **Oncology Letters**, 19 nov. 2018.

VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, E. R. et al. Sexual dimorphism in bacterial infections. **Biology of Sex Differences**, v. 9, n. 1, p. 27, 20 dez. 2018.

VRTAČNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 3, p. 329–342, 2014.

WALZL, G. et al. Clinical immunology and multiplex biomarkers of human tuberculosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 4, p. 1–13, 2015.

WAN, M. et al. **Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages.** *Journal of leukocyte biology*, 2014.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 123–133, 2012.

WATSON, C. S.; JENG, Y.; KOCHUKOV, M. Y. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 9, p. 3328–3336, 9 set. 2008.

WEI, R.; CHRISTAKOS, S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8251–8260, 24 set. 2015.

WEIR, R. E. et al. Mycobacterial Purified Protein Derivatives Stimulate Innate Immunity: Malawians Show Enhanced Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-10 Responses Compared to Those of Adolescents in the United Kingdom. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1807–1811, mar. 2004.

WHITE, J. H. Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: Past, present and future. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1–2, p. 234–238, jul. 2010.

WILCOX, W. D.; LAUFER, S. Tuberculosis in Adolescents. **Clinical Pediatrics**, v. 33, n. 5, p. 258–262, 2 maio 1994.

WINAU, F. et al. Apoptotic Vesicles Crossprime CD8 T Cells and Protect against Tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 105–117, jan. 2006.

WJST, M. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. **BMC genetics**, v. 6, p. 2, 2005.

WONG, K.; JACOBS JR, W. R. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by Mycobacterium tuberculosis. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 1371–1384, 11 set. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2019**. Geneva: [s.n.].

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**. [s.l: s.n.].

XIANG, J. et al. How does estrogen work on autophagy? **Autophagy**, v. 15, n. 2, p. 197–211, 1 fev. 2019.

XU, C. et al. Vitamin D receptor gene foki polymorphism contributes to increasing the risk of HIV-negative tuberculosis: Evidence from a meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.

XU, G. et al. Insights into battles between Mycobacterium tuberculosis and macrophages. **Protein & Cell**, v. 5, n. 10, p. 728–736, 18 out. 2014.

XU, Y. et al. Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 135–144, jul. 2007.

YIN, J. -W.; WANG, G. The Mediator complex: a master coordinator of transcription and cell lineage development. **Development**, v. 141, n. 5, p. 977–987, 1 mar. 2014.

YONEKAWA, A. et al. Dectin-2 Is a Direct Receptor for Mannose-Capped Lipoarabinomannan of Mycobacteria. **Immunity**, v. 41, n. 3, p. 402–413, set. 2014.

ZANATTA, A. P. et al. Interactions between oestrogen and 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 signalling and their roles in spermatogenesis and spermatozoa functions. **Basic and Clinical Andrology**, v. 27, n. 1, p. 10, 8 dez. 2017.

ZHANG, M. et al. 17 β -Estradiol Attenuates LPS-Induced Macrophage Inflammation In Vitro and Sepsis-Induced Vascular Inflammation In Vivo by Upregulating miR-29a-5p Expression. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, p. 1–16, 9 jun. 2021.

ZUÑIGA, J. et al. Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–18, 2012.

**APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MOLECULAR BIOLOGY
REPORTS**

**DIFFERENTIAL DISTRIBUTION IN VITAMIN D RECEPTOR GENE VARIANTS
AND EXPRESSION PROFILE IN NORTHEAST BRAZIL INFLUENCES UPON
ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS**

Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{a,b}, Jorge José de Souza Pereira^{a,b},
Aline dos Santos Peixoto^c, Sergio Crovella^{a,b}, Haiana Charifker Schindler^c;
Michelle Christiane da Silva Rabello^c and Jaqueline de Azevêdo Silva^{a,b*}

^a *Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;*

^b *Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;*

^c *Oswaldo Cruz Foundation, Aggeu Magalhães Research Centre (FIOCRUZ/CPqAM), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

PMID: 32880832

DOI: 10.1007/S11033-020-05762-3

Artigo publicado na revista Molecular Biology Reports (IF: 2.19 em 2020)



Differential distribution in vitamin D receptor gene variants and expression profile in Northeast Brazil influences upon active pulmonary tuberculosis

Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{1,2} · Jorge José de Souza Pereira^{1,2} · Aline dos Santos Peixoto³ · Sergio Crovella^{1,2} · Haiana Charifker Schindler³ · Michelle Christiane da Silva Rabello³ · Jaqueline de Azevêdo Silva^{1,2}

