

YONNE KAROLINE TENÓRIO DE MENEZES

**PAPEL DAS ENZIMAS ALDEÍDO DESIDROGENASES DE
Mycobacterium tuberculosis DURANTE A INTERAÇÃO COM
CÉLULAS CD34+ *IN VITRO***

Dissertação submetida ao Programa de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. André Báfica
Coorientador: Prof. Dra. Fabienne
Ferreira

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Menezes, Yonne Karoline Tenório de
Papel das enzimas Aldeído desidrogenases de
Mycobacterium tuberculosis durante a interação com
células CD34+ in vitro / Yonne Karoline Tenório de
Menezes ; orientador, André Báfica, coorientadora,
Fabienne Antunes Ferreira, 2019.

117 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

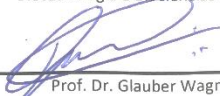
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Aldeído
desidrogenases. 3. Interação Patógeno-Hospedeiro. 4.
Detoxificação. 5. Mycobacterium tuberculosis. I.
Báfica, André . II. Ferreira, Fabienne Antunes.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. IV. Título.

"Papel das enzimas aldeído desidrogenases de *Mycobacterium tuberculosis* durante a interação com células CD34+ in vitro"

Por

Yonne Karoline Tenório de Menezes

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (002/2019/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

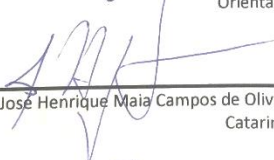


Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr. André Luiz Barbosa Báfica (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Ricardo Ruiz Mazzon (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Miguel e Lia Menezes e à minha querida tia Jovelina Bitencourt.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Universo pela saúde e pela força interior em todos os momentos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Ao professor André Báfica, por aceitar me orientar durante o mestrado. Em poucas palavras, mas com muita gratidão, agradeço-o por todos os ensinamentos, paciência e confiança e por compartilhar o seu amor e empolgação em fazer ciência de verdade, por sua mente brilhante e pelas conversas enriquecedoras, e por ser para mim um “papito” científico durante esses dois anos que passaram e pelos próximos quatro anos que virão, muito obrigada!

À professora Fabienne Ferreira pela coorientação e contribuição com este trabalho, bem como os ensinamentos e palavras de incentivo.

Ao Prof. Johan Van Weyenbergh, por fornecer reagentes indispensáveis para o desenvolvimento desse trabalho. Aos Prof. Daniel Mansur, Fernando Spiller e José Henrique M. Oliveira pelas enriquecedoras contribuições, críticas e sugestões de experimentos.

Aos membros da Banca, Prof. Ricardo Ruiz Mazzon, Prof. José Henrique M. Oliveira e Profa. Luisa Pitaluga por aceitarem avaliar este trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Imunobiologia (LIDI) pela convivência e suporte durante esses dois anos. Por todos os momentos divertidos nas festas juninas e churrascos. Agradeço-os por todos os ensinamentos, científicos e pessoais, e pelas pessoas que literalmente deram o sangue por este trabalho.

Ao Edgar Kozlova e Anelize Baranzeli pela ajuda com os dados de bioinformática apresentados nessa dissertação.

Agradeço em especial aos verdadeiros amigos que fiz, os quais me ajudaram inúmeras vezes sem hesitar, ao Murilo Delgobo, por toda a paciência em ensinar praticamente tudo. Sua disposição e empolgação em me ajudar a planejar cada experimento e nas citometrias foram cruciais para que eu chegasse até aqui, muita gratidão.

À minha querida amiga Márick Starick, por ter chegado tão de mansinho e ter se tornado uma irmã, me ajudando sempre em tudo o que eu preciso (e até quando eu não preciso). Você faz parte disso, por me ouvir e me dar forças nos momentos em que pensei em desistir, por ser meu outro par de mãos dentro do fluxo da TB, por ter sido minha Uber durante os experimentos no HU de madrugada e pelas inúmeras idas e vindas ao CCA para pegar equipamentos, e também e por ser exemplo de mulher feminista, dedicada e cheia de paciência, gratidão à você.

Agradeço à equipe da “TB”: Daniel Mendes, Lucas Mascarin, Ana Abdalla, Márick pela parceria, sugestões em experimentos e em especial à Meice e a Lucilene pela parceria e ajuda na maioria dos experimentos dessa dissertação.

À Greicy Malaquias, por todo o suporte técnico e científico e ao Daniel Patrício pelas incontáveis ajudas no citometro de fluxo e momentos de descontração no corredor.

Gratidão à minha família, por todo o apoio e incentivo que me deram desde que decidi estudar em Florianópolis. Vocês foram o meu porto seguro e toda a força que precisei para chegar até aqui. Em especial, aos meus pais, por todo o sacrifício que fizeram para me manter aqui, por todas as orações e conselhos. Tudo isso é por vocês e aos meus queridos Irmãos, Lucas e Suênya, por sempre torcerem por mim. Obrigada!

Ao Ismael Mesquita, por todo amor dedicado a mim durante esses dois anos. Por compreender o meu estresse e me dar todo o suporte necessário para manter a minha saúde psicológica e física. Você foi meu porto seguro. Obrigada!

Aos meus queridos amigos de Recife, Maya, Cinara, Priscila, Sayonara, Jhonatan, Thiago, Natália, que sempre me apoiaram e me deram forças durante todo esse tempo. Gratidão a vocês. Às minhas queridas professoras, Isabella Macário, Ana Lisa, Claíne Albuquerque e Érika Freitas por me incentivarem na carreira acadêmica durante a minha graduação e por serem exemplo de mulheres cientistas e professoras que espero ser um dia.

À Equipe do LAMEB pela disponibilização de equipamentos que foram utilizados para alguns dos experimentos desse trabalho.

Às agências de financiadoras, CAPES pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto, FAPESC e CNPq.

“Todo progresso acontece fora da zona de conforto”.

Michael John Bobak

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), agente causador da tuberculose em humanos, desencadeia mecanismos que podem contribuir para o seu crescimento intracelular. Por meio de interações moleculares entre proteínas da bactéria e da célula hospedeira, o patógeno pode modular a resposta do hospedeiro durante a infecção. Considerando que *Mtb* pode infectar células-tronco, dados prévios do nosso laboratório demonstraram que durante a infecção em células tronco hematopoiéticas CD34⁺ (HSCs), *Mtb* induz robusta expressão de genes induzidos por ácido retinóico (atRA). Sabendo que o atRA é um potente indutor da expressão gênica, e que as enzimas ALDHs humanas são responsáveis pela sua formação e que *Mtb* também apresenta genes codificantes de ALDHs, o presente trabalho buscou investigar se as enzimas ALDHs do bacilo estariam participando da indução de genes RAREs de células CD34⁺ durante a infecção. Para isso, as bactérias foram previamente tratadas com um inibidor de enzimas ALDHs, Dietilaminobenzaldeído (DEAB) e expostas a células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis (MOI 3) por 72h. Essas células foram marcadas com anticorpos anti-CD34 e anti-CD38 e adquiridas no citômetro de fluxo. Os resultados obtidos demonstram que durante a infecção em células CD34⁺, as ALDHs da bactéria participam da indução da expressão de genes induzidos por atRA (RAREs), como o CD38. Além disso, quando essas enzimas estão inibidas na bactéria, por meio do tratamento prévio com o DEAB, ocorre a redução da expressão do CD38, sugerindo que essas enzimas interagem com a indução de genes RAREs da célula hospedeiro por meio do ácido retinóico. Observamos também que a multiplicação do bacilo durante a infecção é dependente de enzimas ALDHs da célula e da bactéria, sugerindo a importância das ALDHs do *Mtb* na detoxificação de aldeídos gerados durante a infecção. Desta forma, estes dados sugerem que durante a infecção em células CD34⁺, as ALDHs do *Mtb* participam do metabolismo de atRA da célula hospedeira, que resulta no aumento da expressão de genes RAREs, e que as ALDHs são importantes para o crescimento intracelular do bacilo.

Palavras-chave: Aldeído desidrogenases. Ácido retinóico. Detoxificação. *Mycobacterium tuberculosis*. Interação patógeno-hospedeiro.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), the causative agent of tuberculosis in humans, triggers mechanisms that may contribute to its intracellular growth. By means of molecular interactions between bacterial and host cell proteins, the pathogen can modulate host response during infection. Considering that *Mtb* can infect stem cells, previous data from our laboratory demonstrate that during the infection in CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs), *Mtb* induces robust expression of genes induced by retinoic acid (atRA). Knowing that atRA is a potent inducer of gene expression, and that human ALDH enzymes are responsible for its formation and that *Mtb* also has genes encoding ALDHs, the present work sought to investigate whether the enzymes ALDHs of the bacillus would be participating in the induction of genes CD34⁺ RAREs during infection. For this, the bacteria were previously treated with an inhibitor of ALDHs, Diethylaminobenzaldehyde (DEAB) and exposed to peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors (MOI 3) for 72h. These cells were labeled with anti-CD34 and anti-CD38 antibodies and acquired on the flow cytometer. The results obtained demonstrate that, during infection in CD34⁺ cells, bacterial ALDHs participate in induction of atRA gene expression (RAREs), such as CD38. In addition, when these enzymes are inhibited in the bacterium, by prior treatment with DEAB, the CD38 expression is reduced, suggesting that these enzymes interact with the induction of RAREs genes of the host cell by means of retinoic acid. We also observed that the growth of bacillus during infection is dependent on cell and bacterial ALDH enzymes, suggesting the importance of *Mtb* ALDHs in the detoxification of aldehydes generated during infection. Thus, these data suggest that during infection in CD34⁺ cells, *Mtb* ALDHs participate in the atRa metabolism of the host cell, which results in increased expression of RAREs genes, and that ALDHs are important for the intracellular growth of the bacillus.

Keywords: Aldehyde dehydrogenases. Retinoic acid. Detoxification. *Mycobacterium tuberculosis*. Host-pathogen interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
Figura 2 - Via de biossíntese de β -caroteno em bactérias.	26
Figura 3 – Colônias pigmentadas de <i>Mycobacterium</i>	27
Figura 4 - Receptores de Padrões Moleculares associados a patógenos (PAMPs) que interagem com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Esquema ilustrativo dos principais receptores envolvidos no reconhecimento do <i>Mtb</i> e sua localização nas células hospedeiras	30
Figura 5 - Infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em seres humanos	33
Figura 6 - Metabolismo do ácido retinóico em humanos. O retinol ligado ao complexo RBP-TTR-retinol é transportado para o citoplasma através do receptor STRA-6.	39
Figura 7 - Abordagem experimental utilizada para a curva de crescimento de <i>Mtb</i> tratadas com N,N-dietilaminobenzaldeído (DEAB).	47
Figura 8 - Abordagem experimental para o Tratamento de <i>Mtb</i> H37RV com DEAB para infecção.....	49
Figura 9 –Relações entre micobactérias utilizando a presença e ausência de genes envolvidos na biossíntese de carotenoides em micobactérias.	58
Figura 10 - Presença do domínio Aldedh (PF00171) em todas as Aldhs putativas do <i>Mtb</i>	60
Figura 11 - Representação de uma parte do alinhamento de sequências (Clustalo) de ALDHs de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e ALDHs humanas e seus respectivos sítios ativos.	61
Figura 12 - Estrutura terciária de enzimas ALDHs de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	63
Figura 13 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induz o aumento da expressão de CD38 em células CD34 ⁺ humanas.	65
Figura 14 - O estímulo com interferons exógenos não interfere na indução do CD38 in vitro.	66
Figura 15 - O Tratamento do <i>Mtb</i> com DEAB previne a indução de CD38 em células CD34 ⁺ pós infecção.	68
Figura 16 - As enzimas ALDHs do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induzem a expressão do CD38 quando as ALDHs da célula hospedeira estão inibidas.....	71

Figura 17 - A via de sinalização do receptor de ácido retinóico (RAR) é necessária para a indução do CD38 durante a infecção por <i>Mtb</i> em células CD34 ⁺	74
Figura 18 - Os retinóides presentes no soro autólogo induzem o aumento da expressão do CD38 em células CD34 ⁺	116
Figura 19 - As ALDHs de <i>Mtb</i> não são essenciais para o seu crescimento em meio de cultura <i>in vitro</i>	116
Figura 20 - O DEAB inibe a atividade enzimática de enzimas ALDHs presentes no extrato proteico do <i>Mtb</i>	117

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Código de acesso das sequências de proteínas ALDHs depositadas no UNIPROT que foram utilizadas para as análises.....	53
Tabela 2 – Código de acesso do genoma de micobactérias depositadas no Ensembl Bacteria que foram utilizadas para as análises	54
Tabela 3 - Matriz de identidade entre enzimas ALDHs de <i>Mtb</i> e ALDHs	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALDH** Aldeído desidrogenase
atRA all-*trans*- Ácido retinóico
BAA BODIPY-aminoacetato
BAAA BODIPY-aminoacetaldeído
BAAR Bacilo Alcool-ácido Resistente
BCO I oxigenase de clivagem de β -caroteno I
BCO II oxigenase de clivagem de β -caroteno II
BMS 493 Pan agonista-inverso do Receptor de ácido retinóico
CD33 SIGLEC-3
CD34 Cluster of differentiation 4 – Sialomucina
CD38 ADP Ribosil ciclase
CD4 T4/Leu3 – Cluster de diferenciação 4
CD64 Receptor Fc Gama de alta afinidade
CFP Proteínas do filtrado proteico secretadas no meio de cultura
CFP10 *culture filtrate protein 10*
cGAS GMP-AMP cíclico sintase
CR Receptor do complemento
CRPB Proteínas celulares de ligação ao retinol
Crt Cluster gênico para biossíntese de carotenoides
CrtB fitoeno sintase
CrtE geranilgeranil pirofosfato sintase
CrtI fitoeno desaturase
CrtY licopeno ciclase
DCs Células Dendríticas
DC-SIGN *specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin*
DEAB N, N-dietilaminobenzaldeído
DHRS/RDH Desidrogenase/ Redutase Família SDR
DMAPP difosfato de dimetilalilo
DXP 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato
DXS 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase
E.C 1.2.1.3 *Enzyme Classification Aldehyde dehydrogenase (NAD⁺)*
ESAT6 *early secretory antigenic target 6*
FACS *Fluorescence activated cell sorter*
FL fusão fagossomo/lisossomo
FPP C15-farnesil pirofosfato
FVS *Fixable viability staining*
gDNA DNA genômico
GGPP C20-geranilgeranil difosfato

GPP C10-geranil pirofosfato
HK *Heat-killed*
HLA-DR Antígeno leucocitário humano DR HSCs
HSPCs *Hematopoietic Stem/Progenitor cells*
IFN Interferon
IFN- γ Interferon γ
IGRAs *Interferon- γ release assay*
IL- 10 Interleucina 10
IPP isopentenil pirofosfato
ISRE *Interferon-sensitive response element*
LAM Lipoarabinomanana
LRAT lecitina retinol aciltransferase
LXR *Liver X receptor*
MEP 2-C-metil-D-eritritol 4fosfato
MFI Mediana de Intensidade de Fluorescência
Mincle *Macrophage-inducible C-type lectin*
MOI Multiplicidade de Infecção
MR Receptor de Manose
Mtb *Mycobacterium tuberculosis*
MtCCO *Carotenoid cleavage oxygenase*
MVA Mevalonato
NAD⁺ Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOCl Hipoclorito
OADC Ácido oleico, Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Cloreto de Sódio
PBMC Células mononucleares do sangue periférico
PBS Tampão Fosfato-salina
PFA Paraformaldeído
PIM Fosfatidilinositol manosídeo
PPAR γ Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
RAR Receptor de Ácido Retinóico
RAREs Elementos de resposta ao ácido retinóico
RBPs Proteína de ligação ao Retinol
ROS Espécie reativa de oxigênio
RXR Receptor X Retinóide
STING *Stimulator of interferon genes*
TB Tuberculose
TDM trealose 6,6-dimicolato
TGF- β Fator de transformação do crescimento beta
TLR *Toll Like Receptores*
TST *Tuberculosis Skin Test*

TTR Transtirretina

UCB *Umbilical cord blood*

UFC Unidades formadoras de colônia

UV radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. MICOBACTÉRIAS.....	23
1.2. BIOSÍNTESE DE PIGMENTOS E METABOLISMO DE CAROTENOIDES EM MICOBACTÉRIAS.....	24
1.3. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> E INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO.....	28
1.4. TUBERCULOSE.....	31
1.5. ENZIMAS ALDEÍDO DESIDROGENASES (ALDHS) DE EUKARIOTOS E PROCARIOTOS.....	34
1.6. A SÍNTESE DE ÁCIDO RETINÓICO.....	37
1.7. EFEITOS GENÔMICOS DO ÁCIDO RETINÓICO.....	39
1.8. ÁCIDO RETINÓICO NA IMUNIDADE E NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. OBJETIVO GERAL.....	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. REAGENTES.....	44
3.2. COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS	
44	
3.3. AMOSTRA DE SANGUE HUMANO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	44
3.4. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC).....	45
3.5. CULTIVO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	45
3.6. PREPARO DAS BACTÉRIAS PARA INFECÇÃO.....	46
3.7. CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>MTB</i> NA PRESENÇA DO DIETILAMINOBENZALDEÍDO (DEAB).....	46
3.8. TRATAMENTO DE <i>MTB</i> H37RV COM DEAB PARA INFECÇÃO	
48	
3.9. INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE ÁCIDO RETINÓICO (RAR) EM PBMC.....	49
3.10. INIBIÇÃO DE ENZIMAS ALDHs DO PBMC.....	50
3.11. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAL DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
3.12. ENSAIO ENZIMÁTICO DE ALDHS UTILIZANDO O ALDEFLUOR®.....	50
3.13. CITOMETRIA DE FLUXO.....	51

3.14.	ANTICORPOS PARA CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
3.15.	ANÁLISES IN SILICO: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE ENZIMAS ALDHS DE <i>MTB</i> E ALDHS HUMANAS, E PREDIÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS.....	52
3.16.	CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA PARA A VIA DE BIODISSÍNTESE DE CAROTENOIDES EM MICOBACTÉRIAS	53
3.17.	PROCESSAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4.	RESULTADOS.....	57
4.1.	ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIODISSÍNTESE DE B-CAROTENO EM <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	57
4.2.	ANÁLISES IN SILICO: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE ENZIMAS ALDHS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> E ALDHS HUMANAS	
	59	
4.3.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> INDUZ A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA RARE CD38 em células tronco/progenitoras hematopoiéticas (CD34 ⁺) DO SANGUE PERIFÉRICO.....	64
4.4.	O TRATAMENTO COM INTERFERONS EXÓGENOS NÃO INDUZ A EXPRESSÃO DO CD38 EM CÉLULAS CD34 ⁺	65
4.5.	AS ENZIMAS ALDEÍDO DESIDROGENASES (ALDHS) Do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CONTRIBUEM PARA A INDUÇÃO de moléculas <i>rare</i> s EM CÉLULAS CD34 ⁺ DO PBMC HUMANO DURANTE A INFECÇÃO.....	67
4.6.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> INDUZ A EXPRESSÃO <i>RARE</i> S QUANDO AS ALDHS DA CÉLULA HOSPEDEIRA ESTÃO INIBIDAS.....	70
4.7.	A VIA DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE ÁCIDO RETINÓICO (RAR) É NECESSÁRIA PARA INDUÇÃO DO CD38 DURANTE A INFECÇÃO EM CÉLULAS CD34 ⁺ HUMANAS	73
5.	DISCUSSÃO.....	75
6.	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXOS.....	112

1. INTRODUÇÃO

1.1. MICOBACTÉRIAS

As micobactérias, por classificação taxonômica, pertencem ao filo *Actinobacteria*, à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium* (SHINNICK; GOOD, 1994). Eles são bacilos aeróbicos, imóveis, não esporulados e não encapsulados, não possuem flagelos, são álcool-ácido resistentes (BAAR) e possuem alto conteúdo de G + C no genoma (GUPTA; LO; SON, 2018; NIEDERWEISS, 2009; SHINNICK; GOOD, 1994).

A grande maioria das espécies são saprófitas ambientais e algumas micobactérias evoluíram com a capacidade patogênica, como por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, e *M. ulcerans*, agentes patológicos em humanos que causam a tuberculose (Tb), hanseníase e úlcera de Buruli, respectivamente, bem como *M. bovis*, *M. avium paratuberculosis* e *M. marinum*, patógenos de animais não humanos (BRITES; GAGNEUX, 2015; COSMA; SHERMAN; RAMAKRISHNAN, 2003; FOGEL, 2015b).

Até o presente momento, foram descritas 198 espécies de micobactérias (RIOJAS et al., 2018) que são usualmente agrupadas em bactérias de “crescimento rápido” e “crescimento lento” com base no tempo necessário para que apareçam colônias visíveis em meio sólido. O aparecimento de colônias requer menos de 7 dias para espécies de crescimento rápido e mais de 7 dias para espécies de crescimento lento (SHINNICK; GOOD, 1994).

A parede celular das micobactérias é composta por ácidos graxos de cadeia longa denominados ácidos micólicos (compostos por 60 a 90 átomos de carbono) ligados ao arabinogalactano que está ancorado ao peptídeoglicano. Adicionalmente, contém vários lipoglicanos, incluindo o lipoarabinomanana (LAM), seus precursores Lipomanana (LM) e Fosfatidilinositol manosídeo (PIM) (Figura 1) (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; BRIKEN et al., 2004; FORRELLAD et al., 2013; NIEDERWEISS, 2009; SCHLESINGER; HULL; KAUFMAN, 1994). A estrutura complexa da parede celular confere aos bacilos característica álcool-ácido resistente (BAAR) e permitem que esses sejam corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, onde os bacilos são corados com fucsina a quente e resistem a descoloração por uma solução ácida (BRANDT; LLOYD, 1954).

Adicionalmente, muitas bactérias deste gênero produzem pigmentos carotenoides, sendo então classificadas como: fotocromogênicas produtoras de pigmentos amarelos ou laranja em meio de cultura quando são expostas à luz; as estococromogênicas produzem os pigmentos no escuro e, as acromogênicas, são as micobactérias que não produzem pigmentos (RUNYON, 1959a, 1959b, 1970).