Received: 11 May 2020 / Accepted: 28 August 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease with variable outcomes. This variability is due to host immune capacity in containing the infection process initiated by the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Vitamin D is able to modulate a very specific immune response against MTB infection, and its action relies on vitamin D receptor (VDR) binding. Altered VDR forms may compromise vitamin D pathway and proper immune response after MTB infection. Herein we assessed the relationship of five potentially functional polymorphisms from *VDR*: rs2228570 FokI, rs11568820 Cdx-2, rs2248098, rs1540339 and rs4760648, with tuberculosis susceptibility. The SNP rs4760648 T/T was associated with differential susceptibility to tuberculosis (OR = 2.50, 95%CI = 1.20–5.36, $p = 0.01$). The SNP rs1540339 presented association to both T allele (OR = 0.55, 95%CI = 0.35–0.88, $p = 0.01$) and the T/T genotype (OR = 0.404, 95%CI = 0.20–0.78, $p = 0.005$). The FokI T allele was identified as associated to diminished susceptibility (OR = 0.67, 95% CI = 0.45–0.99, $p = 0.04$) to active TB, as well as T/T genotype (OR = 0.15, 95%CI = 0.04–0.45, $p = 9.58 \times 10^{-5}$). We also performed the expression analyses and observed a down-regulation of *VDR* in patients (-10.717 FC, $p = 8.42 \times 10^{-12}$), and according to the presence of associated FokI SNP, we observed that the C/T and T/T genotypes presence increases *VDR* expression ($+1.25$ and $+2.35$ FC, $p = 0.425$ and $p = 0.506$, respectively). This study shows that vitamin D receptor variants can influence upon pulmonary tuberculosis susceptibility and *VDR* mRNA levels are decreased in those patients.

Keywords Tuberculosis · Vitamin D · Polymorphisms · *M. tuberculosis* · VDR · Gene expression

✉ Jaqueline de Azevêdo Silva
jaqueline.azevedo@ufpe.br

Maria Eduarda de Albuquerque Borborema
eduarda.borborema@ufpe.br

Sergio Crovella
sergio.crovella@ufpe.br

Haiana Charifker Schindler
haia@cpqam.fiocruz.br

Michelle Christiane da Silva Rabello
michelle.rabello@cpqam.fiocruz.br

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

² Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Pernambuco CEP 50760-901, Brazil

³ Oswaldo Cruz Foundation, Aggeu Magalhães Research Centre (FIOCRUZ/CPqAM), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Introduction

Tuberculosis (TB) burdens the role of one of the most ancient, compromising and deadly infectious disease worldwide, caused by the *Mycobacterium tuberculosis*, displays quite variable clinical outcomes [9]. Recent data from the World Health Organization shows that about 10 million new cases and eventually 1.5 million deaths by the disease were notified in 2018 [16]. In Brazil, TB it is considered the 4th cause of death by infectious disease [9]. It is estimated that one-third of the World's population is infected with *M. tuberculosis*, but only one out ten individuals developed active TB, leading to a complex interplay enclosing environmental and genetic factors, key modulators in determining individual's differential susceptibility [8].

In view of the roles of genetic and environmental factors in host response, immunomodulatory biomolecules such as

vitamin D (VD), a liposoluble secosteroid hormone, have been highlighted in studies related to TB [4]. VD in its active form 1,25 α -dihydroxyvitamin D₃ (VD₃) or cholecalciferol acts modulating the immune responses [13]. The VD₃ acts as an important modulator in host resistance to infection mechanism by *M. tuberculosis* in a specific manner. By binding to VDR, VD₃ is able to induce, by an independent of interferon gamma pathway, the phagosome-lysosome complex formation [4].

Vitamin D exerts its function through the binding to Vitamin D Receptor (VDR), and many of its biological activities are mediated by high or low affinity of this hormone with its cellular receptor. VDR is located on chromosome 12 (12q13.11) and polymorphisms within the gene lead to variations in transcript length and activity, influencing upon VD pathway [6].

Several studies have reported association between polymorphisms of the VDR gene and the immune response to various diseases. However, the role of the VDR polymorphisms in the susceptibility or resistance to TB remains controversial, what is justifiable once inclusion and exclusion criteria may bias the results. What, by now, only suggests that the VDR variations could contribute to individuals' differential immune response against *M. tuberculosis* [7].