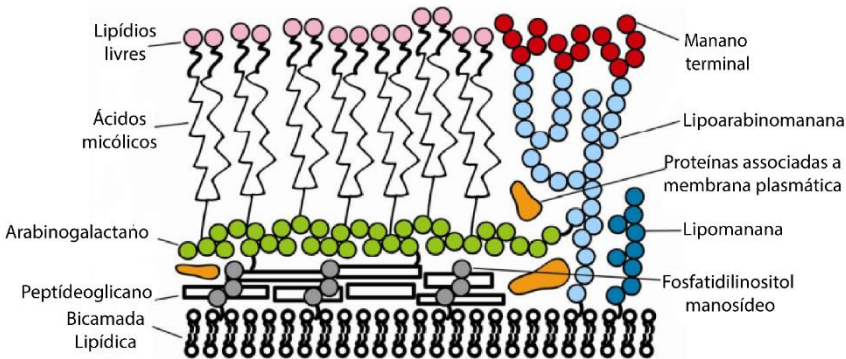


Figura 1 - Representação esquemática da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*. (Adaptado de PARK; BENDELAC, 2000).

1.2. BIOSÍNTESE DE PIGMENTOS E METABOLISMO DE CAROTENOIDES EM MICOBACTÉRIAS

Carotenoides são pigmentos naturais e compostos isoprenóides com esqueleto de polieno e variável número de ligações duplas conjugadas, característica que confere a capacidade de absorver a luz visível, resultando em uma coloração característica entre as faixas amarela a vermelha (BRITTON, 1995; HASHIMOTO; URAGAMI; COGDELL, 2016; PENUELAS; MUNNEBOSCH, 2005). Dependendo da presença ou ausência de anéis terminais em sua estrutura, eles são classificados como carotenoides cíclicos ou acíclicos. Também podem ser classificados com base na sua composição química, onde os que são formados exclusivamente por carbonos e hidrogênio são denominados de carotenos, enquanto que os carotenoides que contêm oxigênio são chamados de xantofilas (RODRIGUEZ-CONCEPCION et al., 2018).

Em bactérias, a biossíntese de carotenoides inicia-se com o precursor isoprenóide básico de 5 carbonos (C5), isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalilo (DMAPP) (LIANG; ZHU; JIANG, 2017; MOISE; AL-BABILI; WURTZEL, 2014; WALTER; STRACK, 2011). As duas principais vias que produzem esses precursores são a via Mevalonato (MVA) e via 2-C-metil-D-eritritol 4 fosfato (MEP)(MOISE; AL-BABILI; WURTZEL, 2014). Em micobactérias, IPP e DMAPP são biossintetizados exclusivamente pela via MEP. Esta via, especificamente em *M. tuberculosis*, inicia-se com a condensação do gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, por meio da enzima 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS), formando o 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) (ROBLEDO; MURILLO; ROUZAUD, 2011; SCHWENDER et al., 1996).

Posteriormente o IPP é condensado com seu isômero DMAPP para gerar C10-geranil pirofosfato (GPP), e então é alongado para C15-farnesil pirofosfato (FPP) para formar o C20-geranilgeranil difosfato (GGPP), a molécula precursora de carotenoides (MOISE; AL-BABILI; WURTZEL, 2014) (figura 2).

Após a condensação do GGPP pela enzima geranilgeranil pirofosfato sintase *CrtE*, a fitoeno sintase codificada pelo gene *CrtB*, desnatura o GGPP para formar o fitoeno, subsequentemente, este é convertido em licopeno, pela fitoeno desaturase codificada pelo *CrtI*. Por fim, os passos de ciclização converte o licopeno em β -caroteno sob a ação da licopeno ciclase *CrtY* (MISAWA et al., 1995; ROBLEDO; MURILLO; ROUZAUD, 2011).

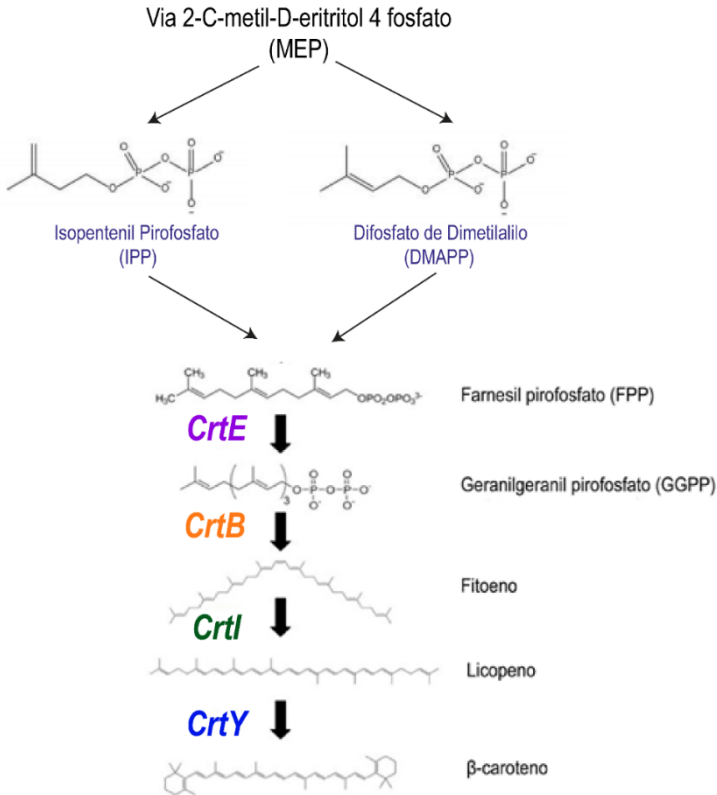


Figura 2 - Via de biossíntese de β-caroteno em bactérias. Esquema ilustrativo demonstra o metabolismo de β-caroteno em *M. marinum* e as enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides e as modificações que elas realizam na molécula

Muitas bactérias do gênero *Mycobacterium* produzem pigmentos amarelo, laranja ou, menos frequentemente, salmão quando estão no escuro (estococromogênicas) ou sob exposição a luz (fotocromogênicas) (Figura 3) (ICHIYAMA; SHIMOKATA; TSUKAMURA, 1988; RILLING, 1962; RUNYON, 1959b, 1970). O principal pigmento produzido por micobactérias são os carotenoides. Em 1930, Chargaff foi o primeiro a demonstrar a presença de carotenoides em *M. phlei*, e análise subsequente demonstrou que o principal carotenoide foi o leproteno (ou isoneriateno) (CHARGAFF *apud* ICHIYAMA; SHIMOKATA; TSUKAMURA, 1988).

A partir de então, vários carotenoides foram encontrados nesta espécie: α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, ξ -caroteno, leproteno, licopeno, criptoxantina e zeaxantina (CHARGAFF; LEDERER, 1935; DAVID, 1974b; DHIR; SIRSI, 1965; INGRAHAM; STEENBOCK, 1935). Adicionalmente, Tárnok e Tárnok (1970) identificaram a presença de pigmentos carotenoides em *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. aurum*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. gordonae* e *M. scrofulaceum* e também já foi reportado a presença de clusters gênicos para a biossíntese de carotenoides em *M. marinum* e *M. aurum* (GAO et al., 2003; HERTZBERG; LIAAEN JENSEN, 1967; HOUSSAINI-IRAQUI et al., 1992; RAMAKRISHNAN et al., 1997; TÁRNOK; TÁRNOK, 1970; VIVEIROS, 2000).

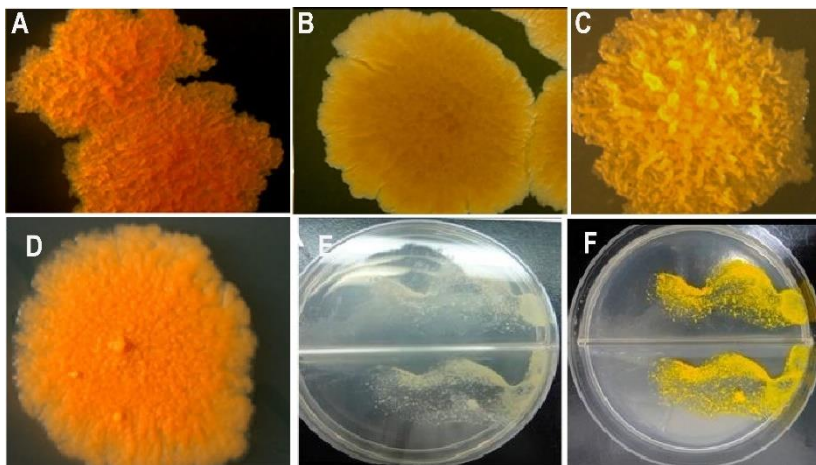


Figura 3 – Colônias pigmentadas de *Mycobacterium*. (A) *M. chubuense*; (B) *M. parafortuitum*; (C) *M. vaccae*; (D) *M. marinum*; (E) Colônias de *M. marinum* em placas de ágar Middlebrook 7H11 mostram a característica fotocromogênica quando cultivadas no escuro e transformam-se em amarelo brilhante logo após a exposição à luz (F) (Adaptado de JULIAN et al., 2010).

Apesar do metabolismo de carotenoides ser pouco explorado em micobactérias, estudos utilizando *M. kansasii* demonstraram que as bactérias sintetizam essencialmente α -caroteno e licopeno, e que os mesmos são utilizados como precursores para a síntese do principal produto final, o β -caroteno (DAVID, 1974a, 1974b).

No entanto, pouco se sabe sobre a função desses pigmentos para a biologia de micobactérias. Dessa forma, alguns estudos sugerem que os carotenoides são importantes para proteção da bactéria contra radiação

ultravioleta (UV) e estresse oxidativo causado pelo excesso de luz (BORONAT; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2014; RILLING, 1962). Já foi demonstrado que algumas micobactérias produzem esses pigmentos quando são submetidas a estresse ácido e entre pH 5.0-6.0, sugerindo um papel protetor contra estresse ácido (SAVIOLA, 2014; SAVIOLA; FELTON, 2011). E quanto as espécies de micobactérias ambientais, a produção desses pigmentos podem ser importantes na proteção contra a luz e acidez presente nos diversos ambientes (SAVIOLA; FELTON, 2011; VERSHININ, 1999).

Comparações genômicas com espécies micobacterianas mais distantes têm sido utilizadas como ferramentas para compreender sobre as mudanças genéticas que levaram ao surgimento de micobactérias causadoras da tuberculose (GORDON et al., 2009). Comparações do genoma total de *Mtb* com cinco espécies como *M. avium paratuberculosis*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. smegmatis* e *M. ulcerans* relevou 1,072 genes ortólogos que são conservados nas 6 espécies (LI et al., 2005; STINEAR et al., 2007, 2008). As comparações de sequência do *core* gênico mostrou que o *Mtb* é mais estreitamente relacionado ao *M. marinum*, entretanto, *M. marinum* tem o genoma 2.2 Mb maior que o *Mtb*. Interessantemente, o *M. marinum* reteve a capacidade de produzir facultativamente pigmentos para proteção contra luz, que é ligado ao cluster gênico para biossíntese de carotenoides *crtE-crtY* que não está presente em *Mtb* (STINEAR et al., 2008).

1.3. *Mycobacterium tuberculosis* E INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), agente etiológico da tuberculose, foi identificado por meio do cultivo de granulomas triturados por Robert Koch em 1881 (KOCH, 1982). Seu tempo de geração é lento e dura cerca de 24h (COLE et al., 1998), mede aproximadamente 0,5 µm de diâmetro e 1-4 µm de comprimento (NIEDERWEISS, 2009).

O Primeiro genoma micobacteriano que foi completamente sequenciado e disponível para a comunidade científica foi o *M. tuberculosis* H37Rv (COLE et al., 1998). Esta linhagem, originalmente isolada de um paciente com tuberculose pulmonar em 1905, é uma cepa de referência do *Mtb* amplamente estudada e que manteve sua completa capacidade de virulência ao longo dos anos (MANCA et al., 1999). A Análise do genoma do *Mtb* H37Rv mostrou que essa bactéria codifica em seu genoma 4.4 megabases (Mb), e possui cerca de 4173 mil genes (COLE et al., 1998).

Como um patógeno intracelular, *Mtb* desencadeia mecanismos que podem contribuir para o seu crescimento e viabilidade dentro do hospedeiro. Isso pode acontecer por meio de interações moleculares entre proteínas da bactéria e da célula hospedeira e, essas interações, permitem que o patógeno module a resposta do hospedeiro durante a infecção (RAPANOEL; MAZANDU; MULDER, 2013).

A respeito dessas interações, é conhecido que a micobactéria utiliza seus fatores de virulência presentes na parede celular como os glicolípídeos ManLaM e Fosfatidilinositol manosídeo (PIM) para interagir com os receptores de manose (MR CD206), e a ligação ao MR medeia a fagocitose e resulta em diminuição da fusão fagossomo/lisossomo (FL), acidificação, *burst* oxidativo bem como liberação de citocinas anti-inflamatórias (ASTARIE-DEQUEKER et al., 1999; CHIEPPA et al., 2003; KANG et al., 2005; QUEVAL; BROSCHE; SIMEONE, 2017; SCHLESINGER, 1996; SINGH et al., 2006; TORRELLES; AZAD; SCHLESINGER, 2006).

LAM e PIM podem interagir com receptores do complemento, CR1, CR2, CR3 e CR4 que medeiam a fagocitose (FERGUSON et al., 2004; MOLD, 1999; SCHLESINGER et al., 1990), e os mesmos também podem se ligar a DC-SIGN (do inglês *specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin*), a interação com este receptor durante a infecção promove a fusão FL e impede a maturação de células dendríticas (GEIJTENBEEK et al., 2003; GUIRADO; SCHLESINGER; KAPLAN, 2013).

Outro componente da parede celular, a trealose 6,6-dimicolato (TDM) interage com receptores Mincl (do inglês *Macrophage-inducible C-type lectin*) e induz a produção de citocinas inflamatórias e formação do granuloma (ISHIKAWA et al., 2009; SCHOENEN et al., 2010). Os lipídios micobacterianos também interagem com os receptores TLRs via TLR2, TLR4 e TLR9 (do inglês *Toll Like Receptors*). LAM, PIM₁ e PIM₆ e lipoproteína 19-kDa são antagonistas do TLR2, enquanto que o TLR4 reconhece *heat shock protein 65* (hsp65) e TLR9 reconhece motivos CpG na micobactéria (BAFICA et al., 2005; JONES et al., 2001; MEANS et al., 1999).

Após a fagocitose, o *Mtb* secreta proteínas como ESAT6/CFP10 (do inglês *early secretory antigenic target 6/culture filtrate protein 10*), SecA1/2, ManLAM e TDM que interfere na maturação do fagossomo (DERETIC et al., 2006; GUIRADO; SCHLESINGER; KAPLAN, 2013; LUGO-VILLARINO; NEYROLLES, 2014). Outro fator de virulência importante é o sistema de secreção ESX-1 que facilita a exportação de produtos bacterianos para o citoplasma da célula hospedeira (GRÖSCHEL

et al., 2016; HOUBEN et al., 2012; MANZANILLO et al., 2012), através da formação de poros na membrana do fagossomo (CONRAD et al., 2017; MANZANILLO et al., 2012), facilitando a interação entre o *Mtb* e seus produtos com as vias de reconhecimento de patógenos como cGAS/STING da célula hospedeira (BHASKAR et al., 2015; COLLINS et al., 2015; WIENS; ERNST, 2016) que implica na indução de IFN do tipo I (DONOVAN et al., 2017; STANLEY et al., 2007). O aumento dos níveis de IFN I se associa com o aumento da susceptibilidade do hospedeiro à infecção (figura 4) (BERRY et al., 2010; BLOOM et al., 2013; ESMAIL et al., 2018; MAERTZDORF et al., 2012; MANCA et al., 2001; OTTENHOFF et al., 2012; SCRIBA et al., 2017).

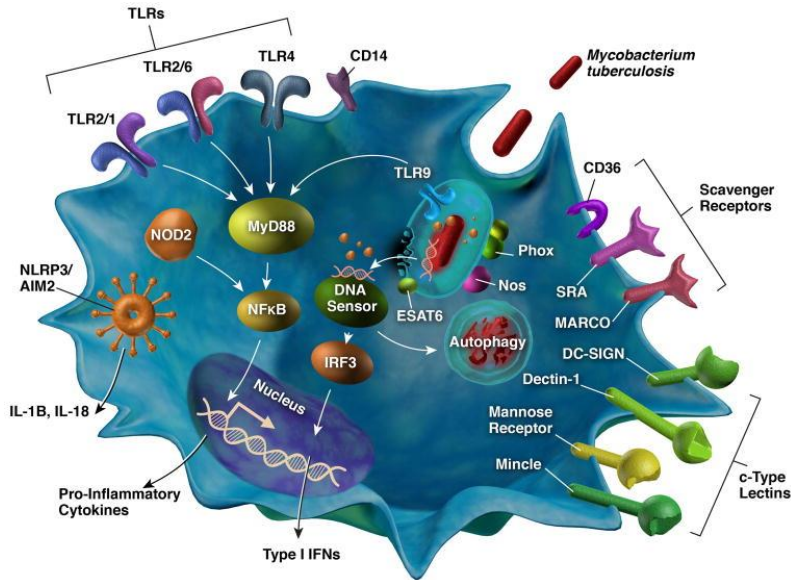


Figura 4 - Receptores de Padrões Moleculares associados a patógenos (PAMPs) que interagem com *Mycobacterium tuberculosis*. Esquema ilustrativo dos principais receptores envolvidos no reconhecimento do *Mtb* e sua localização nas células hospedeiras. Os receptores de reconhecimento de Padrões (PRRs) estão na superfície das células e incluem Receptores do tipo Toll (TLRs), receptores Scavenger e receptores de lectina tipo-c. Os receptores citoplasmáticos reconhecem componentes micobacterianos, como proteínas secretadas e DNA no citoplasma. As principais vias de sinalização são mostradas incluindo secreção de citocina dependente de NFκB e IRF3, secreção de IL-1β mediada por inflamassoma e a ativação de autofagia (STAMM et al., 2015).

É descrito também que durante a infecção o bacilo interage com produtos do metabolismo do hospedeiro para suprimento nutricional, por meio da mobilização e metabolização do colesterol da célula hospedeira, e essa habilidade tem sido atribuída ao gene *mce4* que codifica para um transportador de colesterol (PANDEY; SASSETTI, 2008; RUSSELL et al., 2010), sendo a captação e degradação desses necessários para o crescimento e sobrevivência em macrófagos e camundongos com infecção crônica (NESBITT et al., 2010; PANDEY; SASSETTI, 2008), demonstrando que o metabolismo do colesterol lipídico do hospedeiro desempenha um papel importante na infecção por *Mtb*.

Nesse mesmo conceito, o *Mtb*, durante a infecção, utiliza o lactato do hospedeiro como fonte de carbono, sendo necessária a participação de enzimas Lactato desidrogenases (*Rv1872c*), que a oxida o lactato, que foi requerida para o crescimento intracelular em macrófagos, uma vez que *Mtb* deficientes para esse gene foram incapazes de proliferar em macrófagos derivados do PBMC (BILLIG et al., 2017).

Os trabalhos citados anteriormente mostram como o *Mtb* interage de diferentes maneiras com a célula hospedeira, tanto para modular a resposta imunológica, quanto para adquirir nutrientes durante a infecção.

1.4. TUBERCULOSE

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) compreende algumas espécies e subespécies de micobactérias que compartilham 99,9% de identidade de sequência de DNA, e sequências idênticas de 16S rRNA mas que diferem em sua faixa primária de hospedeiros e patogenicidade (SMITH et al., 2006). As espécies patogênicas pertencentes a esse complexo são *M. tuberculosis* (*Mtb*), *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010; BRITES; GAGNEUX, 2015; SMITH et al., 2006). As espécies adaptadas aos humanos são o *Mycobacterium tuberculosis* (*sensu stricto*) e *M. africanum*, sendo os humanos os únicos hospedeiros conhecidos que mantêm os ciclos de infecção e transmissão (BRITES; GAGNEUX, 2015; SMITH et al., 2006).

Dessa forma, a tuberculose em humanos é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias desse complexo, mas especificamente pelo *M. tuberculosis* (*Mtb*) (FOGEL, 2015b). A exposição ao bacilo leva a dois resultados: infecção latente (LTBI) e tuberculose ativa. No primeiro caso, o patógeno pode ser eliminado pela resposta imune inata, e os testes PPD ou tuberculina (TST -*Tuberculosis Skin Test*) e IGRAs

(*Interferon- γ release assay*) podem ser negativos, ou eliminados pela resposta imune adaptativa, nesse caso o TST e IGRA podem ser positivos ou negativos, dependendo se a resposta das células T de memória foram primadas e o indivíduo não apresenta sintomas clínicos da doença (BARRY et al., 2009; ESMAIL et al., 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS - (OMS, do inglês *World Health Organization* -WHO), em 2017, 10 milhões de pessoas desenvolveram a tuberculose ativa (intervalo, 9,0 - 11,1 milhões), equivalentes a 133 casos por 100.000 habitantes, sendo o continente americano responsável por 2,8% dos casos enquanto que o Sudeste Asiático foi responsável por 44% dos casos, seguido do continente Africano (25%) (WHO, 2017). No Brasil, há uma estimativa de 86 mil casos incidentes em 2017, sendo a maior incidência em homens e indivíduos HIV⁺ (WHO, 2017). Na tuberculose ativa, o patógeno consegue subverter a resposta imunológica do hospedeiro e estabelecer a doença. Nessa fase, os indivíduos desenvolvem os sintomas clínicos que incluem febre noturna, perda de peso, tosse e hemoptise além de apresentarem positividade nos testes microbiológicos, radiografia do pulmão e testes moleculares (ESMAIL et al., 2014; FOGEL, 2015a; PAI et al., 2016; WILDNER et al., 2011).

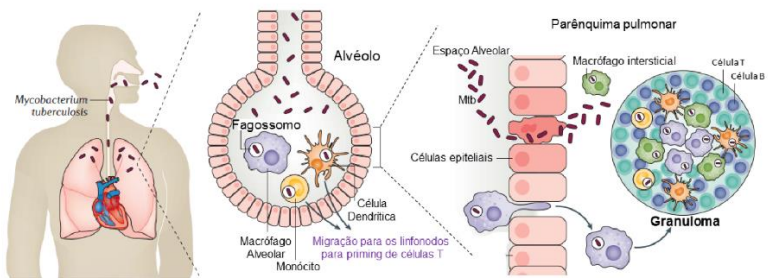
Na fase ativa da doença, os indivíduos infectados transmitem, comumente por meio da tosse, gotículas de aerossol contendo o bacilo. Tendo como rota de entrada o trato respiratório por meio da inalação, a bactéria é translocada para o trato respiratório inferior, onde encontra macrófagos alveolares, que são o tipo celular dominante que o *Mtb* infecta, células dendríticas (DCs) e neutrófilos que internalizam a bactéria por fagocitose mediada por receptores (ARMSTRONG; HART, 1975; BAFICA et al., 2005; BERTHRONG, 1968; HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997; MAY; SPAGNUOLO, 1987; PAI et al., 2016; ROOYAKKERS; STOKES, 2005; SCHLESINGER, 1996; SCHLESINGER et al., 1990; SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; UNDERHILL et al., 1999)

As células que foram inicialmente infectadas liberam citocinas pró-inflamatórias que resulta no recrutamento de mais DCs, monócitos e neutrófilos da corrente sanguínea. Então, as células dendríticas infectadas se ativam e migram para os linfonodos para fazer a apresentação de antígenos às células T. Este evento resulta no recrutamento de células do sistema imunológico, incluindo células T e B para o parênquima pulmonar e formam o granuloma, uma estrutura característica da tuberculose (Figura 5A) (PAI et al., 2016; WIPPERMAN; SAMPSON; T. THOMAS, 2014).