In view of the genetic aspects involved in the development of the disease, and the peculiarities of the Brazilian Northeast population, since several factors influence individual's susceptibility, we assessed differential distribution from VDR most functional SNPs, covering by linkage disequilibrium (LD) most of gene region, and also evaluated its influence in VDR expression in a Northeast Brazilian population.

Materials and methods

Study population and design

We performed an analytical and prospective study divided in an association study and an expression assay. Study participants were recruited from the metropolitan area of Recife, in Northeast of Brazil, from 2013 to 2015 in hospitals and polyclinics of public health. For the association study we investigated two groups: patients (n = 138) with active TB, diagnosis confirmed by clinical and/or radiological evidence and Nested PCR positive for *M. tuberculosis*; and a control group (n = 195). The control group was composed by individuals presenting respiratory symptoms enclosing asthmatics, that apparently, for living in a TB endemic region, display greater chances to be exposed to bacillus, but were tested negative at tuberculin skin test and HIV test. In relative gene expression assay, we performed two major analyses. First, VDR gene expression was analyzed in 20 TB

randomly selected patients in comparison to 20 symptomatic respiratory individuals also randomly selected (control group) to evaluate this gene expression in presence of the disease. In a second analysis, we evaluated in the same individuals VDR gene expression according to presence of FokI polymorphism, which is known to modulate protein size and interaction with VD [5]. The post hoc Power analysis was performed in the G*Power 3.1.9.4 software and the results are included at Table 1.

Genetic association study

Genomic DNA was isolated (25 ng/ μ L) from peripheral blood samples using the *Salting Out* protocol, adapted from Miller et al., (1988). VDR polymorphisms were selected using HapMap database and the SNPbrowser software 4.0 (Applied Biosystems®). The SNP selection was performed according to Minimum Allele Frequency (MAF) > 10%, functions upon protein activation and/or Tagging position throughout the gene coverage area. The selected SNPs were as follows: rs2228570 FokI [C $\rightarrow$ T], rs11568820 Cdx2 [G $\rightarrow$ A], rs2248098 [A $\rightarrow$ G], rs1540339 [C $\rightarrow$ T] and rs4760648 [C $\rightarrow$ T]. Genotyping was performed using TaqMan® fluorogenic probes for each polymorphism, C__12060045_20, C__2880808_10, C__3290630_1_, C__8716064_1_ and C__3290657_10, respectively.

The reactions were performed on ABI 7500 real-time PCR platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following manufacturer's instructions. Allelic discrimination followed as recommended by the manufacturer and analyzed using the SDS software (Applied Biosystems®).

Relative Gene Expression Assay

RNA was isolated from peripheral blood using Trizol®, following manufacturer's instructions. For measure the concentration of RNA samples and evaluated its integrity, a spectrophotometer assay using Nanodrop 2000 (Thermo Scientific USA) and gel electrophoresis were performed, respectively. cDNA synthesis was performed using RT M-MLV commercial kit (Invitrogen USA) following the standard protocol with an RNA input of 500 ng for each sample.

The VDR and the endogenous reference gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene expression were performed using specific TaqMan Gene Expression assays (Hs00172113_m1 and Hs03929097_m1, respectively). All the assays were performed on ABI 7500 platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The Δ Cq method, according to Livak et al. (2001), were used to calculate the relative quantity (Rq) values based on technical triplicates.

Table 1 VDR assessed SNPs distribution in TB patients and controls

SNP ID	TB patients	Controls	OR (95%CI)	p-value
rs11568820 (G > A)	n= 123	n= 161		
Allele				
G	147 (0.60)	195 (0.60)	Ref.	
A	99 (0.40)	127 (0.40)	1.03 (0.72–1.47)	0.863
Codominant				
GG	41 (0.33)	58 (0.36)	Ref.	
GA	65 (0.53)	79 (0.49)	1.16 (0.67–2.02)	0.6
AA	17 (0.14)	24 (0.15)	1.00 (0.44–2.22)	1
rs2228570 (C > T)	n= 138	N= 191		
Allele ^δ				
C	221 (0.84)	279 (0.7)	Ref.	
T	55 (0.16)	103 (0.3)	0.67 (0.45–0.99)	0.04*
Codominant ^δ				
CC	88 (0.64)	110 (0.58)	Ref.	
CT	45 (0.32)	59 (0.31)	0.95 (0.57–1.58)	0.903
TT	5 (0.04)	22 (0.11)	0.15 (0.04–0.45)	9.59 × 10 ⁻⁵ *
rs4760648 (C > T)	n= 96	n= 109		
Allele				
C	89 (0.46)	117 (0.54)	Ref.	
T	103 (0.54)	101 (0.46)	1.34 (0.89–2.02)	0.16
Recessive ^δ				
CC–CT	67 (0.64)	93 (0.85)	Ref.	
TT	29 (0.36)	16 (0.15)	2.50 (1.20–5.35)	0.0107*
Codominant ^δ				
CC	22 (0.23)	24 (0.22)	Ref.	
CT	45 (0.47)	69 (0.63)	0.71 (0.33–1.50)	0.3779
TT	29 (0.30)	16 (0.15)	1.96 (0.79–5.00)	0.1406
rs2248098 (A > G)	n= 96	n= 102		
Allele				
A	90 (0.47)	100 (0.49)	Ref.	
G	102 (0.53)	104 (0.51)	1.08 (0.72–1.65)	0.6882
Codominant				
AA	16 (0.17)	23 (0.225)	Ref.	
AG	58 (0.60)	54 (0.53)	1.53 (0.69–3.47)	0.2694
GG	22 (0.23)	25 (0.245)	1.26 (0.49–3.26)	0.6652
rs1540339 (C > T)	n= 96	n= 95		
Allele ^δ				
C	145 (0.755)	120 (0.63)	Ref.	
T	47 (0.245)	70 (0.37)	0.55 (0.35–0.88)	0.0106*
Codominant ^δ				
CC	58 (0.60)	37 (0.39)	Ref.	
CT	29 (0.30)	46 (0.48)	0.40 (0.20–0.78)	0.0053*
TT	09 (0.10)	12 (0.13)	0.48 (0.16–1.38)	0.1478

The inheritance genetic models presented are the ones statistically associated to diseases' susceptibility

* $p < 0.05$: statistically significant.

^δPower > 0.8

Statistical analyses

For the association study allelic and genotypic frequencies were calculated by direct counting, and Hardy–Weinberg equilibrium was assessed by Chi-squared (χ^2) test using the SNPstats software. Fisher's Exact Test was performed to assess whether genetic variables were associated with tuberculosis susceptibility. The analyses were performed using R software version 3.1.3. (<https://www.r-project.org/>).

To verify the type of sample's distribution of expression analyses, we performed the Shapiro–Wilk test, applying Student's T-test for analysis of variance. Were considered as statistically significant $p < 0.05$ in a 95% confidence interval (CI).

Results and discussion

VDR genotypic profile

All SNPs tested were in Hardy–Weinberg equilibrium, except for rs11568820 (Cdx-2) and rs2248098. The SNP rs4760648 T/T was associated with differential susceptibility to tuberculosis in the recessive model (OR = 2.50, 95%CI = 1.20–5.36, $p = 0.0107$, Table 1). The rs4760648, located at chromosome 12: 47886282 (GRCh38.p12), is a Tag SNP for six other variants of the *VDR* gene. Among the SNPs marked by rs4760648, the rs2853564 is correlated with a greater susceptibility to develop asthma, mainly with hyper reactivity of the bronchi and bronchioles [15]. This leads us to suggest that this ancestral variant may be related with differential susceptibility to pulmonary diseases, correlating with a decreased of immune response capacity of macrophages and pneumocytes in the infection establishment.

Both the T allele and T/T genotype from Tag SNP rs1540339 are associated with a lower susceptibility to active TB development (OR = 0.55, 95%CI = 0.35 – 0.88, $p = 0.01$ and OR = 0.404, 95%CI = 0.20–0.78, $p = 0.005$, respectively). Tag SNP rs1540339 tags three variants within *VDR*, among them, the rs2239181, associated in a study that evaluated the adaptive immune response of children vaccinated against measles in the population of Germany. In the study, the presence of this variant of the *VDR* was related to an increased in the activity and levels of the interferon gamma (IFN- γ) in these individuals [10]. Based on this IFN- γ association, we may suggest that in our population may occur a similar action, since it is one of the earliest cytokines of the cellular immune response that arise to contain the process of infection by *M. tuberculosis* by activation of phagolysosome formation [2]. Therefore, this particular SNP might be related to lower predisposition, since these individuals have a factor associated with increased activity of this cytokine [3].