Entretanto, quando essas células não conseguem destruir o patógeno, as bactérias replicam-se dentro do granuloma de tal maneira que podem rompê-lo, e como resultado, os bacilos podem se disseminar eventualmente para outros órgãos. Nessa fase, as bactérias podem entrar na corrente sanguínea ou entrar novamente no pulmão para serem liberadas e infectar novos hospedeiros. A partir desse momento, o hospedeiro infectado torna-se infeccioso, sintomático e passa a ter a forma ativa da doença (Figura 5B) (PAI et al., 2016; WIPPERMAN; SAMPSON; T. THOMAS, 2014).

No entanto, os granulomas do ponto de vista do hospedeiro representam uma barreira para conter a infecção, mas por outro lado, representa para a bactéria, um microambiente onde a mesma pode permanecer em estado latente podendo posteriormente iniciar a proliferação e reativar a doença.

A) Infecção Latente



B) Doença Ativa

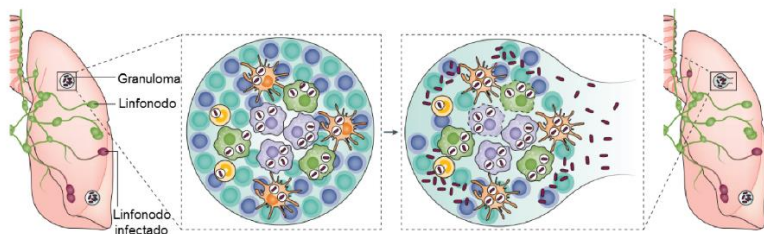


Figura 5 - Infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em seres humanos. Esquema ilustrativo da formação do granuloma durante a tuberculose, em (A) Infecção Latente; (B) Infecção Ativa. (Adaptado de Pai et al., 2016).

1.5. ENZIMAS ALDEÍDO DESIDROGENASES (ALDHS) DE EUCARIOTOS E PROCARIOTOS

Enzimas Aldeído desidrogenases (EC 1.2.1.3) compreendem uma superfamília de enzimas encontradas em todos os três domínios da vida, *Archaea*, *Eubacteria* e *Eukarya*. A presença de enzimas ALDHs, desde organismos unicelulares a organismos mais complexos é sugestivo do papel crucial que essas enzimas desempenham ao longo da história evolutiva (BROCKER et al., 2013; JACKSON et al., 2011). A superfamília ALDH contém enzimas dependentes de NAD(P⁺) que oxidam uma ampla gama de aldeídos para ácidos carboxílicos correspondentes (PEROZICH et al., 1999).

A indução de ALDHs tem sido observada em uma variedade de espécies de plantas expostas ao calor, desidratação, salinidade, antioxidantes, radiação ultravioleta, pesticidas ou metais (BROCKER et al., 2013; GAO; HAN, 2009; KOTCHONI et al., 2006; MISSIHOUN; KOTCHONI; BARTELS, 2018). Trauma mecânico e infecções fúngicas também podem elicitar o aumento da expressão de ALDHs em plantas (WU; SU; PENG, 2007). Bactérias patogênicas encontram estresse oxidativo proveniente da resposta imunológica do hospedeiro que deve ser superada durante a invasão e infecção (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000; MYDEL et al., 2006). Organismos, incluindo leveduras e *Caenorhabditis elegans*, também expressam uma variedade de ALDHs em resposta ao estresse oxidativo (NAVARRO-AVIÑO et al., 1999; SINGH et al., 2008).

Alguns poucos estudos investigaram o papel de ALDHs bacterianas sob condições de estresse químicos e ambientais, e sugerem uma função na proteção contra o estresse oxidativo. Dessa forma, *E. coli* exposta a H₂O₂ produz vários metabólitos aldeídos, conhecidos por serem gerados por ALDHs bacterianas, como glicolato, 4-aminobutirato, e ácido succínico e parece estar envolvida na proteção contra o estresse oxidativo (JOZEF CZUK et al., 2010). Já em *Pseudomonas aeruginosa*, quando exposta ao Arsenito (As³⁺), indutor de estresse oxidativo, aumenta a expressão de ALDHs (PARVATIYAR et al., 2005). Outra bactéria, *Staphylococcus aureus*, exposta ao NaOCl, aumenta a expressão de uma *Alda*, e a deleção desse gene resultou num fenótipo NaOCl-sensível, demonstrando a importância de *Alda* na defesa contra estresse causado por hipoclorito (IMBER et al., 2018). Bactérias ambientais, usadas em biorremediação, como *Acidithiobacillus ferrooxidans* quando exposta a

bornito (Cu_5FeS_4), indutor de estresse oxidativo, aumenta a expressão de uma ALDH desconhecida (ALDH1Q1) (FERRAZ et al., 2011).

As ALDHs bacterianas são reportadas por apresentarem a capacidade de converter diferentes substratos, quando purificadas, demonstrando que são pouco específicas. Diante disso, vários estudos mostram que as ALDHs são capazes de converter aldeídos como, propionaldeído, benzaldeído, valeraldeído, butiraldeído, acetaldeído, 3-hidroxi-propionaldeído, formaldeído, L-1,2-propanediol, metilglioxal, aldeído glicol e Retinaldeído (AZIZ et al., 2017; BOYD et al., 1991; HONG et al., 2016; IMBER et al., 2018; PETER; OPHEM; DUINE, 1990; SU et al., 2015).

Em suma, todos esses trabalhos apontam as ALDHs como uma enzima requerida sob condições de estresse oxidativo, e sugerem que essas estejam envolvidas na proteção por meio da detoxificação e são pouco específicas em relação aos substratos. Além disso, outro trabalho em *Pseudomonas cichorii* aponta uma relação entre ALDH e virulência, uma vez que a deleção desse gene anulou a capacidade da bactéria infectar plantas (TANAKA et al., 2012). Entretanto, o papel da ALDH em *Mtb* durante a infecção de células humanas ainda não foi explorado.

Em humanos, a superfamília de enzimas ALDHs compreendem 19 enzimas divididas em diferentes subfamílias e, são encontradas em um ou mais compartimentos celulares incluindo o citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo (KOPPAKA et al., 2012a; MARCHITTI et al., 2008). Destacando as mais importantes, a subfamília ALDH1A compreende as primeiras ALDHs (ALDH1A1/-1A2/-1A3) que sintetizam ácido retinóico (atRA) a partir do retinal e são cruciais para a regulação da sinalização do atRA, e tem afinidade para oxidação de all-*trans*- e 9-*cis*-retinal (CHEN et al., 2012; YOSHIDA; HSU; DAVÉ, 1992).

O estresse oxidativo induzido pelo álcool desempenha um papel crítico no desenvolvimento de doenças relacionadas ao álcool, como doença hepática alcoólica, cardiomiopatia e gastrite, estando a ALDH2 estritamente relacionada com a detoxificação do acetaldeído (DEY; CEDERBAUM, 2006; RIVERA-MEZA et al., 2019; YOSHIDA et al., 1998). Polimorfismos genéticos no gene *ALDH2* resulta na redução da capacidade de metabolizar o acetaldeído que gera a síndrome do rubor alcoólico, observada na população do leste asiático, e é causada pela acumulação de acetaldeído como resultado da redução da atividade de ALDH2 (HIGUCHI et al., 1995; PARK et al., 2014).

A atividade da ALDH também suporta a homeostase celular através da proteção contra espécies reativas de oxigênio geradas sob condições de

estresse oxidativo. Nesse contexto, ALDH1A1 e ALDH3A1 estão envolvidas em proteger a superfície do tecido ocular de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHEN; MEHTA; VASILIOU, 2009), e manter a integridade da lente córnea através de atividades não enzimáticas, incluindo absorção direta de radiação UV, servindo como chaperonas para evitar agregação de proteínas mal dobradas (ESTEY et al., 2010). A ALDH7A1 foi associada a proteção de células contra estresse hiperosmótico gerando osmólitos, como a betaína, e metabolizando de forma simultânea os aldeídos tóxicos derivados da peroxidação lipídica (BROCKER et al., 2010, 2011).

ALDHs também possuem a capacidade de influenciar a função neural, sendo então demonstrado que ALDH1A1 e ALDH2 estão envolvidas no metabolismo de dopamina, e que a inibição dessas enzimas culminam no acúmulo de metabólitos neurotóxicos, como 3,4-dihidroxifenilacetaldeído, que contribui para a patogênese da doença de Parkinson (BURKE et al., 2003; MARCHITTI; DEITRICH; VASILIOU, 2007). Adicionalmente, a ALDH5A1 é um importante regulador do metabolismo de GABA, e através de suas funções metabólicas está envolvida na neuroproteção (MARCHITTI; DEITRICH; VASILIOU, 2007).

Mutações e polimorfismos em genes ALDHs estão associados com várias condições patofisiológicas em humanos, incluindo síndrome de Sjögren-Larsson, hiperprolinemia tipo II, acidúria γ -hidroxibutírica, epilepsia dependente de piridoxina, hiperamonemia, doenças relacionadas ao álcool, câncer, Alzheimer e Parkinson (AKABOSHI et al., 2003; BURKE et al., 2003; ENOMOTO et al., 1991; KAMINO et al., 2000; ÖNENLI-MUNGAN et al., 2004; RIZZO; CARNEY, 2005; YOKOYAMA et al., 2001).

Atualmente vários inibidores farmacológicos de enzimas ALDHs tem sido desenvolvidos como uma abordagem para o tratamento de doenças. Nesse sentido, o 4-Dietilaminobenzaldeído (DEAB), é um inibidor bem conhecido e foi identificado pela primeira vez há mais de 25 anos, quando demonstrou-se que o uso do DEAB inibe o metabolismo de fármacos mediados pela ALDH, tornando células cancerígenas sensíveis à ação citotóxicas de ciclofosfamidas (RUSSO; HAUGUITZ; HILTON, 1988). Mais recentemente, foi demonstrado que o DEAB reduz a resistência de células do câncer de mama humano à quimioterapia e radiação (CROKER; ALLAN, 2012).

O mecanismo de inibição do DEAB ainda não está totalmente compreendido para todas as classes de ALDHs. No entanto, alguns

trabalhos demonstram que ele é um inibidor competitivo para as classes de ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH1B1, ALDH5A1 enquanto que é um inibidor irreversível de ALDH7A1 (LUO et al., 2015; MORGAN et al., 2015).

1.6. A SÍNTESE DE ÁCIDO RETINÓICO

Em animais, os carotenoides são precursores de retinóides, como retinal e Vitamina A (Retinol) e desempenham importantes funções biológicas e metabólicas (BUSHUE; WAN, 2010; SHETE; QUADRO, 2013). E para formar estes precursores, são requeridas a atividade de enzimas oxigenases de clivagem de carotenoides, que realizam a clivagem simétrica do β -caroteno na posição C15-C15', (KLOER; SCHULZ, 2006; MOISE; AL-BABILI; WURTZEL, 2014; MOISE; VON LINTIG; PALCZEWSKI, 2005; WALTER; FLOSS; STRACK, 2010).

Em animais as enzimas são a BCO I (LINTIG; VOGT, 2000; WYSS et al., 2001) e BCOI I, que clivam o β -caroteno na posição C9-C10', culminando na formação de compostos β -ionina do composto C₁₃ e β -apo-10'carotenal (C₂₇) (HU et al., 2006; KIEFER et al., 2001). O produto do BCOII, β -apo-10'carotenal, culmina na formação de retinal e posteriormente oxidação desses para ácido retinóico, via reações de oxidação desempenhada por enzimas Aldeído desidrogenases (ALDHs) (HU et al., 2006; MARCHITTI et al., 2008; YOSHIDA et al., 1998).

Nesse sentido, os retinóides ou *all-trans*-retinol, são micronutrientes essenciais em vertebrados e apesar da importância dessa molécula, organismos vertebrados não possuem a capacidade de sintetizá-la, e portanto, devem obtê-la através da dieta sob a forma de vitamina A pré-formada, de fontes de origem animal, e pró-vitamina A de origem vegetal (HARRISON, 2012).

Para que seu metabólito ativo, o ácido retinóico (atRA), seja sintetizado deverá ocorrer uma série de reações enzimáticas no citoplasma celular. Primeiramente, o Retinol e o β -caroteno obtido a partir de fontes animais e vegetais é absorvido na mucosa intestinal, e é metabolizado por uma lecitina retinol aciltransferase (LRAT) formando o éster-retinil que é incorporado dentro de quilomícrons e liberados no sistema linfático (NAPOLI, 2017b). Através desse transporte, o retinol chega ao fígado, no qual poderá ser armazenado em células estreladas ou ser liberado na circulação sanguínea para entrega nos demais tecidos (HARRISON, 2012). Na circulação, agrega-se a um complexo formado por proteína de ligação ao retinol (RBPs) e Transtiretina (TTR) devido a sua natureza lipossolúvel

(RHINN; DOLLÉ, 2012; SUN; KAWAGUCHI, 2011; TORNACK et al., 2017) e a entrega deste para as células ocorre através de proteínas específicas como o receptor estimulado por ácido retinóico 6 (STRA-6) ou por difusão passiva (NAPOLI, 2017b; SUN; KAWAGUCHI, 2011).

Uma vez dentro da célula, proteínas celulares de ligação ao retinol (CRPB) se ligam a molécula e enzimas como a DHRS/RDH catalisam a conversão de retinol para retinal e subsequentemente, esse é oxidado a ácido retinóico (atRA) por enzimas aldeído desidrogenases dependentes de NAD^+ (EC 1.2.1.3) (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH8A1) (Figura 6) (JACKSON et al., 2011; KOPPAKA et al., 2012a; RHINN; DOLLÉ, 2012).

Após a formação do atRA, proteínas celulares de ligação ao ácido retinóico (CRABP1 e 2) são responsáveis pelo seu transporte dentro da célula (BERRY et al., 2012; NAPOLI, 2017a). Após sua formação, existem três possíveis destinos. Em um desses, proteínas CRABP1 se ligam ao atRA e o apresentam para enzimas do citocromo P450 da família CYP26 (CYP26A1, B1 e C1) para ser hidroxilado formando um metabólito inativo 4-*oxo*- ácido retinóico (ALONSO; JONES; GHIAUR, 2017; RHINN; DOLLÉ, 2012; ROSS; ZOLFAGHARI, 2011). O segundo destino é através de sinalização parácrina, que consiste em sair da célula e atuar sobre as células vizinhas. O terceiro destino é o seu transporte para o núcleo, através de transportadores CRABP2 (Figura 6) (NAPOLI, 2017a; RHINN; DOLLÉ, 2012).

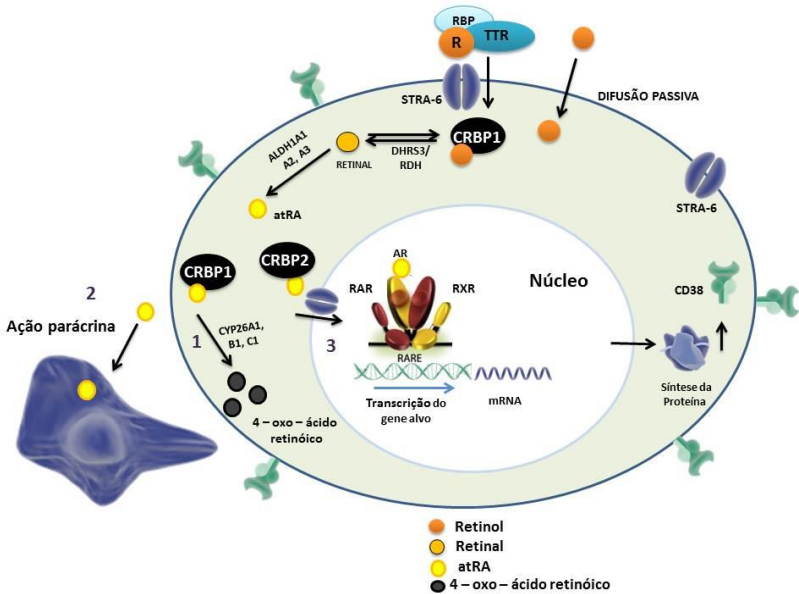


Figura 6 - Metabolismo do ácido retinóico em humanos. O retinol ligado ao complexo RBP-TTR-retinol é transportado para o citoplasma através do receptor STRA-6. No citoplasma, liga-se a proteína de transporte citoplasmática CRBP1 e então é convertido a retinal por enzimas DHR53 ou RDH e subsequentemente convertido a ácido retinóico por enzimas Aldeído desidrogenases (ALDH1A1, ALDH1A2 e ALDH1A3) via reação irreversível utilizando NAD^+ com co-fator. Após a formação do ácido retinóico (atRA) existem três destinos: (1) Degradação por enzimas CYP26A1, B1 e C1, (2) Sinalização parácrina, (3) Sinalização nuclear, no núcleo induzem a expressão de genes induzidos por ácido retinóico.

1.7. EFEITOS GENÔMICOS DO ÁCIDO RETINÓICO

Uma vez no núcleo, o atRA ativa receptores nucleares que regulam diretamente a expressão gênica (URAY; DMITROVSKY; BROWN, 2016). A sua função é exercida através de receptores nucleares do tipo II (SEVER; GLASS, 2013), o receptor de ácido retinóico (RARs) e o receptor x retinóide (RXR), os quais contêm três subtipos: α , β e γ (URAY; DMITROVSKY; BROWN, 2016). Cada subtipo é codificado por genes diferentes e possuem duas ou mais isoformas originados por *splice* alternativo (BASTIEN; ROCHETTE-EGLY, 2004; LALEVÉE et al., 2011).

Sob a ligação dos seus ligantes, RAR e RXR usualmente formam heterodímeros e se ligam a elementos de resposta ao ácido retinóico (RAREs), que consiste em repetições diretas de motivos hexaméricos (A/G)G(G/T)TCA e podem estar separados por 1 a 12 nucleotídeos (DR1 a DR12), além disso, podem fazer heterodímeros com outros receptores nucleares como por exemplo, RXR, LXR ou PPAR γ (KONKIT; CHOI; KIM, 2015; LALEVÉE et al., 2011; URAY; DMITROVSKY; BROWN, 2016). A ligação do heterodímero RAR/RXR aos RAREs é considerada a via clássica do ácido retinóico e, a ativação desta via desencadeará a indução ou repressão gênica (BRAZDA et al., 2011; RENAUD et al., 1995; URAY; DMITROVSKY; BROWN, 2016). A habilidade do atRA e seus receptores em participar da regulação gênica, ativando ou regulando negativamente essas vias, demonstram a importância que o atRA possui sobre diferentes processos fisiológicos e metabólicos.

Farmacologicamente os receptores RAR e RXR podem ser modulados de maneira específica através de agonistas, agonistas inversos, agonistas parciais e antagonistas. Nesse sentido, os arotenoides de estilbeno BMS 493, é um potente agonista inverso que aumenta a interação de RARs com correpressores para regular negativamente a transcrição de genes mediados por RAR (LE MAIRE et al., 2010).

1.8. ÁCIDO RETINÓICO NA IMUNIDADE E NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

O atRA exibe efeitos pleiotrópicos no sistema imunológico (HALL et al., 2011; SINHA et al., 2016). Nesse contexto, em células T CD4⁺, atRA promove um efeito pro-inflamatório em resposta à infecção por *Toxoplasma gondii* via sinalização do receptor RAR α e este receptor é necessário para a ativação das células T (HALL et al., 2011). Em macrófagos, O RAR γ desempenha papel importante na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias (DZHAGALOV; CHAMBON; HE, 2007). Entretanto, em células T regulatórias CD4⁺ Foxp3⁺ o atRA induz a diferenciação dependente de TGF- β e IL-10 através da inibição transcricional de citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ , IL-21 e IL-4 (HILL et al., 2008; SANJABI et al., 2009). Em macrófagos estimulados com LPS e tratados com atRA, ocorre a inibição da produção de TNF- α , IL-12 e Óxido nítrico e aumento na produção de IL-10 que pode atuar na inibição de citocinas pro-inflamatórias (WANG; ALLEN; BALLOW, 2007). Em célula NK, tem um efeito anti-inflamatório por inibir a produção de IFN- γ (CHANG; HOU, 2015).

O atRA influencia, diretamente ou indiretamente, a migração, a proliferação, diferenciação e função de vários linfócitos inatos, incluindo, ILCs, TCR $\gamma\delta$ s, NKT e NK (KIM; TAPAROWSKY; KIM, 2015; MUCIDA et al., 2007; RUITER; PATIL; SHREFFLER, 2015).

Diante desses trabalhos, observamos como o sistema imunológico é influenciado pelos efeitos mediados pelo ácido retinóico, não apenas para o desenvolvimento de tecidos linfóides primários e secundários, mas para a diferenciação de várias células e controle da resposta imune inflamatória e anti-inflamatória. Além disso, os efeitos específicos que o atRA possui sob a resposta imune nem sempre são previsíveis, pois dependem do tipo celular, das isoformas do receptor RAR, das condições experimentais e, da concentração de atRA que resulta em diferentes fenótipos como os descrito acima (LARANJE; CHEROUTRE, 2016; PINO-LAGOS; BENSON; NOELLE, 2012).