The FokI (rs2228570) T allele was identified as associated to diminished susceptibility (OR = 0.67, 95%CI = 0.45–0.99, $p = 0.04$). The T/T genotype from this particular SNP, was associated to diminished susceptibility in a codominant model (OR = 0.15, 95%CI = 0.04–0.45, $p = 9.58 \times 10^{-5}$), as showed at Table 1. The ancestral *f* allele (C) for FokI encodes a full length VDR protein, whilst *F* allele (T) results in a VDR final protein three aminoacid (aa) longer, with 427 aa. In silico analysis indicated that this longer isoform interacts more efficiently with Transcription Factor II B (TFIIB), which may increase the transcriptional machinery activation [5]. Since that the presence of SNP variant *F* may increase the complex VTD-VDR interaction, this would potentiate the vitamin D dependent immune response, making difficult the bacillus infection establishment and increasing infection resistance. In fact, in the research by [11], the authors indicated that not only FokI was associated to decreased susceptibility in TB patients but also to householders counter partners [11].

Huang et al. showed in a meta-analysis study (4894 cases and controls 5319) with an OR of 1.34 (CI = 1.091–1.645, p -value = 0.005) significant associations for a higher risk to develop active TB, our results do not corroborate this data since the polymorphism FokI, both for the T allele and genotype T/T confers a minor susceptibility in our study group [12]. In relation to the FokI polymorphism, our studies reveal that the presence of the T allele and the T/T genotype are implicated a less susceptibility against the disease in our population, indicating a biological action unlike the one described in other studies in South Africa [1], Chinese populations [7] and Latin America [14].

No statistically significant association was observed for rs2248098 and rs11568820 Tag SNPs.

VDR expression

We evaluated the expression in patients with active TB compared to control group and observed overall *VDR* expression presented down-regulated in patients (-10.717 FC, $p = 8.42 \times 10^{-12}$, Fig. 1a). When the expression of *VDR* was evaluated according to the presence of associated FokI SNP, our analyses indicated that the C/T and T/T genotypes increases *VDR* expression (+1.25 and +2.35 FC), when compared to C/C genotype, but was not statistically significant ($p = 0.425$ and $p = 0.506$, respectively) (Fig. 1b). The lack of statistical significance may be due to our limited number of patients involved in this study. However, in the study conducted by Panda et al., the authors identified *VDR* mRNA levels were increased in Fok I T allele carriers as well as cathelicidin levels [11].

Over the years several studies in different populations were performed to understand the role of *VDR* polymorphisms and the susceptibility to infectious diseases.

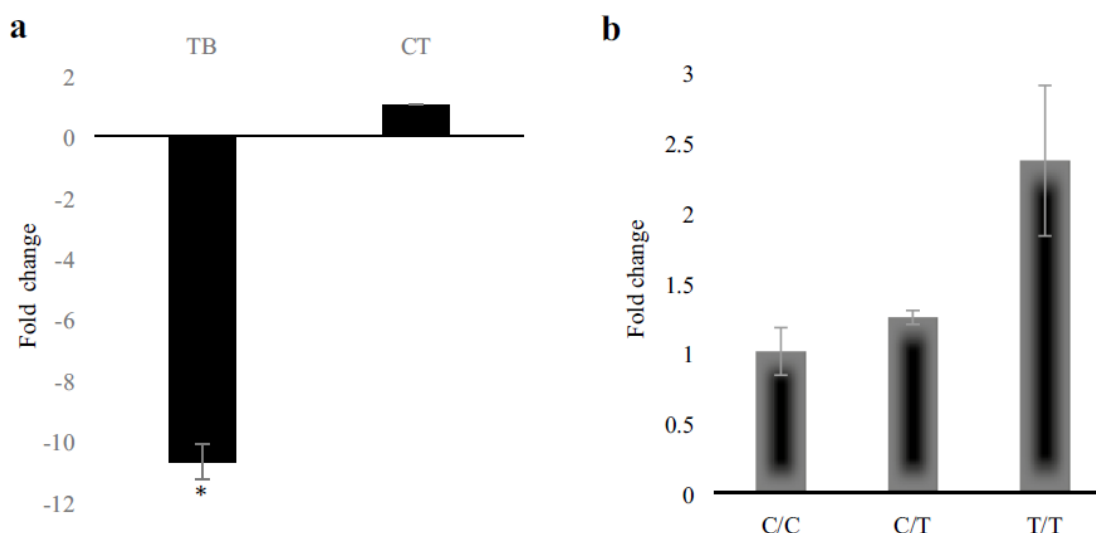


Fig. 1 **a** VDR gene expression in patients with active tuberculosis (TB) vs. symptomatic respiratory controls (CT), **b**. VDR gene expression in patients with active tuberculosis according to FokI

(rs2228570) genotypes. The results were normalized using *GAPDH* as endogenous reference gene. Target gene expression in control group were set at 1. **p*-value < 0.05

Unfortunately, the results have been conflicting so far, mainly due to the fact that the vitamin D acts according cell type and stimuli. Therefore, in our population, not only the SNPs assessed but mRNA levels indicated an influence upon active TB.