Adicionalmente, vários estudos demonstram a importância do atRA para o desenvolvimento embrionário, crescimento e desenvolvimento de tecidos, bem como para a regulação do sistema imunológico, regulação gênica e diferenciação celular (ANG et al., 1996; ARTS et al., 2015; BALMER; BLOMHOFF, 2002; BASTIEN; ROCHETTE-EGLY, 2004; BOWLES et al., 2006; CAMMAS et al., 2007; CAÑETE et al., 2017; CHAPPELLIER et al., 2002; CHEN et al., 2007; CHEN; ONISKO; NAPOLI, 2008; DURSTON et al., 1989; GHIAUR et al., 2013; GUDAS, 2015; KASTNER, 2001; LALEVÉE et al., 2011; LAURSEN; GUDAS, 2018; LIU et al., 2005; MURAMOTO et al., 2010; ORFALI et al., 2015; PINO-LAGOS; BENSON; NOELLE, 2012; RHINN; DOLLÉ, 2012; XIN M. LUO; ROSS, 2006).

A respeito da diferenciação celular, foi demonstrado que o ácido retinóico induz a diferenciação de células HL-60 (BREITMAN; SELONICK; COLLINS, 1980) e isso permitiu a sua utilização na terapia de leucemia promielocítica aguda para induzir a diferenciação terminal de granulócitos imaturos (HUANG et al., 1988). Posteriormente descobriu-se que esta diferenciação é dependente dos receptores RAR subtipo α (COLLINS; ROBERTSON; MUELLER, 1990). Já em células tronco embrionárias de camundongos (EB3), o atRA promove a diferenciação neuronal e caudalização de maneira concentração-dependente (OKADA et al., 2004). Um estudo realizado por Tocci e colaboradores (1996) demonstrou que células precursoras lin^{-c}-kit⁺Sca-1⁺ (progenitoras hematopoiéticas) cultivadas na presença de 1 μ M de atRA aumentam a expressão de marcadores monocíticos, F4/80, após 7 dias de cultura (TOCCI et al., 1996). Em células tronco hematopoiéticas CD34⁺CD38⁻ a

inibição da sinalização do ácido retinóico por meio da inibição do receptor RAR promove a expansão destas células *in vitro* enquanto que a adição de atRA reverte este efeito, demonstrando que o atRA é importante para a diferenciação dessas células (GHIAUR et al., 2013).

Desta forma, a habilidade do atRA induzir diretamente a diferenciação em células tronco embrionárias e hematopoiéticas chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa. Análise de transcriptomas de células-tronco hematopoiéticas CD34⁺ expostas a *Mtb in vitro* demonstrou cerca de 150 genes RAREs diferencialmente expressos durante a infecção (Dados não demonstrados). Dentre estes, o gene que codifica a proteína CD38, uma ectoenzima com atividade bifuncional de ADP-ribosil ciclase e ADP-ribosil hidrolase (MEHTA; SHAHID; MALAVASI, 1996), estava aumentada em células expostas ao *Mtb* quando comparadas as culturas controles não infectadas, sugerindo a participação de enzimas ALDHs na ativação desta via. O CD38 é um clássico gene RARE presente na membrana celular (MEHTA; SHAHID; MALAVASI, 1996) e pode ser facilmente mensurado por citometria de fluxo. Portanto, neste trabalho o CD38 foi escolhido como um indicador da ativação de genes RAREs o qual pode apontar para a produção de atRA durante a infecção.

Entretanto, ainda não foi explorado se as ALDHs de *Mtb* participam da ativação de genes RAREs (ex.:CD38) durante a infecção de células progenitoras-hematopoiéticas humanas CD34⁺.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a participação de enzimas Aldeído desidrogenases de *Mycobacterium tuberculosis* na ativação de genes RAREs em células progenitoras-hematopoiéticas CD34⁺ durante a infecção.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análises *in silico*, através de ferramentas de bioinformática, dos genes Aldeído desidrogenases do *Mycobacterium tuberculosis*.
- Caracterizar a contribuição de enzimas Aldeído desidrogenases do *Mycobacterium tuberculosis* durante a interação com a célula hospedeira.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

As citocinas recombinantes humanas IFN- α , IFN- β , IFN- γ foram obtidos pela empresa Immunotools. O inibidor de enzimas ALDHs N,N-dietilaminobenzaldeído (DEAB) foi obtido pela empresa Sigma. O Inibidor do receptor de ácido retinóico pan-agonista inverso RAR BMS 493 foi adquirido pela empresa Tocris. Aldefluor™ foi obtido pela empresa StemCell. Esses reagentes foram utilizados em diferentes unidades e concentrações indicadas em cada ensaio.

3.2. COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS

O uso de sangue de doadores para a realização deste trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina sob o protocolo CAAE: 89894417.8.0000.0121.

3.3. AMOSTRA DE SANGUE HUMANO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O sangue de doadores saudáveis foi utilizado para obtenção de células mononucleares. Doadores entre 20 e 40 anos foram recrutados voluntariamente para o estudo mediante consentimento por escrito do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). (modelo em anexo). Nenhum dos doadores tinha histórico médico de doença significativa e nenhum havia feito uso de medicamentos até 1 semana ou consumido bebida alcóolica nas últimas 72h. Também não foi possível testar a reatividade desses indivíduos quanto a exposição ao *Mtb*. As coletas foram realizadas no período da manhã, e o sangue periférico coletados em tubos de coleta de sangue a vácuo contendo heparina de lítio 6 ml (OLEN) com o auxílio de agulha vacutainer (BD Vacutainer PrecisionGlide 21Gx1, (0,8 x 25 mm)), e o soro coletados em tubos de 4 ml Vacutainer® Serum (Becton Dickson, E.U.A).

3.4. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

As células mononucleares (PBMC) foram obtidas a partir de separação por gradiente Ficoll, como descrito por Böyum (1968).

Brevemente, no fluxo laminar, o sangue coletado dos doadores foi transferido para tubos cônicos de 50 ml e diluídos em PBS na proporção (1:1). A solução sangue-salina foi lentamente adicionada sob o reagente Ficoll-Paque (GE Healthcare), em ângulo de 45° na proporção 2:1 com auxílio de um pipetador automático para que eles não se misturem. Centrifugou-se esta solução por 453 x g por 40 minutos, na ausência de aceleração e freio à temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fração superior contendo plasma e plaquetas foi retirada com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, e a fase intermediária contendo o anel de células mononucleares (PBMC) foi coletada com pipeta Pasteur e transferida para um novo tubo cônico de 50 ml. As células foram lavadas três vezes com PBS, no volume final de 40 ml nas respectivas centrifugações: 453, 290 e 201 x g cada uma por 10 minutos.

Em cada lavagem, o sobrenadante era removido e o *pellet* celular era suspenso em PBS residual, e lavadas com 40 ml de PBS. Após a última lavagem, as células eram suspensas em 1 ml de meio RPMI – 1640 (E.U.A) e contadas com auxílio da câmara de Neubauer e posteriormente cultivadas na concentração 5×10^5 células/poço em meio RPMI – 1640 suplementado com 1% de soro autólogo inativado, 2 mM de L-glutamina (Life Technologies), 1 mM Piruvato de sódio (Life Technologies) e 25 mM de HEPES (Life Technologies) em placa de 96 poços tendo como volume final 200 µl (Kasvi).

3.5. CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Todos os procedimentos envolvendo *Mtb* foram realizados em cabine de segurança biológica com nível de biossegurança 2 (NB2), utilizando máscaras N-95 (3M), luvas, toucas e jalecos descartáveis como proteção individual.

As culturas de *Mtb* eram mantidas através de repiques semanais de amostras congeladas da cepa laboratorial H37Rv em freezer – 20°C. Após o descongelamento, a suspensão bacteriana era semeada em meio sólido Löwestein-Jensen (LJ – Labocrin, Brasil). Para o cultivo em meio líquido, foram utilizados tubos cônicos de 50 ml contendo o meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco™ Becton Dickson, E.U.A) enriquecido com

0,2% de glicerol (Vetec), 10% OADC (Ácido oleico, Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Cloreto de Sódio) e 0,05% de Tween 80. Os repiques eram mantidos em estufa a 37°C por 2-3 semanas.

3.6. PREPARO DAS BACTÉRIAS PARA INFECÇÃO

As colônias eram retiradas do meio LJ com auxílio de um palito estéril e transferidas para um tubo com rosca contendo pérolas de vidro que foi agitado em vórtex, para dissociação de agregados bacterianos e deixados em repouso por 15 minutos. Posteriormente, 1 ml de PBS foi adicionado ao tubo e agitado novamente conforme o procedimento anterior.

Esta suspensão foi transferida para um novo tubo e a concentração de bactérias foi ajustada de acordo com o padrão de turbidez da escala McFarland 0,5, equivalente a $1,5 \times 10^8$ bactérias/ml. Então centrifugou-se 1 ml da escala McFarland 0,5 a $12.000 \times g$ por 30 minutos, o sobrenadante era removido e as bactérias suspendidas em 1 ml de meio de cultivo RPMI completo.

Para confirmação da escala McFarland utilizada em cada experimento, era realizada diluições seriadas na ordem de 10^{-6} e 90 μ l dessa suspensão eram plaqueados em placas de Petri com divisória contendo ágar Middlebrook 7H10 (Difco™ Becton Dickson, E.U.A) enriquecido com 5% de Glicerol e 10% de OADC (Ácido oleico, Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Cloreto de Sódio) e incubados a 37°C por 3 semanas. Após o tempo de incubação, era realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.7. CURVA DE CRESCIMENTO DE *MTB* NA PRESENÇA DO DIETILAMINOBENZALDEÍDO (DEAB)

Para verificar se o crescimento das bactérias era afetado durante o tratamento com o inibidor das ALDHs, realizamos uma curva de crescimento da bactéria durante 7 dias. Utilizamos o N, N Dietilaminobenzaldeído (DEAB) (Sigma, E.U.A), um substrato aldeído que funciona como inibidor irreversível de enzimas ALDHs (LUO et al., 2015) para realizar os experimentos de inibição de ALDHs na bactéria.

Inicialmente, as bactérias eram preparadas conforme o procedimento descrito no tópico 3.7. Posteriormente, o correspondente a escala McFarland 0,5 foram lavadas com PBS, centrifugadas a $12.000 \times g$ por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido, e as

bactérias suspensas em 1 ml de meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco™ Becton Dickson) enriquecido com 0,2% de glicerol (Vetec), 10% OADC (Ácido oleico, Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Cloreto de Sódio) e 0,05% de Tween 80 em contendo concentrações finais de 1, 10 e 100 μM de Dietilaminobenzaldeído (Sigma, E.U.A) (Figura 7). Posteriormente, foram mantidas em estufa a 37° C, pelos tempos de 3h, 3, 5 e 7 dias.

Após o tempo de incubação, as bactérias eram lavadas duas vezes com solução PBS, e a amostra diluída na ordem 10 em solução 0,05% de Tween 80 e 90 μl das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , foram plaqueadas em duplicata em meio ágar Middlebrook 7H10 (Difco™ Becton Dickson, E.U.A) enriquecido com 5% de Glicerol e 10% de OADC. Após 3 semanas era realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

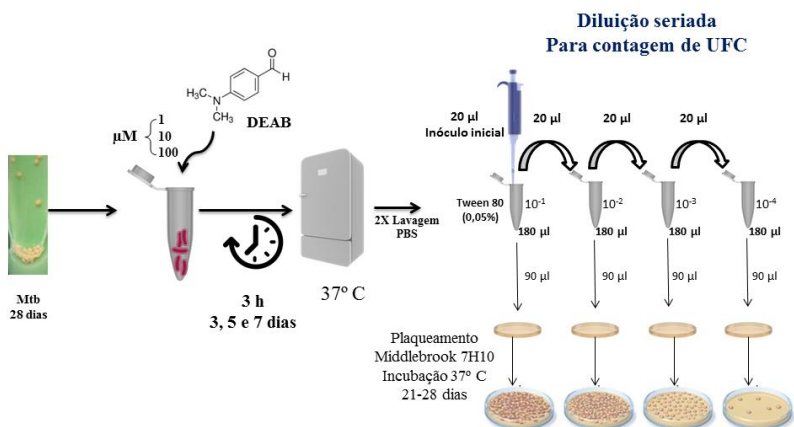


Figura 7 - Abordagem experimental utilizada para a curva de crescimento de *Mtb* tratadas com N,N-dietilaminobenzaldeído (DEAB). A partir de um repique de 21 dias em meio LJ, as bactérias foram raspadas do meio e vortexadas em um tubo contendo esferas de vidro para desagregar as colônias. Uma suspensão de bactérias correspondente à escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) foi feita e 1 ml transferida para tubos de 1,5 ml. Estes foram centrifugados e sobrenadante removido. Então, as células foram suspensas em 1 ml de meio líquido Middlebrook 7H9 (enriquecido com 10% de OADC e Tween 0,05%) contendo concentração final de 1, 10 e 100 μM de DEAB. Após cada Time-point, os tubos foram centrifugados e lavados duas vezes com PBS. Por último, foi suspenso em 1 ml de Tween 80 (0,05%) e feitas diluições de ordem 10 e plaqueadas em meio sólido Middlebrook 7H10 (enriquecido com 10% OADC). As placas foram mantidas vedadas em estufa a 37°C e a contagem das colônias realizadas a partir do 21° dia.

3.8. TRATAMENTO DE *MTB* H37RV COM DEAB PARA INFECÇÃO

Primeiramente, *Mtb* H37Rv em meio LJ com 21 dias de cultivo foi preparada como descrito no tópico 1.5. Posteriormente, as bactérias foram ajustadas para a escala McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) e tratadas com 10 e 100 μM de Dietilaminobenzaldeído (Sigma, E.U.A) como descrito no **tópico 3.8**.

Após o tempo de incubação, as bactérias foram centrifugadas a $20817 \times g$ por 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS e suspendidas em 1 ml de meio RPMI – 1640 completo (L-glutamina e Bicarbonato de sódio, Sigma, E.U.A). Dessa suspensão, foi retirado o volume em μl que correspondesse ao MOI 3 e adicionado a cultura de PBMCs em meio RPMI completo (5×10^5 células/poço) conforme o ilustrado na figura 8. Estas células foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 .

Adicionalmente, realizou-se a lise destas células nos tempos 4, 24 e 72h, com solução Tween 80 (0,05%), e feito diluições de ordem 10. Então, foram plaqueadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco™ Becton Dickson, E.U.A) enriquecido com 5% de Glicerol e 10% de OADC (Ácido oleico, Albumina bovina, Dextrose, Catalase e Cloreto de Sódio) para que fosse possível realizar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml).

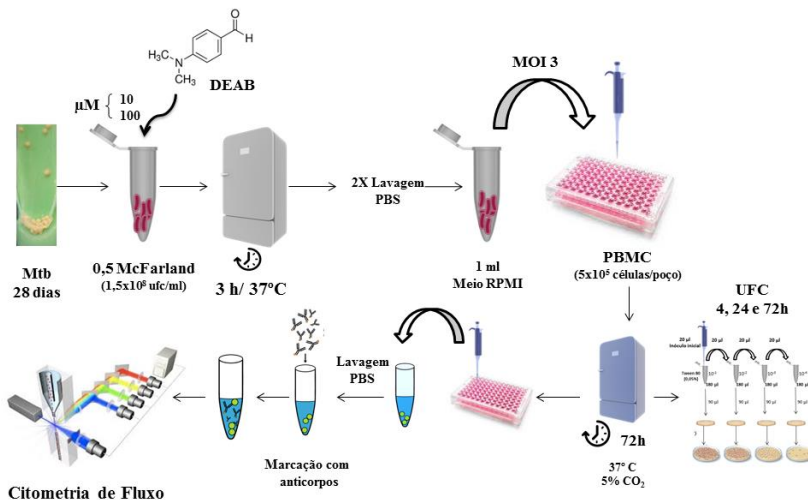


Figura 8 - Abordagem experimental para o Tratamento de *Mtb* H37RV com DEAB para infecção. A partir de um repique em meio sólido LJ, as bactérias (0,5 McFarland) foram submetidas ao tratamento com o 10 e 100µM do DEAB em meio líquido Middlebrook 7H9 durante 3h a 37°C. Após este tempo, as bactérias foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS. Ao final da última lavagem, as bactérias foram suspensas em 1 ml de meio RPMI e expostas às células PBMCs em MOI 3. Posteriormente, foram mantidas em estufa, a 37°C com 5% de CO₂. Para verificar a viabilidade da bactéria durante a infecção, CFU foi realizado nos tempos de 4, 24 e 72h. Após 72h, as células foram retiradas dos poços por pipetagem vigorosa e transferidas para um tubo de 1,5 ml. As mesmas foram lavadas com PBS e marcadas com anticorpos e adquiridas no citometro de fluxo FACS Verse – BD.

3.9. INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE ÁCIDO RETINÓICO (RAR) EM PBMC

Para os experimentos de inibição do receptor RAR, utilizamos um pan-agonista inverso do receptor de ácido retinóico (BMS 493, Tocris). Este aumenta a interação de correpressores nucleares (NCoR) com os RAR, e a ligação deste aos receptores induz mudanças conformacionais em todos os três tipos de RAR (α , β e γ). O inibidor BMS 493 foi diluído 1:10 em meio RPMI, para diminuir a concentração do DMSO, veículo no qual o BMS 493 está solubilizado. O PBMC (5×10^5 células/poço) foi submetido ao tratamento com 3 µM do BMS 493 (Tocris) 2 horas antes da infecção.

3.10. INIBIÇÃO DE ENZIMAS ALDHS DO PBMC

Para os experimentos de inibição de enzimas ALDHs, utilizamos o DEAB. Este inibidor foi diluído 1:10 em meio RPMI, para diminuir a concentração do DMSO, veículo no qual o BMS 493 está solubilizado. O PBMC (5×10^5 células/poço) foi submetido ao tratamento com 100 μ M do DEAB (Sigma) 2 horas antes da infecção.

3.11. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAL DE *Mycobacterium tuberculosis*

As bactérias foram cultivadas em meio líquido conforme o **tópico 3.6**. Após 21 dias, as bactérias foram centrifugadas a 3000 x g por 30 minutos a 4°C. O *pellet* celular foi lavado duas vezes com tampão Fosfato (50 mM), pH 7.0. Ao final das lavagens, as bactérias foram suspensas em 1 ml de tampão fosfato (50 mM), pH 7.0 contendo inibidor de protease (Complete Mini Protease Inhibitor tablets, Roche) na proporção 1:25.

A suspensão bacteriana foi transferida para tubos de lise [criotubos de 2 ml com tampa de rosca (Sarstedt, Alemanha) contendo 500 μ L de pérolas de sílica/zircônio de 0,1 mm (BioSpec Products Inc., EUA) lavadas previamente com Ácido Clorídrico], os quais foram submetidos a agitação no equipamento Precellys 24[®] (Bertin Instruments, França) a 6000 rpm por 6 ciclos de 30 segundos (BILLIG et al., 2017), após cada ciclo os tubos foram mantidos no gelo. Após o último ciclo, os tubos foram centrifugados a 16.000 x g durante 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer – 80°C. Proteínas foram então quantificadas através do Kit Pierce BCA Protein assay (Thermo Fisher), seguindo protocolo do fabricante.

3.12. ENSAIO ENZIMÁTICO DE ALDHS UTILIZANDO O ALDEFLUOR[®]

Com o objetivo de verificarmos se as ALDHs de *Mtb* são funcionais, adaptamos um protocolo utilizado para detecção de células tronco por citometria de fluxo baseado na atividade de enzimas ALDHs. O Kit utilizado foi ALDEFLUOR da Empresa StemCell. Esse kit é utilizado na citometria e funciona da seguinte maneira, brevemente, o BODIPY-aminoacetaldeído (BAAA), um substrato não tóxico fluorescente na

presença de enzimas ALDH, BAAA é convertido em BODIPY-aminoacetato (BAA), um produto carregado negativamente que é retido dentro da célula. O Acúmulo intracelular do BAA culmina no aumento da fluorescência, e as células ALDH-Bright (ALDH^{br}) podem ser analisadas por citometria de fluxo. Quanto maior a atividade de ALDHs da célula, maior será a fluorescência. Como controle, o DEAB é usado.

Diante disso, nossas tentativas em utilizar esse kit em células viáveis de *Mtb* não foram bem-sucedidas, e, portanto, adaptamos este ensaio para ser realizado com o extrato proteico total da bactéria e os dados serem obtidos em multileitora de fluorescência TECAN.

Para este ensaio, 50 µg do extrato proteico celular foi adicionado a uma placa de 96 poços contendo Tampão fosfato (50 mM), pH 7.0, 1,5 mM de β-NAD⁺, 0,1 µM de AldefluorTM em volume final de 200 µl. Para o ensaio de inibição pelo DEAB, foi adicionado 100 µM do DEAB ao mesmo tampão anterior, e para início da reação, o AldefluorTM e β-NAD⁺ foram pipetados e a dados de fluorescência foram obtidos por meio da multileitora TECAN, utilizando fluorescência com excitação a 488 nm e emissão a 520 nm. As leituras foram realizadas a cada 30 segundos durante 10 minutos.

3.13. CITOMETRIA DE FLUXO

Populações celulares foram analisadas por citometria de fluxo para caracterização do fenótipo da molécula CD38. Brevemente as células foram coletadas da placa através de pipetagem vigorosa e centrifugadas a 450 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer - 20°C. As células foram lavadas com 1 ml de PBS e centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. As células foram marcadas com corante fixável de viabilidade celular BD HorizonTM Fixable Viability Stain v450 (BD Biosciences) na concentração 1:1000 (diluído em PBS sem soro) por 15 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Terminado o tempo de incubação, as células eram lavadas com tampão FACS (Solução BSA 1% e azida sódica 0,1% em PBS) e centrifugadas nas condições citadas anteriormente.

Em seguidas as células foram marcadas e incubadas durante 1 hora no gelo com o seguinte mix de anticorpos: anti-CD34- PE (1:2); anti-CD14-FITC ou ALEXA 488 (1:50), anti-CD38-APC (1:100), diluídos em com tampão FACS, tendo como volume final de marcação 25 µl. Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com 1 ml de tampão FACS e fixadas com 200 µl de Paraformaldeído 2%.

Eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACS Verse com o software FACSuite (BD Bioscience). A análise dos dados de citometria foram feitas no software Flowjo v. 10.1 (TreeStar).

3.14. ANTICORPOS PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Os anticorpos utilizados neste trabalho foram anti- CD3 FITC (Clone UCHT1, Biolegend), anti-CD14 FITC (Clone M5E2, BD Pharmingen™), CD14-A488 (Clone 63D3, BD Pharmingen™), CD34-PE (Clone 581, BD Pharmingen™), CD38- APC (Clone HIT2 – Biolegend), HLA-DR – PECy7 (Clone L243)

3.15. ANÁLISES IN SILICO: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE ENZIMAS ALDHS DE *MTB* E ALDHS HUMANAS, E PREDIÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS

Com o objetivo de analisarmos a similaridade entre as ALDHs da bactéria e as ALDHs humanas, foi feito alinhamento global destas proteínas utilizando o software Clustal Omega (Clustalo) (MCWILLIAM et al., 2013). A predição de domínios conservados para a família ALDH (PF00171) foi feito com o Pfam (FINN et al., 2016). As sequências de proteínas foram obtidas através do banco de dados Uniprot e encontram-se dispostas na **tabela 1**.