Acknowledgements This work was funded FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), Grant Number APQ 0952-2.02/15.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed herein involving human participants were in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki declaration, its later amendments or comparable ethical standards and was approved by the national research committee PLATA-FORMA BRASIL under the reference number 30667014.5.0000.5208.

Informed consent All subjects enrolled in the study signed a written informed consent term.

References

- Babb C, van der Merwe L, Beyers N, Pfeiffer C, Walzl G, Duncan K, van Helden P, Hoal EG (2007) Vitamin D receptor gene polymorphisms and sputum conversion time in pulmonary tuberculosis patients. *Tuberculosis* 87:295–302. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.03.001>
- Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, Wilkinson KA, Banchereau R, Skinner J, Wilkinson RJ, Quinn C, Blankenship D, Dhawan R, Cush JJ, Mejias A, Ramilo O, Kon OM, Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, O'Garra A (2010) An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 466:973–977. <https://doi.org/10.1038/nature09247>
- Chang KC, Leung CC (2010) Systematic review of interferon-gamma release assays in tuberculosis: focus on likelihood ratios. *Thorax* 65:271–276. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.126771>
- Chocano-Bedoya P, Ronnenberg AG (2009) Vitamin D and tuberculosis. *Rev. Nutr.* <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00195.x>
- Dzhebir G, Kamenarska Z, Hristova M, Savov A, Vinkov A, Kaneva R, Mitev V, Dourmishev L (2016) Association of vitamin D receptor gene BsmI B/b and FokI F/f polymorphisms with adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus. *Int J Dermatol* 55:e465–e468. <https://doi.org/10.1111/ijd.13263>
- Hou W, Wan X, Fan J (2015) Variants FokI and BsmI on VDR are associated with the melanoma risk: evidence from the published epidemiological studies. *BMC Genet* 16:14. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0163-6>
- Hu Q, Chen Z, Liang G, Mo F, Zhang H, Xu S, Wang Y, Kang L, Jin T (2016) Vitamin D receptor gene associations with pulmonary tuberculosis in a Tibetan Chinese population. *BMC Infect Dis* 16:469. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1699-4>
- Lawn SD, Zumla AI, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF (2013) Tuberculosis. *Lancet* 378:57–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1200894>
- Ministério da Saúde, 2019. Health Brazil 2018: an analysis of the health situation and of chronic diseases and conditions: challenges and perspectives
- Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Vierkant RA, O'Byrne MM, Jacobson RM, Poland GA (2012) Effects of vitamin A and D receptor gene polymorphisms/haplotypes on immune responses to measles vaccine. *Pharmacogenet Genom* 22:20–31. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834df186>

11. Panda S, Tiwari A, Luthra K, Sharma SK, Singh A (2019) Association of FokI VDR polymorphism with Vitamin D and its associated molecules in pulmonary tuberculosis patients and their household contacts. *Sci Rep* 9:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51803-8>
12. Rask-madsen C, Li Q, Freund B, Feather D, Abramov R, Wu H, Chen K, Yamamoto-hiraoka J, Goldenbogen J, Konstantinos B, Clermont A, Gerald P, Osso CD, Wagers AJ, Huang PL, Reikhter M, Scalia R, Kahn CR, King GL (2011) Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell Metab* 11:379–389. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.013>
13. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF (2012) Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 523:123–133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.001>
14. Wingfield T, Schumacher SG, Sandhu G, Tovar MA, Zevallos K, Baldwin MR, Montoya R, Ramos ES, Jongkaewwattana C, Lewis JJ, Gilman RH, Friedland JS, Evans CA (2014) The seasonality of tuberculosis, sunlight, vitamin D, and household crowding. *J Infect Dis* 210:774–783. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu121>
15. Wjst M (2005) Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC Genet* 6:2. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-2>
16. World Health Organization (2019) WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Switz, Geneva

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.