Tabela 1 – Código de acesso das seqüências de proteínas ALDHs depositadas no UNIPROT que foram utilizadas para as análises

Gene	Código acesso Uniprot	Gene	Código acesso Uniprot
<i>ALDH4A1</i>	P30038	<i>ALDH5A1</i>	P51649
<i>ALDH16A1</i>	Q8IZ83	<i>ALDH6A1</i>	Q02252
<i>ALDH18A1</i>	ALDH18A1	<i>ALDH7A1</i>	P49419
<i>ALDH1A1</i>	P00352	<i>ALDH8A1</i>	Q9H2A2
<i>ALDH1A2</i>	O94788	<i>ALDH9A1</i>	P49189
<i>ALDH1A3</i>	P47895	<i>Rv0147</i>	P96824
<i>ALDH1B1</i>	P30837	<i>Rv0233c</i>	I6X8S7
<i>ALDH1L1</i>	O75891	<i>Rv0234c</i>	P9WNX9
<i>ALDH1L2</i>	Q3SY69	<i>Rv0458</i>	P9WNY1
<i>ALDH2</i>	P05091	<i>Rv0753c</i>	O53816
<i>ALDH3A1</i>	P30838	<i>Rv0768</i>	I6X9R9
<i>ALDH3A2</i>	P51648	<i>Rv1187</i>	O50443
<i>ALDH3B1</i>	P43353	<i>Rv1731</i>	P9WNX7
<i>ALDH3B2</i>	P48448	<i>Rv2858c</i>	O33340
		<i>Rv3292</i>	L7N650

Código de acesso às seqüências utilizadas no trabalho. Os genes nomeados como ALDH são as proteínas humanas. Os genes que inicial com *Rv* são das ALDHs de *Mycobacterium tuberculosis*.

Para comparar a similaridade de estrutura entre *ALDHs* de *M. tuberculosis* e *Homo sapiens*, utilizamos um programa de predição de estrutura terciária, Phyre², serviço *online*, que utiliza cristais disponíveis para fazer essa a predição (KELLEY et al., 2015).

3.16. CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA PARA A VIA DE BIOSÍNTESE DE CAROTENOIDES EM MICOBACTÉRIAS

Com o objetivo de verificarmos a presença de enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides em micobactérias tuberculosas, procuramos os seguintes genes Geranilgeranil pirofosfato sintase (*CrtE*), Fitoeno sintase (*CrtB*), Fitoeno desaturase (*CrtI*) e Licopeno ciclase (*CrtY*) no genoma de 25 micobactérias disponíveis no banco de dados Ensembl

Bactéria (<http://bacteria.ensembl.org/index.html>) (**Tabela 2**). A partir da ausência e presença, montamos uma matriz binária para os 4 genes e atribuímos à cada gene a presença como o número 1 e a ausência como o número 0. Com esta matriz, geramos uma árvore filogenética utilizando a linguagem R com o pacote pvclust (SUZUKI; SHIMODAIRA, 2006).

Tabela 2 – Código de acesso do genoma de micobactérias depositadas no Ensembl Bacteria que foram utilizadas para as análises

Espécie	Código	Espécie	Código
<i>M. colombiense</i>	ASM167275v1	<i>M. cosmeticum</i>	PRJEB5748_assembly_1
<i>M. tuberculosis</i>	ASM19595v2	<i>M. heckeshornense</i>	ASM107775v1
<i>M. africanum</i>	Myco_afri_MAL020148_V1	<i>M. kansasii</i>	ASM71537v1
<i>M. bovis</i>	ASM72974v1	<i>M. kyorinense</i>	ASM167277v1
<i>M. bovis BCG</i>	ASM70565v1	<i>M. leprae</i>	ASM2668v1
<i>M. canettii</i>	CIPT 140010059	<i>M. liflandii</i>	ASM2644v2
<i>M. caprae</i>	_MB2 115862	<i>M. nebraskense</i>	ASM97087v1
<i>M. microti</i>	ASM154481v1	<i>M. pseudoshottsii</i>	ASM151536v1
<i>M. mungi</i>	ASM165254v1	<i>M. scrofulaceum</i>	ASM167257v1
<i>M. orygis</i>	112400015 Morygis1.0	<i>M. shimoidei</i>	ASM172244v1
<i>M. marinum</i>	ASM1834v1	<i>M. simiae</i>	ASM158476v1
<i>M. asiaticum</i>	ASM167334v1	<i>M. abscessus</i>	ASM105039v1
<i>M. bohemicum</i>	DSM 44277	<i>M. avium</i>	MAA_4293_version_1
<i>M. gastri 'Wayne'</i>	MgastriV1	<i>M. chelonae</i>	ASM97180v1
<i>M. gordonae</i>	ASM141795v2	<i>M. chimaera</i>	ASM130733v1
<i>M. haemophilum</i>	SM102141v1	<i>M. chubuense</i>	ASM26690v1

Código de acesso aos genomas utilizados no trabalho. Ao lado de cada espécie está o código de acesso ao genoma utilizado.

3.17. PROCESSAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados obtidos nos experimentos foram processados utilizando o software GraphPad Prisma 6 e analisados utilizando Test T não pareado, ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias dependendo do desenho experimental. Significância estatística foi expressa da seguinte forma: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$. Barras representam média e erro representa o erro padrão da média.

4. RESULTADOS

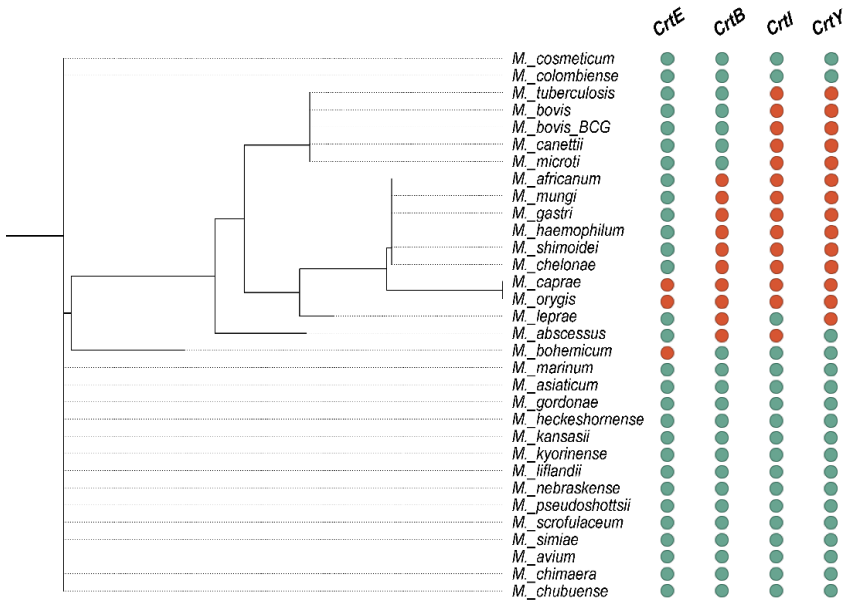
4.1. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE β -CAROTENO EM *Mycobacterium tuberculosis*

Considerando que o β -caroteno é uma molécula presente em micobactérias, e que o mesmo pode ser clivado e gerar precursores de ácido retinóico, investigamos se em *M. tuberculosis* há a presença de enzimas para a biossíntese de β -caroteno (SAVIOLA; FELTON, 2011; VIVEIROS, 2000).

Desta forma, verificamos a presença de enzimas Geranilgeranil pirofosfato sintase (*CrtE*), Fitoeno sintase (*CrtB*), Fitoeno desaturase (*CrtI*) e Licopeno ciclase (*CrtY*) no genoma de *M. tuberculosis* e outras micobactérias patogênicas e não patogênicas. A partir da presença e ausência dessas enzimas, construiu-se uma matriz binária atribuindo o número 1 para a presença e 0 para a ausência de cada gene e então gerou-se uma árvore filogenética utilizando o programa R.

Os dados obtidos na figura 9 demonstram que bactérias ambientais não tuberculosas apresentam no genoma todos as enzimas responsáveis para a síntese de β -caroteno. Entretanto, *M. tuberculosis* perdeu as enzimas responsáveis pela formação final do β -caroteno, como o *CrtI* e *CrtY*, assim como as bactérias tuberculosas do complexo *MTBC*.

Dessa forma, concluímos com este dado, que micobactérias tuberculosas perderam as enzimas para a síntese de β -caroteno e sugerimos que as mesmas possam recrutá-los de outras fontes durante o processo infeccioso, já que as mesmas apresentam enzimas para clivagem de β -caroteno e para a síntese de ácido retinóico.



04

Figura 9 –Relações entre micobactérias utilizando a presença e ausência de genes envolvidos na biossíntese de carotenoides em micobactérias. À esquerda a árvore de relações entre micobactérias baseado na matriz binária para a presença/ausência dos respectivos genes: *CrE*, *CrB*, *CrI*, *CrY* indicados nas colunas. O círculo verde representa a presença do gene e o círculo vermelho a ausência do gene.

4.2. ANÁLISES IN SILICO: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE ENZIMAS ALDHS DE *Mycobacterium tuberculosis* E ALDHS HUMANAS

Enzimas Aldeído desidrogenases (ALDHs) compreendem uma ampla família de proteínas que metabolizam vários substratos endógenos e exógenos. No entanto, em procariotos, há poucos estudos que investigam a estrutura e função dessas proteínas. Contudo, com o objetivo de analisarmos a similaridade entre as ALDHs da micobactéria e as humanas, submetemos as sequências de proteínas a alinhamento global utilizando o software Clustal Omega (ClustalO). E para identificar domínios conservados, submetemos as sequências ao banco de dados Pfam, que prediz a presença de domínios conservados.

Os dados obtidos por meio desses bancos de dados demonstram a presença de um domínio Aldedh (PF00171), característico de enzimas Aldeído desidrogenases, que está presente em todas as sequências ALDHs do *Mtb* utilizadas nesse trabalho (**Figura 10**).

Para analisarmos a similaridade entre as sequências de aminoácidos, as ALDHs do *Mtb* foram comparadas com as 19 ALDHs humanas usando o ClustalO. Observamos que os sítios catalíticos e de ligação ao co-fator (Cys, Glu, Gly e Asn) foram conservados para a maioria das enzimas, adicionando a isso, encontramos nas ALDHs do *Mtb* a presença de uma assinatura de sequência composta pelos aminoácidos LELGGK que estão presentes em enzimas pertencentes à superfamília de ALDHs. Entretanto, as enzimas humanas ALDH18A1 e ALDH16A1 e a proteína Rv3292 do *Mtb* não apresentaram conservação do sítio catalítico (**Figura 11**).

A partir da matriz de identidade podemos concluir que as proteínas do *Mtb* estão potencialmente associadas com as diferentes classes de ALDHs humanas, sugerindo que elas têm diversidade comparável às mesmas. Observamos também que as maiores porcentagens de similaridade entre as ALDHs do *Mtb* foram mais frequentes entre as classes de ALDHs humanas ALDH1L, ALDH2, ALDH8A1 e ALDH1A, e apenas a Rv1187 apresentou similaridade com a ALDH4A1 (**Tabela 3**).

Considerando que em *Mtb*, há apenas um cristal disponível de uma ALDH recombinante (Rv0233c) realizada por Kim e colaboradores (2009), nos perguntamos se havia similaridade estrutural entre as ALDHs do *Mtb* e as humanas. Para compararmos as estruturas proteicas, utilizamos o programa Phyre² que prediz a estrutura terciária a partir da

similaridade com cristais proteicos disponíveis em banco de dados. Observamos que todas elas apresentam estrutura semelhante entre si, exceto a proteína Rv3292 que apresentou estrutura diferente (**Figura 12**). O mesmo pôde ser corroborado com a matriz de identidade da **tabela 3**, pois a mesma apresentou menos de 17% de similaridade entre as ALDHs do *Mtb* e ALDHs humanas. E com interesse em verificar se ALDHs do *Mtb* se assemelham com as ALDHs humanas catalisadoras de ácido retinóico, sobreposimos as proteínas Rv0147, Rv0233c, Rv0458, Rv0768 e Rv2858c com ALDH1A1 humana. E observamos com essa sobreposição a semelhança estrutural compartilhada entre essas proteínas (**figura 13**).

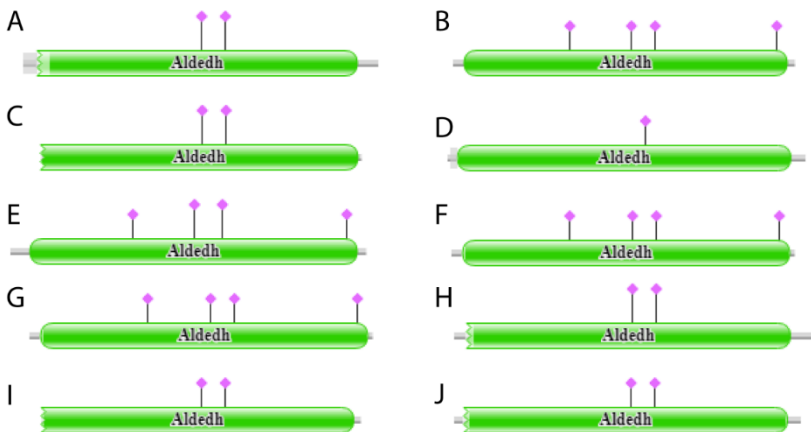


Figura 10 - Presença do domínio Aldedh (PF00171) em todas as Aldhs putativas do *Mtb*. Destaque em verde: Domínio Aldedh. Losango rosa: Sítio ativo predito. (A) Rv0147, (B) Rv0233c, (C) Rv0234c, (D) Rv0753c, (E) Rv0458, (F) Rv0768, (G) Rv1187, (H) Rv1731, (I) Rv2858c, (J) Rv3292.

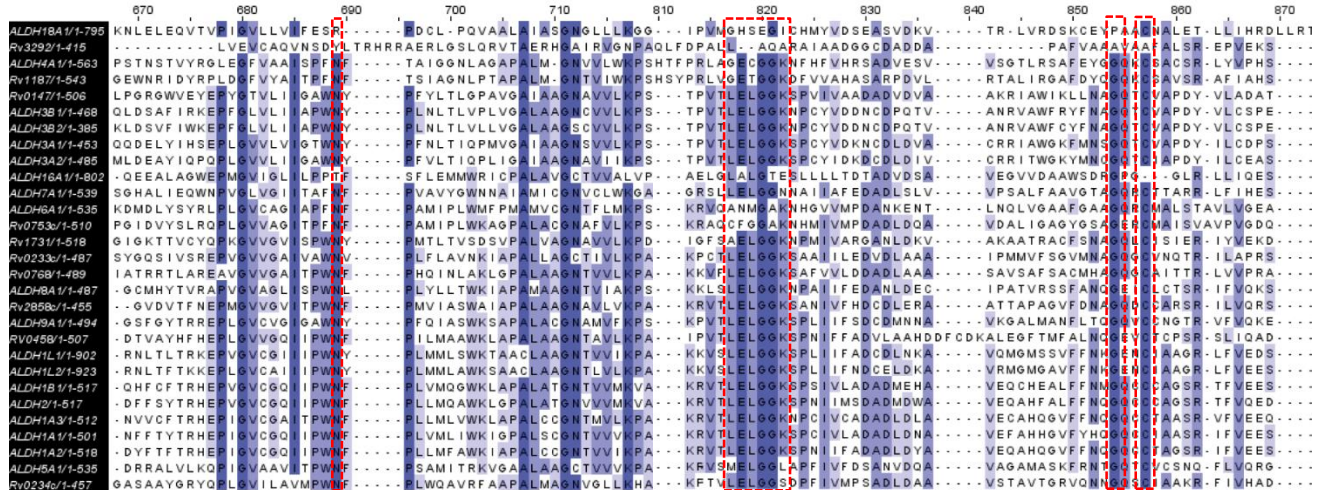


Figura 11 - Representação de uma parte do alinhamento de seqüências (Clustalo) de ALDHs de *Mycobacterium tuberculosis* e ALDHs humanas e seus respectivos sítios ativos. Destaque vermelho representa os resíduos catalíticos Asn, Glu, Gly e Cys. O destaque azul representa o nível de conservação entre as seqüências. A imagem do alinhamento foi obtida por meio do programa Jalview.

Tabela 3 - Matriz de identidade entre enzimas ALDHs de *Mtb* e ALDHs

	Rv3292	Rv1187	Rv0147	Rv0753c	Rv1731	Rv0233c	Rv0768	Rv2858c	RV0458	Rv0234c
ALDH18A1	11.89	16.36	17.78	16.82	15.94	17.81	14.73	19.15	17.76	16.58
Rv3292	100.00	15.48	16.87	16.77	14.97	17.09	16.77	15.87	14.60	14.06
ALDH4A1	14.58	45.37	17.54	23.60	23.35	23.27	22.90	24.78	22.49	22.79
Rv1187	15.48	100.00	19.79	23.92	24.22	21.97	24.32	23.62	23.35	23.67
Rv0147	16.87	19.79	100.00	22.22	28.51	26.92	26.23	28.38	26.23	24.89
ALDH3B1	11.89	19.18	42.76	21.23	25.11	27.97	25.35	24.18	24.42	22.12
ALDH3B2	12.83	20.73	41.85	22.91	28.11	30.75	28.00	26.30	24.79	22.61
ALDH3A1	16.16	20.32	42.41	22.60	26.58	28.21	24.42	27.93	25.81	23.29
ALDH3A2	13.72	19.54	40.67	19.08	25.06	27.23	22.95	25.53	23.65	22.75
ALDH16A1	15.16	20.54	19.16	24.74	24.09	26.08	26.30	27.63	26.99	21.92
ALDH7A1	16.82	20.36	20.80	24.17	23.71	26.83	27.52	27.81	24.54	26.93
ALDH6A1	13.68	21.27	19.87	43.66	23.42	26.51	25.16	25.94	24.74	27.88
Rv0753c	16.77	23.92	22.22	100.00	27.07	30.40	27.16	32.23	28.07	29.74
Rv1731	14.97	24.22	28.51	27.07	100.00	31.93	30.32	32.67	28.36	31.04
Rv02133c	17.09	21.97	26.92	30.40	31.93	100.00	40.08	36.44	34.86	32.44
Rv0768	16.77	24.32	26.23	27.16	30.32	40.08	100.00	37.05	32.14	31.50
ALDH8A1	17.09	25.21	23.01	30.54	32.42	35.16	31.24	33.92	36.25	31.06
Rv2858c	15.87	23.62	28.38	32.23	32.67	36.44	37.05	100.00	35.25	32.29
ALDH9A1	14.02	20.75	28.24	29.13	29.11	33.06	30.61	37.22	36.07	33.11
RV0458	14.60	23.35	26.23	28.07	28.36	34.86	32.14	35.25	100.00	31.11
ALDH1L1	15.67	22.45	24.15	30.66	29.92	35.01	31.19	37.25	35.67	32.24
ALDH1L2	15.36	21.41	24.36	31.50	29.92	34.80	29.52	34.37	37.94	32.46
ALDH1B1	17.08	23.86	26.38	32.43	30.15	36.10	36.33	38.90	41.43	33.48
ALDH2	17.70	22.61	27.66	32.85	30.77	37.97	35.49	38.24	43.27	34.36
ALDH1A3	16.46	25.52	26.17	31.59	30.77	36.93	34.45	40.00	40.20	33.70
ALDH1A1	16.46	24.07	28.30	32.22	31.19	36.93	34.45	37.80	40.41	32.38
ALDH1A2	17.70	25.10	25.53	32.43	30.77	37.34	33.82	38.46	41.22	35.24
ALDH5A1	13.48	22.70	25.65	28.18	32.29	32.14	33.68	34.51	30.31	34.95
Rv0234c	14.06	23.67	24.89	29.74	31.04	32.44	31.50	32.29	31.11	100.00

A matriz de identidade representa em % a similaridade entre proteínas. As colunas representam as enzimas ALDHs do *Mtb* e as linhas representam todas as ALDHs com as quais foram comparadas. Os destaques em amarelo representam a similaridade $\geq 30\%$.

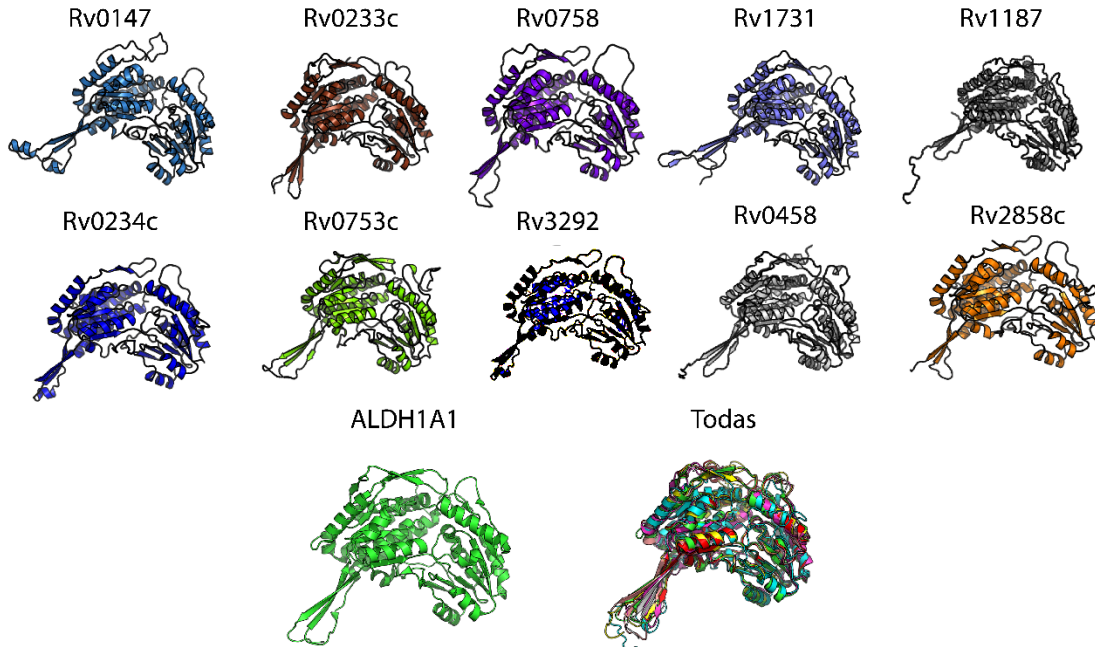


Figura 12 - Estrutura terciária de enzimas ALDHs de *Mycobacterium tuberculosis*. As figuras ilustram a estrutura terciária de enzimas ALDHs de *Mtb*. A enzima ALDH1A1 representa uma ALDH humana. E a imagem titulada “Todas” representa cinco enzimas do *Mtb* (Rv0147, Rv0233c, Rv0458, Rv0768 e Rv2858c) sobrepostas com ALDH1A1 humana.

4.3. *Mycobacterium tuberculosis* INDUZ A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA RARE CD38 EM CÉLULAS TRONCO/PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS (CD34⁺) DO SANGUE PERIFÉRICO

Ao longo da sua co-evolução com humanos, o *Mtb* desenvolveu estratégias que o tornaram um patógeno de sucesso, dentre elas, a capacidade de infectar múltiplos tipos celulares. Nesse contexto, já foi demonstrado que o *Mtb* infecta células tronco mesenquimais e hematopoiéticas (DAS et al., 2013; REECE et al., 2018; TORNACK et al., 2017). Recentemente, Delgobo e colaboradores (2019) demonstraram que o *Mtb* infecta células tronco progenitoras/hematopoiéticas HSPCs humanas (CD34⁺) *in vitro*, e foi observado que, durante a infecção ocorre o aumento da expressão de marcadores mielóides. Dentre estes, uma molécula induzida por ácido retinóico (*RARE*), o CD38 (MARLEIN et al., 2018; MEHTA; CHEEMA, 1998; SHUBINSKY; SCHLESINGER, 1997), marcador de diferenciação celular, foi um dos marcadores mais expressos durante a infecção por *Mtb* nesse sistema.

A fim de investigar se o *Mtb* induz a expressão de genes *RARE* (usando CD38 como representante) em células CD34⁺, PBMC de doadores saudáveis foram expostas ao bacilo por 72h. Após este tempo, as células foram coletadas, lavadas com PBS e marcadas com anticorpos anti-CD34 e CD38.

Por citometria de fluxo foi observado em células CD34⁺ que, a exposição destas células ao *Mtb* promove o aumento da expressão da molécula CD38, conforme ilustrado nas figuras **13 B**, **C** e **D**. Para avaliar se o aumento da expressão da molécula CD38 depende da bactéria viável ou do reconhecimento de PAMPs, o PBMC foi exposto às bactérias inativadas pelo calor (*Heat-killed* – *HK*) e ao seu DNA genômico, respectivamente. Nestes experimentos, observou-se que a expressão do CD38 parece ser parcialmente dependente da bactéria viva, tendo em vista que o bacilo inativado por calor ou seu DNA genômico não tiveram eficiência semelhantes ao *Mtb* viável para aumentar a expressão do CD38 (**figura 13 D**). Estes dados em conjunto sugerem que a infecção por *Mtb* e parcialmente seus PAMPs promovem o aumento da expressão de genes induzidos por ácido retinóico, como o CD38 em células CD34⁺.

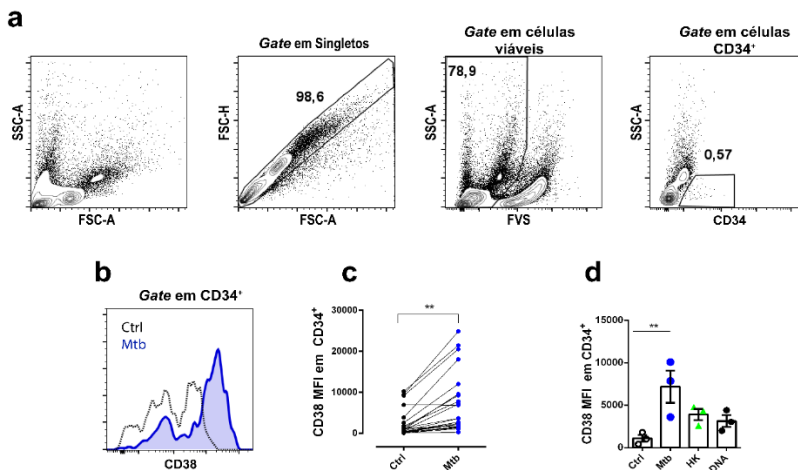


Figura 13 - *Mycobacterium tuberculosis* induz o aumento da expressão de CD38 em células CD34⁺ humanas. (A) *Countour plots* representativos demonstram a estratégia utilizada para analisar a expressão da molécula CD38 em HSPCs CD34⁺ após a exclusão de dupletos e células não viáveis (FVS⁺). (B) Histograma representativo de um doador mostra a expressão de CD38 em células CD34⁺ expostas ao *Mtb* e controle, no tempo de 72h. Linha tracejada: Controle não infectado; Linha azul: células expostas ao *Mtb* MOI 3. (C) Gráfico de barras mostra a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) para CD38 na população de células CD34⁺. (D) Gráficos de barra mostra a MFI de células expostas a *Mtb* HK e ao seu DNA genômico (MOI 3) 72h. Cada símbolo representa um doador de PBMC. Barras representam média e o erro representam EPM. Em C Dados somados de 5 experimentos independentes n:31; em D dados de 1 experimento, n: 3. Estatística: Teste T não pareado. ** $p \leq 0,005$ em relação ao controle não infectado no respectivo tempo.

4.4. O TRATAMENTO COM INTERFERONS EXÓGENOS NÃO INDUZ A EXPRESSÃO DO CD38 EM CÉLULAS CD34⁺

Já foi reportado que na região promotora do gene CD38 encontram-se elementos de resposta sensível a interferons (ISRE – *Interferon-sensitive response element*) (DRACH, JOHANNES; SHORONG ZHAO, 1993; SHUBINSKY; SCHLESINGER, 1997; SUN et al., 2006). Diante disso, avaliamos se citocinas exógenas como IFNs tipo I e II estariam envolvidos na indução do CD38. Para isso, PBMCs de doadores saudáveis foram estimulados com diferentes concentrações de IFN- α (50 e 500 U/ml), IFN- β (50 e 500 U/ml) e IFN- γ (50 e 500 U/ml)

por 72h. Após este tempo, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD34, para identificação de HSPCs, além de anti-CD38 e adquiridas no citômetro de fluxo (**Figura 14**).

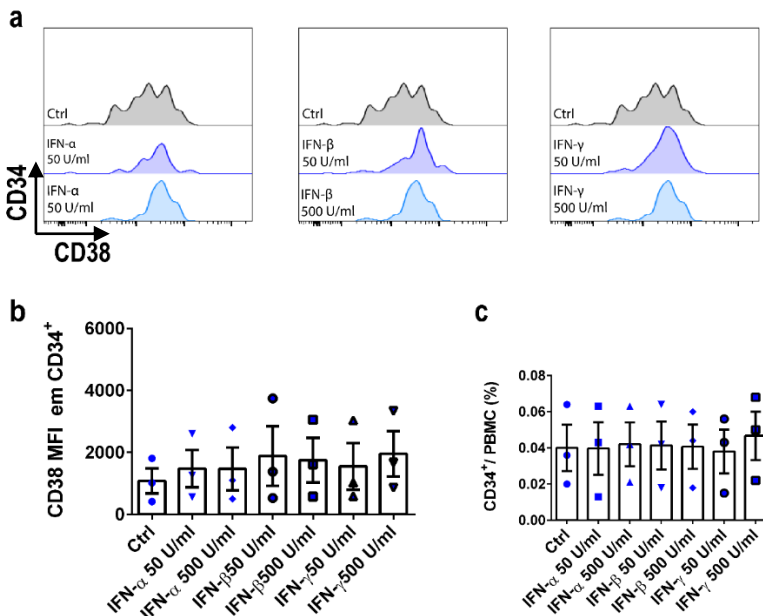


Figura 14 - O estímulo com interferons exógenos não interfere na indução do CD38 in vitro. (A) Histograma representativo de um doador mostra a expressão do CD38 em células CD34⁺ estimuladas com IFN- α , β e γ nas concentrações de 50 e 500 U/ml respectivamente por 72h (B) Gráfico de barras mostra a MFI do CD38 em cada estímulo (C) Gráfico de barras mostra a frequência de células CD34⁺ dos doadores durante os tratamentos. Cada símbolo representa doadores independentes. Barras representam a média e o erro representam EPM. Dados de 1 experimento, n:3.

Os histogramas e gráficos representados na **figura 14 A e B** demonstram que o estímulo com citocinas exógenas em diferentes concentrações não resulta no aumento da expressão do CD38 em 72h. De forma semelhante, a frequência de células CD34⁺ não foi alterada pelos tratamentos (**Figura 14 C**). Portanto, os dados apresentados sugerem que o tratamento com interferons exógenos não induz a expressão do CD38 em células CD34⁺.

4.5. AS ENZIMAS ALDEÍDO DESIDROGENASES (ALDHs) DO *Mycobacterium tuberculosis* CONTRIBUEM PARA A INDUÇÃO DE MOLÉCULAS RARES EM CÉLULAS CD34⁺ DO PBMC HUMANO DURANTE A INFECÇÃO

Para compreender como as ALDH do *Mtb* estão envolvidas na indução de genes RAREs da célula hospedeira, utilizamos um inibidor de enzimas ALDHs (DEAB) (LUO et al., 2015) na bactéria. Para isso, as bactérias foram previamente tratadas com concentrações de 10 e 100 μM do DEAB por 3h. Após este tempo, as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS para remoção do composto DEAB em excesso. Em seguida, PBMCs dos doadores foram expostos ao *Mtb* pré-tratadas com DEAB (MOI 3) por 72h. Após esse tempo, as células foram lavadas e marcadas com corante de viabilidade celular, FVS - V450, anticorpos anti-CD34 e anti-CD38. Para verificar se o tratamento da bactéria com o DEAB altera a sua viabilidade durante a infecção, fizemos a quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) nos tempos de 4, 24 e 72h.

Foi observado que o *Mtb* induz a expressão do RARE CD38, enquanto que as células expostas às bactérias previamente tratadas com o DEAB apresentaram redução na expressão da molécula CD38 (**Figura 15 B, C e D**). Os dados de expressão relativa demonstram que o *Mtb* aumenta em 3 vezes a expressão do CD38 quando comparado ao controle não infectado, e esta indução é reduzida pela metade quando comparado às bactérias tratadas com o DEAB. Estes dados foram normalizados pela MFI do grupo controle não infectado (**figura 15 D**).

Os dados obtidos neste experimento sugerem que as ALDHs do *Mtb* estão envolvidas na indução da expressão de moléculas reguladas por ácido retinóico, como o CD38, em células CD34⁺. Além disso, observou-se que não houve alteração significativa na frequência de células CD34⁺ durante infecção por bactérias com diferentes tratamentos (**figura 15 E**). Somando a isto, as bactérias tratadas com o DEAB permaneceram viáveis durante a infecção, quando comparadas a bactérias não tratadas (**figura 15 F**). Os dados presentes no anexo (**Figuras 19 e 20**) demonstram que o DEAB inibe efetivamente a atividade de ALDHs do *Mtb in vitro* e que o tratamento com o inibidor não altera a viabilidade da bactéria durante crescimento em meio de cultivo.

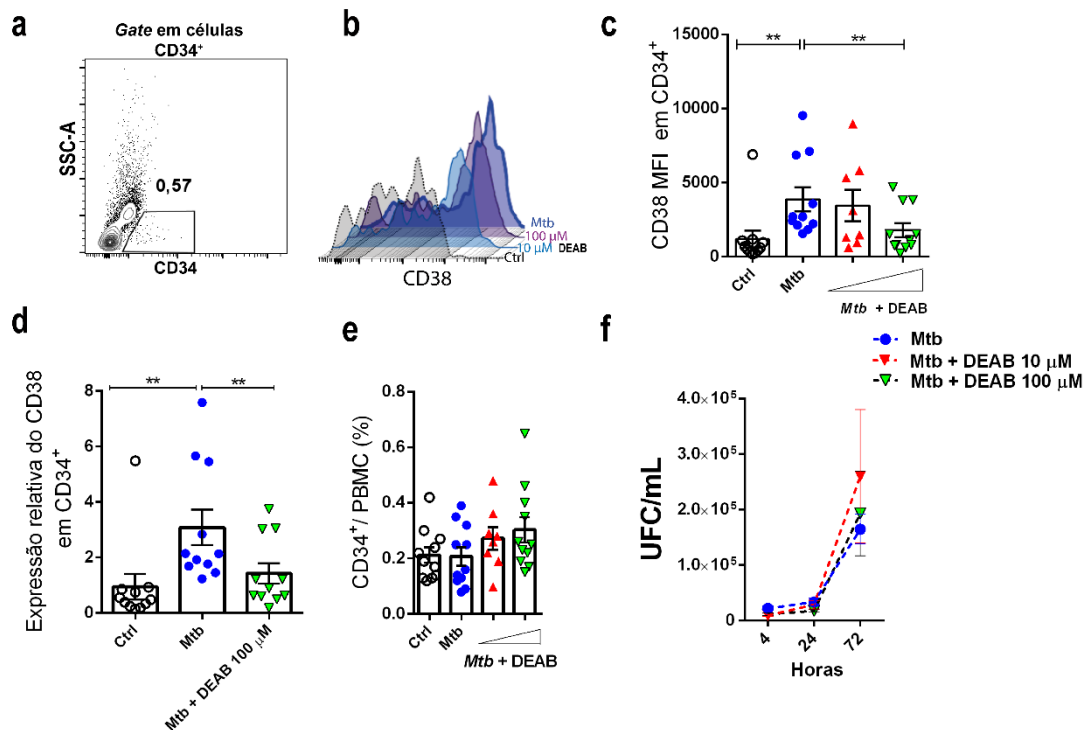


Figura 15 - O Tratamento do *Mtb* com DEAB previne a indução de CD38 em células CD34⁺ pós infecção. (A) Histograma representativo mostra a estratégia de *gating* para analisar os eventos dentro da população de células CD34⁺ (B) Histograma

representativo de um doador mostra a mediana de intensidade de fluorescência do CD38 na população de células CD34⁺ pós 72h. Linha tracejada preta: controle não infectado; Linha azul escuro: células expostas apenas ao *Mtb* (MOI 3); Linha azul claro: células expostas ao *Mtb* previamente tratado com 10 µM DEAB; Linha lilás: células expostas ao *Mtb* previamente tratado com 100 µM DEAB. (C) Gráfico em barras mostra o MFI da molécula CD38 em células CD34⁺ pós 72h. Círculo aberto: representa o controle de células não infectadas; Círculo azul fechado: células expostas ao *Mtb*; Triângulo vermelho fechado: Células expostas ao *Mtb* previamente tratado com 10 µM DEAB; Triângulo verde: Células expostas ao *Mtb* previamente tratado com 100 µM DEAB. (D) Gráfico em barra demonstra a expressão relativa do CD38 em células CD34⁺ pós 72h. Estes dados foram normalizados pelo MFI do grupo controle não infectado. Círculo aberto: controle não infectado; Círculo azul fechado: Células expostas ao *Mtb* (MOI3); Triângulo verde: células expostas ao *Mtb* previamente tratados com 100 µM DEAB. (E) Gráfico de barras ilustra a frequência de células CD34⁺ no PBMC. Círculo aberto: representa o controle de células não infectadas; Círculo azul fechado: células expostas ao *Mtb*; Triângulo vermelho fechado: Células expostas ao *Mtb* previamente tratado com 10 µM DEAB; Triângulo verde: Células expostas ao *Mtb* previamente tratado com 100 µM DEAB. (F) Enumeração de UFCs de *Mtb*: Círculo azul fechado: representa a contagem de UFC do *Mtb* durante a infecção em células não tratadas com DEAB; Triângulo vermelho fechado: contagem de UFC de *Mtb* tratado com 10 µM DEAB durante a infecção no PBMC; Triângulo verde fechado: contagem de UFC de *Mtb* tratado com 100 µM DEAB durante a infecção no PBMC. Cada ponto representa um único doador. Dados de UFC de dois experimentos independentes, n:8. Dados experimentos independentes, n: 11 e apenas um grupo com n:8 conforme os pontos apresentados nos gráficos. Estatística: Anova de uma via seguido de pós teste de Dunn's ** $p \leq 0,001$.

4.6. *Mycobacterium tuberculosis* INDUZ A EXPRESSÃO RARES QUANDO AS ALDHS DA CÉLULA HOSPEDEIRA ESTÃO INIBIDAS

Considerando que a produção de ácido retinóico em células humanas depende da atividade de enzimas ALDHs, hipotetizamos que, ao inibirmos as ALDHs da célula hospedeira com o DEAB, as ALDHs do *Mtb* seriam capazes de interagir com o metabolismo de ácido retinóico do hospedeiro para induzir a expressão de genes RARES. Para isso, pré-tratamos o PBMC com 100 μ M de DEAB 2h antes da infecção e expomos ao *Mtb* (MOI 3) por 72h.

Na **figura 16 A** observamos que o *Mtb* induz a expressão da molécula CD38 em células não tratadas. Os dados também mostram que o grupo de células que recebeu o tratamento prévio com o DEAB e depois exposto ao *Mtb* apresentou aumento da expressão do CD38 quando comparado com o grupo de células tratadas apenas com o DEAB, sugerindo uma possível participação de enzimas ALDHs micobacterianas nessa indução. Além disso, o grupo de células que foram tratadas com o DEAB e infectadas com o *Mtb* tratados com DEAB exibiram redução da expressão do RARE CD38, sugerindo a participação de ambas ALDHs, do *Mtb* e da célula hospedeira, nesta indução.

Os dados ilustrados na **figura 16 B** demonstram que não há diferenças no crescimento da bactéria durante a infecção nas células que foram previamente expostas ao DEAB. Porém, na **figura 16 C** observamos redução no crescimento da bactéria no grupo que teve ambas ALDHs inibidas, sugerindo um papel dependente de ALDHs *Mtb*/hospedeiro durante a infecção. A **figura 16 D** mostra que mesmo quando as ALDHs da bactéria estão inibidas, não há redução no crescimento da bactéria durante a infecção, sugerindo a importância de ALDHs do hospedeiro durante a infecção. E as **figuras 16 E e F** mostram que em ambos os tratamentos, não há redução da frequência de células CD34⁺ durante os tratamentos e que as células permaneceram viáveis durante a infecção.

Como conclusão, os dados obtidos por meio desse experimento sugerem que as ALDHs do *Mtb* estão envolvidas na indução do CD38, e que a inibição de ALDH da célula não altera o crescimento da bactéria. No entanto, o crescimento do bacilo é dependente de ALDHs da bactéria e da célula hospedeira.

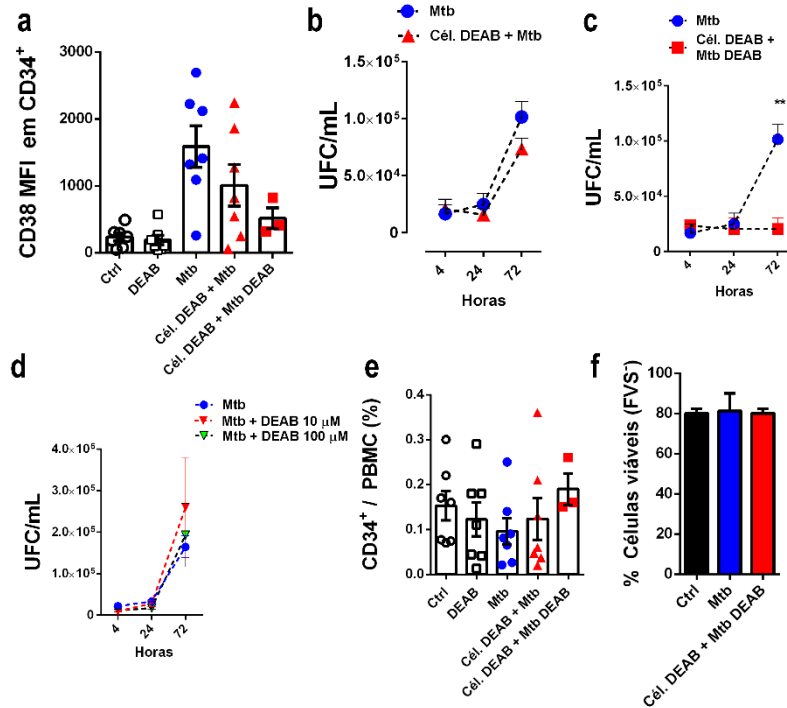


Figura 16 - As enzimas ALDHs do *Mycobacterium tuberculosis* induzem a expressão do CD38 quando as ALDHs da célula hospedeira estão inibidas. (A) Gráfico em barras mostra a MFI do CD38 em células CD34⁺ pós 72h. Círculo aberto: controle

células não infectadas e não tratadas com DEAB; Quadrado aberto: células não infectadas e tratadas com 100 μ M DEAB; Círculo azul fechado: Células não tratadas com DEAB e expostas ao *Mtb* MOI 3; Triângulo Vermelho: células tratadas com 100 μ M DEAB e expostas ao *Mtb* MOI 3; Quadrado vermelho fechado: células tratadas com 100 μ M DEAB e expostas ao *Mtb* tratado com 100 μ M DEAB MOI 3. **(B)** Gráfico de linhas com a enumeração de UFCs de *Mtb*: Círculo fechado azul: representa a contagem de UFC do *Mtb* durante a infecção em células não tratadas com DEAB; Triângulo vermelho fechado: UFC em células tratadas com DEAB e infectadas com o *Mtb*. **(C)** Enumeração de UFCs de *Mtb*: Círculo fechado azul: representa a contagem de UFC do *Mtb* durante a infecção em células não tratadas com DEAB; Quadrado vermelho fechado: UFC em células tratadas com DEAB e infectadas com o *Mtb* tratadas com DEAB nos tempos de 4h a 72h. **(D)** Enumeração de UFCs de *Mtb*: círculo azul fechado: Células não tratadas com DEAB e expostas ao *Mtb* não tratado; Triângulo vermelho fechado: Células não tratadas e expostas ao *Mtb* tratado com 10 de μ M DEAB; Triângulo vermelho fechado: Células expostas ao *Mtb* tratado com 100 μ M de DEAB. **(E)** Gráfico representa a frequência de células CD34⁺ no PBMC de doadores saudáveis. Círculo aberto: controle células não infectadas e não tratadas com DEAB; Quadrado aberto: células não infectadas e tratadas com 100 μ M DEAB; Círculo azul fechado: Células não tratadas com DEAB e expostas ao *Mtb* MOI 3; Triângulo Vermelho: células tratadas com 100 μ M DEAB e expostas ao *Mtb* MOI 3; Quadrado vermelho invertido: células tratadas com 100 μ M DEAB e expostas ao *Mtb* tratado com 100 μ M DEAB MOI 3. **(F)** Gráfico em barras representa a Porcentagem de células viáveis FVS negativas: Barras pretas: controle não tratado com DEAB e não infectado; Barra azul: Células não tratadas cm DEAB e expostas ao *Mtb* MOI 3; Barra vermelha: Células tratadas com 100 μ M DEAB e duas horas após expostas ao *Mtb* tratado com 100 μ M DEAB. Resultado de 2 experimento. n:7. Apenas o grupo o grupo cél. DEAB + Tb DEAB foi resultado de 1 experimento com n:3. Estatística: Anova de uma via seguido de pós-teste de Dunn's. *** p \leq 0,0005 em relação ao grupo controle não estimulado.

4.7. A VIA DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE ÁCIDO RETINÓICO (RAR) É NECESSÁRIA PARA INDUÇÃO DO CD38 DURANTE A INFECÇÃO EM CÉLULAS CD34⁺ HUMANAS

Buscando compreender o mecanismo pelo qual o CD38 é induzido durante a infecção, Kishimoto e colaboradores (1998) identificaram a presença de um elemento de resposta ao ácido retinóico (RAREs – *Retinoic acid response elemento*) no primeiro íntron do gene CD38 (KISHIMOTO et al., 1998). Somando a isto, outros trabalhos demonstram que o ácido retinóico induz a expressão de CD38 *in vitro* em células HL-60 (DRACH, JOHANNES; SHORONG ZHAO, 1993; DRACH et al., 1994). Portanto, hipotetizamos que durante a infecção, a expressão do CD38 depende da sinalização do ácido retinóico. Para isso, PBMCs de doadores saudáveis foram previamente tratados com 3 µM do inibidor pan-agonista inverso do receptor de ácido retinóico (RAR), o BMS 493, 2 horas antes da infecção e, após esse tempo, as células foram expostas ao *Mtb* (MOI 3) por 72h.

Os resultados obtidos por este experimento demonstram que há uma expressão basal da molécula CD38 em células CD34⁺ no grupo controle não infectado, e essa parece ser reduzida durante o tratamento com o inibidor (**Figura 17 B e C**). Semelhantemente, o grupo tratado com o inibidor BMS 493 e duas horas depois exposto ao *Mtb* apresentou redução na expressão do CD38 quando comparado ao grupo não tratado e exposto ao *Mtb* (**Figura 17 C**). Somando a isso, não houve alterações significativas na frequência de células CD34⁺ (**figura 17 D**).

Adicionalmente, investigamos se a inibição do RAR altera a proliferação da bactéria durante a infecção. Para isso, fizemos contagem de células bacterianas viáveis nos tempos de 4, 24 e 72h pós infecção. Os dados obtidos mostram que não há alteração na proliferação da bactéria no grupo de células que foram tratadas com o BMS 493, sugerindo que as bactérias estiveram viáveis durante a infecção (**figura 17 E**). Considerando que há a presença de retinóides no soro autólogo, os dados presentes na **figura 18** (anexo) demonstram que diferentes concentrações de soro autólogo são capazes de induzir a expressão da molécula CD38.

Com estes dados concluímos que, durante a infecção, a indução da molécula CD38 em células CD34⁺ se dá por meio da via do ácido retinóico, via receptor RAR. No entanto essa via não é necessária para a proliferação intracelular da bactéria durante a infecção.

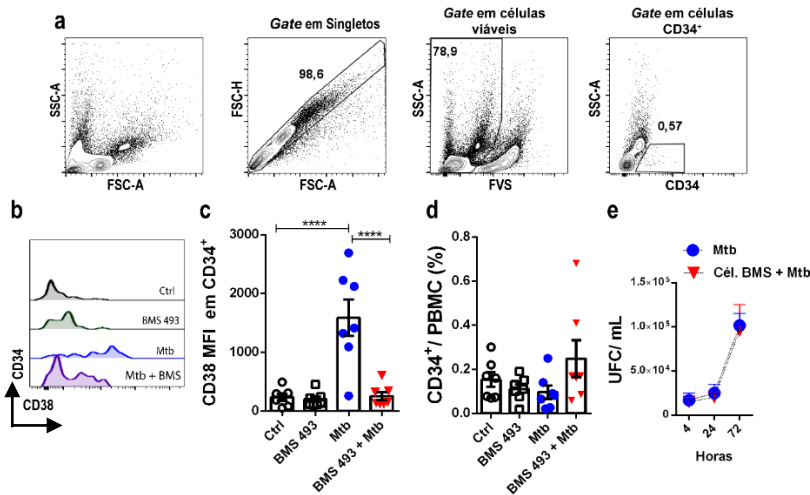


Figura 17 - A via de sinalização do receptor de ácido retinóico (RAR) é necessária para a indução do CD38 durante a infecção por *Mtb* em células CD34⁺. (A) *Countour plots* representativos demonstram a estratégia utilizada para analisar a expressão da molécula CD38 na população de células CD34⁺ após a exclusão de dupletos e células não viáveis (FVS⁺) e Histograma representativos de um doador ilustra a expressão de CD38 nos grupos: controle (preto), 3 μ M BMS 493 (verde), *Mtb* MOI 3 (azul), 3 μ M BMS 493 e *Mtb* MOI 3 (lilás). (B) Histograma representativo de um doador mostra a expressão do CD38 em células CD34⁺ nos diferentes grupos indicados na imagem. (C) Gráfico em barras ilustra a MFI do CD38 após 72h. Círculo aberto: Controle não infectado; Quadrado aberto: Controle não infectado tratado com 3 μ M do BMS 493; Círculo azul: Infectado por *Mtb* MOI 3; Triângulo vermelho invertido: Células previamente tratadas com 3 μ M BMS 493 e após 2h infectadas com *Mtb* MOI 3. (D) Gráfico de barras ilustra a frequência de células CD34⁺ no PBMC. Círculo aberto: Controle não infectado; Quadrado aberto: Controle não infectado tratado com 3 μ M do BMS 493; Círculo azul: Infectado por *Mtb* MOI 3; Triângulo vermelho invertido: Células previamente tratadas com 3 μ M BMS 493 e após 2h infectadas com *Mtb* MOI 3. (E) Enumeração de UFC/ml; Círculo azul fechado: Células expostas ao *Mtb*; Triângulo vermelho fechado: Células tratadas com o 3 μ M BMS 493 e expostas ao *Mtb*, resultado representativo de 4 doadores. Barras representam a média e o erro representam o EPM. Dados de um experimento, n: 4. Estatística: Anova de uma via seguido de pós teste de Bonferroni, **** p \leq 0,0001

5. DISCUSSÃO

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são conhecidas por produzirem carotenoides que estão presentes como um pigmento alaranjado nas colônias do *M. aurum*, *M. philei*, *M. avium* e *M. intracellulare* (LEVY-FREBAULT; DAVID, 1979; TÁRNOK; TÁRNOK, 1970) e outras como *M. kansasii* e *M. marinum* são conhecidas por acumularem o β -caroteno (LEVY-FREBAULT; DAVID, 1979). Entretanto, os genes necessários para a síntese de carotenoides em *M. tuberculosis* foram perdidos ao longo da sua evolução, a qual foi acompanhada por uma redução no tamanho do genoma (STINEAR et al., 2008). Neste estudo, encontramos no genoma do *Mtb* ORFs (*Rv0654* e *Rv0913c*) que codificam para enzimas putativa MtCCO, uma oxigenase de clivagem carotenóide, sugerindo que essa seja capaz de converter esses pigmentos. Tais achados corroboram com dados da literatura e sugerem que durante o processo infeccioso, *Mtb* recrute essas moléculas presentes nos hospedeiro (LIANG; ZHU; JIANG, 2017; SCHERZINGER et al., 2010).

Em *M. tuberculosis*, apenas o gene *Rv0654* foi investigado, e *in vitro*, a enzima codificada por este gene foi capaz de clivar o β -caroteno em β -apo-10'carotenal (SCHERZINGER et al., 2010). Nesse sentido, é conhecido que o *Mtb* não possui a capacidade de produzir pigmentos carotenoides, devido à perda de alguns genes como o *crtI* e *crtY* durante a sua evolução. Entretanto, o mesmo apresenta as enzimas MtCCO e as enzimas necessárias para a oxidação de retinóides, como álcool desidrogenases (ADH) e Aldeído desidrogenases (ALDHs).

Mtb também apresenta as enzimas posteriores à clivagem de β -caroteno, como as enzimas ALDHs. Os dados apresentados nesse trabalho mostram que as ALDHs do *Mtb* possuem um domínio Aldehdh, característicos de enzimas pertencentes à família de Aldeído desidrogenases, que estão potencialmente associadas com as diferentes classes de ALDHs humanas, sugerindo a diversidade das mesmas. Relatamos que as maiores porcentagens de similaridade entre as ALDHs da bactéria e de humanos estão mais frequentes entre as classes de ALDHs: ALDH1L, ALDH2, ALDH8A1 e ALDH1A, e apenas a *Rv1187* apresentou similaridade com a ALDH4A1 (PEMBERTON et al., 2014).

Sobre essas diferentes classes, é descrito que em humanos a ALDH1L é uma 10-Formiltetrahidrofolato desidrogenase, proteína citosólica reguladora do metabolismo de folato (KRUPENKO; KRUPENKO, 2018). Já a ALDH2 é mitocondrial e está envolvida na via

de degradação do etanol (EDENBERG; MCCLINTICK, 2018), enquanto que as enzimas ALDH da família A1 e ALDH8A1 são citosólicas e tem preferência pelo substrato all-*trans*-retinal e 9-*cis*-retinal oxidando esse a all-*trans*-ácido retinóico e 9-*cis*-ácido retinóico. (KOPPAKA et al., 2012b; LIN; NAPOLI, 2000; PUTTINI et al., 2018; TOMITA et al., 2016; ZHAO et al., 1996). Adicionando a isso, Kim e colaboradores (2009) caracterizaram uma ALDH recombinante do *Mtb* (Rv0233c) por cristalografia e demonstraram que essa proteína é um monômero e forma interações fortes e específicas com NAD e NADH. Além disso, quando a mesma foi comparada estruturalmente com uma ALDH2 humana, observou-se uma rmsd¹ de 1.5 Å sobre 184 resíduos em comum. No entanto, pequenas regiões de congruência foram encontradas, e estas foram em regiões periféricas da proteína (KIM et al., 2009). Por meio do alinhamento de sequências, observamos que os sítios catalíticos e de ligação ao co-fator (Cys, Glu, Gly e Asn) foram conservados para a maioria das enzimas. As regiões da proteína que melhor se alinharam foram mais centrais enquanto que as extremidades foram bastantes variadas, demonstrando que o core central da proteína é conservado entre estas duas espécies distantes na escala evolutiva.

No entanto, poucos estudos investigam a função de enzimas ALDHs na biologia bacteriana. Estudos recentes demonstraram em ALDHs de *Staphylococcus aureus* são requeridas sob condições de estresse (IMBER et al., 2018), e em *Pseudomonas cichorii* estas enzimas são um fator de virulência (TANAKA et al., 2012). *E. coli* exposta a estresse oxidativo, via tratamento com H₂O₂, exibiu níveis elevados de metabólitos aldeídos conhecidos, mais especificamente glicolato, 4-aminobutirato e ácido succínico. Esses compostos foram gerados pelas ALDHs bacterianas AldA, ydcW e ynel (JOZEF CZUK et al., 2010). Em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acidithiobacillus ferrooxidans*, quando expostas agentes indutores de estresse oxidativo como arsenito (As³⁺) e Bornito (Cu₅FeS⁴), respectivamente, aumentam a expressão de enzimas ALDHs, sugerindo que ALDHs bacterianas são importantes sob condições de estresse oxidativo (FERRAZ et al., 2011; PARVATIYAR et al., 2005).

Enzimas ALDHs bacterianas são capazes de converter uma ampla gama de substratos como acetaldeído, benzaldeído, salicialdeído, 3-

¹ O RMSd, do inglês “*Root Mean Square deviation*”, é o valor médio para o desvio médio dos átomos de uma estrutura X, relativamente a uma segunda estrutura Y. Quanto maior este valor, maior é a diferença estrutural entre as proteínas ou estruturas que estão a ser alvo de comparação.

hidroxipropionaldeído, formaldeído, metilglioxal, aldeído glicol e retinal (COITINHO et al., 2016; HONG et al., 2016; IMBER et al., 2018; JAUREGUIBEITIA et al., 2007; LEE et al., 2012; LUO et al., 2013) demonstrando pouca especificidade em relação aos substratos. A respeito disso, foi demonstrado que uma ALDH de *Bacillus cereus* realiza *in vitro* a oxidação de retinal para atRA (HONG et al., 2016).

Os resultados obtidos nesse trabalho também mostram que as enzimas ALDHs do *Mtb* são inibidas pelo DEAB, e que essa inibição não afeta o crescimento bacteriano, sugerindo que tais enzimas não são essenciais ao crescimento em meio de cultura. De forma semelhante, foi observado que bactérias como *S. aureus* e *P. cichorii* com deleção no gene *Alda* (gene que codifica uma Aldeído desidrogenase) não apresentam alterações no crescimento quando cultivadas *in vitro* (IMBER et al., 2018; TANAKA et al., 2012). No entanto, ainda não foi investigado se bactérias patogênicas exploram enzimas ALDHs para eventos infecciosos no hospedeiro.

Com a hipótese de que as enzimas ALDHs do *Mtb* participam do metabolismo de vitamina A do hospedeiro através da conversão do retinal para atRA e induzir diretamente a expressão de genes RAREs na célula hospedeira, avaliamos a expressão de uma molécula sabidamente induzida por atRA, o CD38, durante a infecção pelo *Mtb* (KISHIMOTO et al., 1998). Os dados apresentados neste trabalho demonstram que, quando as células CD34⁺ de PBMCs são expostas ao *Mtb* ocorre aumento na expressão da molécula RARE CD38. No entanto, as células que foram expostas ao *Mtb* inativados pelo calor apresentaram um pequeno aumento na expressão da molécula CD38, sugerindo que quando viável, a bactéria é capaz de induzir maior expressão e isso pode ser explicado pela presença de outros elementos de resposta presentes na região promotora do gene CD38, como o elemento de resposta sensível a interferons (*ISRE*) (DRACH et al., 1994; SHUBINSKY; SCHLESINGER, 1997), uma vez que os PAMPs bacterianos podem ser reconhecidos por PRRs, como TLRs e sensores citoplasmáticos e induzir a produção de IFN I (STAMM; COLLINS; SHILOH, 2015; STANLEY et al., 2007), que por sua vez, ativariam a região promotora do CD38 induzindo a sua expressão.

Considerando a presença do elemento *ISRE* no promotor do CD38 (DEAGLIO; MEHTA; MALAVASI, 2001), estimulamos o PBMC com diferentes concentrações de interferons e observamos a expressão do CD38 na população de células CD34⁺. Interessantemente, não observamos aumento na expressão da molécula. Diante desse resultado, alguns trabalhos demonstram que citocinas induzem a expressão do CD38 e que isso é dependente do tipo celular. Foi mostrado que células

dendríticas e macrófagos murinos, estimulados com TNF α e células dendríticas estimuladas com IFN α aumentam a expressão do CD38 (PARTIDA-SÁNCHEZ et al., 2004; SUN et al., 2006; TREPIAKAS et al., 2009).

Em contrapartida, quando olhamos pra outro tipo celular, como células HL-60², o estímulo como atRA resulta no rápido aumento da expressão do CD38, que não foi observado com estímulo com o IFN- γ (DRACH, JOHANNES; SHORONG ZHAO, 1993). Diante dessa versatilidade, Sun e colaboradores (2006) investigaram a regulação do promotor do CD38, realizando várias mutações no mesmo, e transfectaram células murinas precursoras de osteoblasto (MC3T3-E1) e macrófagos precursores de osteoclasto (RAW-C3) com diferentes mutações no promotor. Os resultados obtidos por ele mostram que o promotor do CD38 exibe diferenças na ativação em ambas as células, sugerindo que a expressão desse gene pode ser regulada de maneira célula-específica (SUN et al., 2006).

Na literatura, um estudo mostra que *Listeria monocytogenes*, uma bactéria intracelular, também é capaz de induzir o aumento da expressão da molécula CD38 em neutrófilos, monócitos inflamatórios e células dendríticas (LISCHKE et al., 2013), sugerindo que esta indução não seja uma característica exclusiva apenas do *Mtb*. Adicionalmente, essa molécula tem sido proposta como um marcador de tuberculose ativa por apresentar alta expressão em células T CD4⁺ de pacientes com TB ativa (ADEKAMBI et al., 2015).

Alguns estudos baseados em perfil de expressão gênica demonstram que durante a infecção por *Mtb* há o aumento da expressão de receptores RAR e RXR (BOUTTIER et al., 2016; SAINI et al., 2018). Análises de transcriptomas com imunoprecipitação de cromatina por marcação da monometilação da histona H4 lisina 4 (H3K4me1) para determinar enhancers ativados (ChIPseq), demonstram que durante a infecção por *Mtb* (cepa laboratorial H37Rv) em células de linhagem THP-1 (monócitos humanos) os sítios de ligação do receptor RAR são enriquecidos em regiões H3K4me1 (BOUTTIER et al., 2016), corroborando com estes dados, estudos realizados em células dendríticas humanas infectadas também mostram enriquecimento dos sítios de ligação do RAR (PACIS et al., 2015). Diante disso, investigamos o envolvimento de enzimas ALDHs do *Mtb* na indução de genes RARE, como o CD38, durante a infecção em células CD34⁺. Observamos com

² Linhagem humana de leucemia mieloide aguda (COLLINS, 1987).

os dados deste trabalho que ao expormos as bactérias com as ALDHs inibidas, por meio do tratamento com o DEAB, ocorre a prevenção da indução da molécula RARE CD38 nas células CD34⁺. Com isso, nós sugerimos que durante a infecção, no ambiente intracelular, as enzimas ALDHs do *Mtb* podem metabolizar o retinal hospedeiro, produzindo mais atRA, que por sua vez induziria a expressão de genes RAREs, como observamos com o CD38. Além disso, os resultados de UFCs obtidos demonstram que a inibição de ALDHs da bactéria não altera a sua viabilidade da durante a infecção.

Ademais, os dados obtidos neste trabalho a partir da inibição de ALDHs da célula hospedeira antes da infecção, mostram aumento na indução do RARE CD38, sugerindo participação de ALDHs do *Mtb* nesta indução. Adicionalmente, observamos que quando as ALDHs da célula hospedeira e da bactéria estão inibidas, ocorre a redução da expressão do gene RARE CD38, reforçando a participação de ambas as enzimas na indução do CD38. Interessantemente, observamos que a proliferação intracelular da bactéria parece ser dependente de enzimas ALDHs da célula e da bactéria, uma vez que observamos redução do crescimento bacteriano durante a infecção. Corroborando esses dados, a análise de células por citometria de fluxo mostrou que não houve redução da viabilidade celular, sugerindo que as células permaneceram viáveis durante a infecção. Diante desses dados sugerimos que a proliferação do *Mtb* é dependente de ALDHs do hospedeiro e do *Mtb*.

Tais achados corroboram com dados obtidos por Cooper e colaboradores (2018), os quais avaliaram os efeitos do tratamento com DEAB na expressão de marcadores de superfície em células CD34⁺ e demonstraram que o tratamento com o DEAB reduz a expressão do CD38 (COOPER et al., 2018), demonstrando a participação de enzimas ALDHs na indução do CD38.

Correlacionando ao contexto infeccioso, *Mtb* encontra uma robusta resposta oxidativa como espécies reativas de oxigênio (ROS) e Óxido Nítrico (NO), que são produzidas pelas células do sistema imunológico em resposta a infecção (LANDES et al., 2015; LIBARDO et al., 2018; PAIVA; BOZZA, 2014; WEISS; SCHAIBLE, 2015), e o aumento do estresse oxidativo culmina na produção de mais de 200 tipos diferentes de aldeídos (JACKSON et al., 2011; SINGH et al., 2013a). Estas moléculas são fortemente eletrofílicas, altamente reativas e de vida longa e reagem rapidamente com DNA, RNA, proteínas, comprometendo a homeostase celular, inativando enzimas, causando danos ao DNA e consequentemente morte celular, sendo então necessário a atividade de enzimas ALDHs para diminuição do estresse oxidativo, por meio da

detoxificação de aldeídos tóxicos (JACKSON et al., 2011; PEROZICH et al., 1999; SINGH et al., 2013b; SOBREIRA et al., 2011).

Nesse sentido, a redução do crescimento intracelular mediante a inibição das ALDHs bacterianas e da célula hospedeira tornam o *Mtb* mais suscetível a ação desses aldeídos, sendo então necessária a atividades das enzimas ALDHs do bacilo para a detoxificação de aldeídos tóxicos durante a infecção, adicionalmente, foi demonstrado em *S. aureus* deficientes para um gene ALDH, que esse gene é necessário para o crescimento sob estresse oxidativo gerado pela exposição a NaOCl (IMBER et al., 2018).

Buscando compreender como as ALDHs do *Mtb* estariam participando na indução do CD38 durante a infecção, nós investigamos se essa interação entre as ALDHs da bactéria/hospedeiro com genes RARE se daria por meio da participação no metabolismo de ácido retinóico. Mediante a isso, nós hipotetizamos que se essa interação fosse por meio da produção de ácido retinóico não observaríamos aumento da expressão da molécula CD38 ao utilizamos um agonista inverso dos receptores nucleares RAR. A indução da expressão gênica mediada pelo atRA se dá a partir da ligação deste aos receptores nucleares RAR ou RXR (SEVER; GLASS, 2013). No caso do CD38, a isoforma RAR α é o elemento de ligação ao atRA (DRACH et al., 1994). Desta forma, as amostras de PBMC foram tratadas com BMS 493, um inibidor Pan-agonista inverso que inibe todas as três isoformas do receptor RAR, processo este realizado em momento anterior à infecção. Os dados obtidos mostraram redução na expressão do CD38 nas células que foram tratadas com o inibidor BMS e infectadas pelo *Mtb*, o que nos possibilita inferir que o *Mtb* induz a expressão da molécula CD38 por meio da via do ácido retinóico, e mais especificamente, através do receptor RAR. No entanto, este experimento não nos permitiu identificar qual isoforma do receptor está envolvida com o dado fenótipo. Estes dados corroboram com Drach e colaboradores (1994) que demonstraram que a indução do CD38 depende dos receptores de RAR (DRACH et al., 1994). Os dados de contagem de células bacterianas viáveis demonstram que o crescimento intracelular da bactéria não foi afetado pela inibição dos receptores RAR, sugerindo que a via do ácido retinóico não está envolvida com a proliferação da bactéria durante a infecção. Este conjunto de dados também reforça a hipótese que a interação entre as ALDHs do *Mtb* e os genes RAREs do hospedeiro sejam mediadas pelo ácido retinóico.

Os resultados apresentados nesse trabalho também sugerem a participação de ALDHs do *Mtb* no metabolismo de ácido retinóico da

célula hospedeira, no entanto, algumas linhas de evidências sugerem existir uma correlação entre os baixos níveis de vitamina A e o risco à tuberculose (GROBLER et al., 2018; KEFLIE et al., 2018; RAMACHANDRAN et al., 2004; RWANGABWOBA; FISCHMAN; SEMBA, 1998). Nesse sentido, vários estudos *in vitro* demonstram o papel protetor e antibacteriano da vitamina A, e que esses efeitos sejam mediados através da resposta celular hospedeira ao atRA e não por ação direta deste composto nas bactérias (ABD-NIKFARJAM et al., 2018; COLEMAN et al., 2018; CROWLE; ROSS, 1989; LARANGE; CHEROUTRE, 2016; WHEELWRIGHT et al., 2014). Em contrapartida, tais trabalhos utilizam altas concentrações de atRA, o que não reflete a concentração fisiológica no soro humano, por exemplo, que varia de 3-13 nM/mL. Além disso, há uma escassez na literatura sobre as concentrações intracelulares de atRA, o que dificulta a associação entre atividade antibacteriana do atRA exógeno e endógeno (JAYNE; ISOHERRANEN, 2009; ROSS; ZOLFAGHARI, 2011). Os efeitos específicos do atRA dependem da concentração, das isoformas dos receptores, do tipo celular, das condições experimentais e da regulação da concentração por meio da degradação realizada por enzimas da família CYP26 (LARANGE; CHEROUTRE, 2016).

Em suma, o presente trabalho identificou que o crescimento intracelular o bacilo é dependente de enzimas ALDHs, gerando a hipótese que durante a infecção por *Mtb* as ALDHs bacterianas são importantes para a detoxificação de aldeídos gerados pela resposta oxidativa da célula. Neste contexto, os produtos de detoxificação das ALDHs (ex.: atRA) participam da indução de genes RAREs em células CD34⁺.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho identificou que as enzimas ALDHs do *Mycobacterium tuberculosis* apresentam conservação dos sítios catalíticos e estrutura terciária com as ALDHs humanas. Adicionalmente, identificou-se uma interação entre as ALDHs do *Mtb* com a via de ácido retinóico da célula hospedeira e concluímos que durante a infecção, as ALDHs do *Mtb* estão envolvidas na indução de genes induzidos por ácido retinóico (RAREs) das células CD34⁺ e que as enzimas ALDHs do bacilo e da célula hospedeira são importantes para o crescimento intracelular do *Mtb*.

REFERÊNCIAS

ABD-NIKFARJAM, B. et al. Role of Chicoric Acid and 13-Cis Retinoic Acid in Mycobacterium tuberculosis Infection Control by Human U937 Macrophage. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.

ADEKAMBI, T. et al. Biomarkers on patient T cells diagnose active tuberculosis and monitor treatment response.[Erratum appears in J Clin Invest. 2015 Sep;125(9):3723; PMID: 26325038]. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 5, p. 1827–1838, 2015.

AKABOSHI, S. et al. Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency. **Human Mutation**, v. 22, n. 6, p. 442–450, dez. 2003.

AL TANOURY, Z.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 7, p. 1761–75, jul. 2013.

ALEXANDER, K. A. et al. Novel mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. Mungi. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1296–1299, 2010.

ALONSO, S.; JONES, R. J.; GHIAUR, G. Retinoic acid, CYP26, and drug resistance in the stem cell niche. **Experimental Hematology**, v. 54, p. 17–25, 2017.

ANG, H. L. et al. Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 16, p. 9526–34, 19 abr. 1996.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **The Journal of experimental medicine**, v. 142, n. 1, p. 1–16, 1 jul. 1975.

ARTS, R. J. W. et al. Vitamin A induces inhibitory histone methylation modifications and down-regulates trained immunity in human monocytes. v. 98, n. July, p. 1–8, 2015.

ASTARIE-DEQUEKER, C. et al. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 469–77, fev. 1999.

AZIZ, R. K. et al. The aldehyde dehydrogenase, AldA, is essential for L-1,2-propanediol utilization in laboratory-evolved *Escherichia coli*. **Microbiological Research**, v. 194, p. 47–52, 2017.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715–1724, 2005.

BALMER, J. E.; BLOMHOFF, R. Gene expression regulation by retinoic acid. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 11, p. 1773–1808, 2002.

BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the goals of prophylaxis. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 845–855, 2009.

BASTIEN, J.; ROCHETTE-EGLY, C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. **Gene**, v. 328, n. 1–2, p. 1–16, 2004.

BERRY, D. C. et al. Cross Talk between Signaling and Vitamin A Transport by the. v. 32, n. 15, p. 3164–3175, 2012.

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, 2010.

BERTHRONG, M. THE MACROPHAGE-TUBERCLE BACILLUS RELATIONSHIP AND RESISTANCE TO TUBERCULOSIS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 154, n. 1 Biology of My, p. 157–166, 1 set. 1968.

BHASKAR, A. et al. Stress and Host Immunity Amplify *Mycobacterium tuberculosis* Phenotypic Heterogeneity and Induce Nongrowing Metabolically Active Forms. **Annual review of microbiology**, v. 5, n. 1, p. 5119–5126, 2015.

BILLIG, S. et al. Lactate oxidation facilitates growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6484, 2017.

BLOOM, C. I. et al. Transcriptional Blood Signatures Distinguish Pulmonary Tuberculosis, Pulmonary Sarcoidosis, Pneumonias and Lung Cancers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

BORONAT, A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Terpenoid Biosynthesis in Prokaryotes. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 20, n. 1, p. 237–247, 2014.

BOUETIER, M. et al. Alu repeats as transcriptional regulatory platforms in macrophage responses to *M. tuberculosis* infection. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 22, p. 10571–10587, 2016.

BOWLES, J. et al. Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 596–600, 28 abr. 2006.

BOYD, L. A. et al. Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) : structural similarity to mammalian ALDHs and a plant BADH. **Gene**, v. 103, n. 1, p. 45–52, 1991.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77–89, 1968.

BRANDT, F. A.; LLOYD, D. L. Differential staining for *M. tuberculosis* and *M. leprae*; a modification of the Ziehl-Neelsen stain. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 3, n. 4, p. 296–302, 1954.

BRAZDA, P. et al. Live-cell fluorescence correlation spectroscopy

dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 21, p. 3631–3642, 2011.

BREITMAN, T. R.; SELONICK, S. E.; COLLINS, S. J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 5, p. 2936–2940, 1980.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The Envelope of Mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 29–63, jun. 1995.

BRIKEN, V. et al. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 2, p. 391–403, 16 jul. 2004.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 6–24, 2015.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 15, p. 1551–8, dez. 1995.

BROCKER, C. et al. Aldehyde Dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) Is a Novel Enzyme Involved in Cellular Defense against Hyperosmotic Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18452–18463, 11 jun. 2010.

BROCKER, C. et al. Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 191, n. 1–3, p. 269–277, 30 maio 2011.

BROCKER, C. et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. **Planta**, v. 237, n. 1, p. 189–210, 25 jan. 2013.

BURKE, W. J. et al. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: implications for Parkinson's disease

pathogenesis. **Brain research**, v. 989, n. 2, p. 205–13, 7 nov. 2003.

BUSHUE, N.; WAN, Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 13, p. 1285–1298, 2010.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 2000.

CAMMAS, L. et al. Expression of the murine retinol dehydrogenase 10 (Rdh10) gene correlates with many sites of retinoid signalling during embryogenesis and organ differentiation. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 10, p. 2899–2908, out. 2007.

CAÑETE, A. et al. Role of Vitamin A/Retinoic Acid in Regulation of Embryonic and Adult Hematopoiesis. **Nutrients**, v. 9, n. 2, 20 fev. 2017.

CHANG, H.-K.; HOU, W.-S. Retinoic Acid Modulates Interferon- γ Production by Hepatic Natural Killer T Cells via Phosphatase 2A and the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 3, p. 200–212, 3 mar. 2015.

CHAPELLIER, B. et al. Physiological and retinoid-induced proliferations of epidermis basal keratinocytes are differently controlled. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3402–3413, 1 jul. 2002.

CHARGAFF, E.; LEDERER, E. Carotenoid pigments of two acid fast bacteria. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 54, p. 383–388, 1935.

CHEN, F. et al. Inhibition of Tgf signaling by endogenous retinoic acid is essential for primary lung bud induction. **Development**, v. 134, n. 16, p. 2969–2979, 18 jul. 2007.

CHEN, N.; ONISKO, B.; NAPOLI, J. L. The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 30, p. 20841–7, 25 jul. 2008.

CHEN, Y. et al. Focus on molecules: ALDH1A1: from lens and corneal crystallin to stem cell marker. **Experimental eye research**, v. 102, p.

105–6, set. 2012.

CHEN, Y.; MEHTA, G.; VASILIOU, V. Antioxidant defenses in the ocular surface. **The ocular surface**, v. 7, n. 4, p. 176–85, out. 2009.

CHIEPPA, M. et al. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 9, p. 4552–60, 1 nov. 2003.

COITINHO, J. B. et al. Structural and kinetic properties of the aldehyde dehydrogenase NahF, a broad substrate specificity enzyme for aldehyde oxidation. **Biochemistry**, v. 55, n. 38, p. 5453–5463, 2016.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 11 jun. 1998.

COLEMAN, M. M. et al. All-trans Retinoic Acid Augments Autophagy during Intracellular Bacterial Infection. p. 1–30, 2018.

COLLINS, A. C. et al. Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for Mycobacterium tuberculosis. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 6, p. 820–828, 10 jun. 2015.

COLLINS, S. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v. 70, n. 5, 1987.

COLLINS, S. J.; ROBERTSON, K. A.; MUELLER, L. Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR- α). **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 5, p. 2154–63, maio 1990.

CONRAD, W. H. et al. Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 6, p. 1371–1376, 7 fev. 2017.

COOPER, T. T. et al. Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase-Activity Expands Multipotent Myeloid Progenitor Cells with Vascular

Regenerative Function. **Stem Cells**, 2018.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 641–676, out. 2003.

CROKER, A. K.; ALLAN, A. L. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 75–87, 5 maio 2012.

CROWLE, A. J.; ROSS, E. J. Inhibition by retinoic acid of multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 3, p. 840–844, 1989.

DAS, B. et al. CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells May Provide a Niche for Dormant Mycobacterium tuberculosis. v. 5, n. 170, 2013.

DAVID, H. L. Biogenesis of beta-carotene in *Mycobacterium kansasii*. **Journal of bacteriology**, v. 119, n. 2, p. 527–33, ago. 1974a.

DAVID, H. L. Carotenoid pigments of *Mycobacterium kansasii*. **Applied microbiology**, v. 28, n. 4, p. 696–9, out. 1974b.

DEAGLIO, S.; MEHTA, K.; MALAVASI, F. Human CD38: A (r)evolutionary story of enzymes and receptors. **Leukemia Research**, v. 25, n. 1, p. 1–12, 2001.

DERETIC, V. et al. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 719–727, maio 2006.

DEY, A.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol and oxidative liver injury. **Hepatology**, v. 43, n. S1, p. S63–S74, fev. 2006.

DHIR, S.; SIRSI, M. Pigments of unclassified mycobacteria. I. Nature of pigments in a scotochromogenic strain (P-15) of mycobacteria. **Indian journal of biochemistry**, v. 2, n. 2, p. 118–9, jun. 1965.

DONOVAN, M. L. et al. Type I interferons in the pathogenesis of

tuberculosis: Molecular drivers and immunological consequences. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, 2017.

DRACH, JOHANNES; SHORONG ZHAO, F. M. E K. M. **Rapid induction of CD38 antigen on myeloid leukemia by ATRA**, 1993.

DRACH, J. et al. Retinoic Acid-induced Expression of CD38 Antigen in Myeloid Cells Is Mediated through Retinoic Acid Receptor- α Retinoic Acid-induced Expression of CD38 Antigen in Myeloid Cells Is Mediated through Retinoic Acid Receptor- α « 1. **Cancer Research**, v. 54, p. 1746–1752, 1994.

DURSTON, A. J. et al. Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. **Nature**, v. 340, n. 6229, p. 140–144, 13 jul. 1989.

DZHAGALOV, I.; CHAMBON, P.; HE, Y.-W. Regulation of CD8+ T Lymphocyte Effector Function and Macrophage Inflammatory Cytokine Production by Retinoic Acid Receptor . **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2113–2121, 2007.

EDENBERG, H. J.; MCCLINTICK, J. N. Alcohol Dehydrogenases, Aldehyde Dehydrogenases, and Alcohol Use Disorders: A Critical Review. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 11 nov. 2018.

ENOMOTO, N. et al. Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 13, n. 6, p. 1071–5, jun. 1991.

ESMAIL, H. et al. The ongoing challenge of latent tuberculosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1645, 2014.

ESMAIL, H. et al. Complement pathway gene activation and rising circulating immune complexes characterize early disease in HIV-associated tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201711853, 2018.

ESTEY, T. et al. Structural and functional modifications of corneal crystallin ALDH3A1 by UVB light. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15218, 21

dez. 2010.

FERGUSON, J. S. et al. Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. **Infection and immunity**, v. 72, n. 5, p. 2564–73, maio 2004.

FERRAZ, L. F. C. et al. Ferric iron uptake genes are differentially expressed in the presence of copper sulfides in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain LR. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 609–617, 4 mar. 2011.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 4 jan. 2016.

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

FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 527–531, 1 set. 2015b.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. p. 3–66, 2013.

GAO, C.; HAN, B. Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). **Gene**, v. 431, n. 1–2, p. 86–94, 2009.

GAO, L.-Y. et al. Transposon mutagenesis of *Mycobacterium marinum* identifies a locus linking pigmentation and intracellular survival. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 922–929, 2003.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 1, p. 7–17, 6 jan. 2003.

GHIAUR, G. et al. Regulation of human hematopoietic stem cell self-renewal by the microenvironment's control of retinoic acid signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 40, p. 16121–16126, 2013.

GORDON, S. V. et al. Pathogenicity in the tubercle bacillus: Molecular and evolutionary determinants. **BioEssays**, v. 31, n. 4, p. 378–388, 2009.

GROBLER, L. et al. IN PRACTICE Nutritional supplements for people being treated for active tuberculosis : A technical summary. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 108, n. 1, p. 16–18, 13 dez. 2018.

GRÖSCHEL, M. I. et al. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 677–691, 26 nov. 2016.

GUDAS, L. J. Retinoids, epigenetic changes during stem cell differentiation, and cell lineage choice. p. 291–306, 2015.

GUIRADO, E.; SCHLESINGER, L. S.; KAPLAN, G. **Macrophages in tuberculosis: Friend or foe**. [s.l: s.n.]. v. 35

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–41, 2018.

HALL, J. A. et al. Essential Role for Retinoic Acid in the Promotion of CD4+ T Cell Effector Responses via Retinoic Acid Receptor Alpha. **Immunity**, v. 34, n. 3, p. 435–447, 25 mar. 2011.

HARRISON, E. H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1821, n. 1, p. 70–7, jan. 2012.

HASHIMOTO, H.; URAGAMI, C.; COGDELL, R. J. Carotenoids and Photosynthesis. In: **Sub-cellular biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 79p. 111–139.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 2, p. 635–43, 15 jul. 1997.

HERTZBERG, S.; LIAAEN JENSEN, S. Bacterial carotenoids XX. The carotenoids of *Mycobacterium phlei* strain Vera. 2. The structures of the phlei-xanthophylls--two novel tertiary glucosides. **Acta chemica Scandinavica**, v. 21, n. 1, p. 15–41, 1967.

HIGUCHI, S. et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. **American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 8, p. 1219–1221, ago. 1995.

HILL, J. A. et al. Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4+CD44hi Cells. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 758–770, 14 nov. 2008.

HONG, S. H. et al. Alternative biotransformation of retinal to retinoic acid or retinol by an aldehyde dehydrogenase from *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3940–3946, 2016.

HOUBEN, D. et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1287–1298, ago. 2012.

HOUSSAINI-IRAQUI, M. et al. Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in *Mycobacterium smegmatis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 90, n. 3, p. 239–244, 1992.

HU, K. Q. et al. The biochemical characterization of ferret carotene-9', 10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 28, p. 19327–19338, 2006.

HUANG, M. E. et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 72, n. 2, p. 567–72, ago. 1988.

ICHIYAMA, S.; SHIMOKATA, K.; TSUKAMURA, M. Relationship between *Mycobacterial Pigments Species* and Their Carotenoid Pigments. **Microbial Immunology**, v. 32, n. 5, p. 473–479, 1988.

IMBER, M. et al. The aldehyde dehydrogenase AldA contributes to the hypochlorite defense and is redox-controlled by protein S-bacillithiolation in *Staphylococcus aureus*. **Redox Biology**, v. 15, n.

November 2017, p. 557–568, 2018.

INGRAHAM, M. A.; STEENBOCK, H. The relation of micro-organisms to carotenoids and vitamin A: The production of carotenoids by *Mycobacterium phlei*. **The Biochemical journal**, v. 29, n. 11, p. 2553–62, nov. 1935.

ISHIKAWA, E. et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 2879–2888, 21 dez. 2009.

JACKSON, B. et al. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. **Human genomics**, v. 5, n. 4, p. 283–303, 2011.

JAUREGUIBEITIA, A. et al. Purification, characterization and cloning of aldehyde dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1073–1086, 2007.

JAYNE, E.; ISOHERRANEN, N. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, v. 5, n. 8, p. 875–866, 2009.

JONES, B. W. et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 6, p. 1036–44, jun. 2001.

JOZEF CZUK, S. et al. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. **Molecular Systems Biology**, v. 6, n. 364, p. 1–16, 2010.

JULIAN, E. et al. Microscopic Cords, a Virulence-Related Characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, Are Also Present in Nonpathogenic *Mycobacteria*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 7, p. 1751–1760, 1 abr. 2010.

KAMINO, K. et al. Deficiency in Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Increases the Risk for Late-Onset Alzheimer's Disease in the Japanese Population. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 1, p. 192–196, 24 jun. 2000.

- KANG, P. B. et al. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 7, p. 987–999, 3 out. 2005.
- KASTNER, P. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RAR α . **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1314–1320, 2001.
- KEFLIE, T. S. et al. Vitamin A and zinc deficiencies among tuberculosis patients in Ethiopia. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 12, p. 27–33, 1 ago. 2018.
- KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 7 jun. 2015.
- KIEFER, C. et al. Identification and Characterization of a Mammalian Enzyme Catalyzing the Asymmetric Oxidative Cleavage of Provitamin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 14110–14116, 2001.
- KIM, C. Y. et al. Analysis of nucleoside-binding proteins by ligand-specific elution from dye resin: Application to *Mycobacterium tuberculosis* aldehyde dehydrogenases. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 10, n. 4, p. 291–301, 2009.
- KIM, M. H.; TAPAROWSKY, E. J.; KIM, C. H. Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 107–19, 21 jul. 2015.
- KISHIMOTO, H. et al. Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15429–34, 1998.
- KLOER, D. P.; SCHULZ, G. E. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 19–20, p. 2291–2303, 2006.
- KOCH, R. The Etiology of Tuberculosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 1270–1274, 1982.

KONKIT, M.; CHOI, W. J.; KIM, W. alcohol dehydrogenase activity in *Lactococcus chungangensis* : application in cream cheese to moderate alcohol uptake. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 5974–5982, 2015.

KOPPAKA, V. et al. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 520–39, 2012a.

KOPPAKA, V. et al. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 520–539, 2012b.

KOTCHONI, S. O. et al. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. **Plant, cell & environment**, v. 29, n. 6, p. 1033–48, jun. 2006.

KRUPENKO, S. A.; KRUPENKO, N. I. ALDH1L1 and ALDH1L2 Folate Regulatory Enzymes in Cancer. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l: s.n.]. v. 1032p. 127–143.

LALEVÉE, S. et al. Genome-wide in Silico identification of new conserved and functional retinoic acid receptor response elements (direct repeats separated by 5 bp). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 38, p. 33322–33334, 2011.

LANDES, M. B. et al. Role for NOD2 in *Mycobacterium tuberculosis*-induced iNOS expression and NO production in human macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 97, n. 6, p. 1111–9, jun. 2015.

LARANGE, A.; CHEROUTRE, H. Retinoic Acid and Retinoic Acid Receptors as Pleiotropic Modulators of the Immune System. **Annual Review of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 369–394, 2016.

LAURSEN, K. B.; GUDAS, L. J. Combinatorial knockout of RAR α , RAR β , and RAR γ completely abrogates transcriptional responses to retinoic acid in murine embryonic stem cells. n. 22, 2018.

LE MAIRE, A. et al. A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, n. 7, p. 801–807, 13 jul. 2010.

LEE, J. H. et al. Enhancement of retinal production by supplementing the surfactant Span 80 using metabolically engineered *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 461–466, 2012.

LEVY-FREBAULT, V.; DAVID, H. L. Mutations Affecting Pigment Synthesis in *Mycobacterium aurum*. **Journal of General Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 317–323, 1 dez. 1979.

LI, L. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 35, p. 12344–12349, 2005.

LIANG, M.-H.; ZHU, J.; JIANG, J.-G. Carotenoids biosynthesis and cleavage related genes from bacteria to plants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, n. June, p. 00–00, 2017.

LIBARDO, M. D. J. et al. Phagosomal Copper-Promoted Oxidative Attack on Intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 11, p. 1623–1634, 9 nov. 2018.

LIN, M.; NAPOLI, J. L. cDNA Cloning and Expression of a Human Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Active with 9- *cis* -Retinal and Identification of a Rat Ortholog, ALDH12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40106–40112, 22 dez. 2000.

LINTIG, J. VON; VOGT, K. Filling the Gap in Vitamin A Research. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11915–11920, 2000.

LISCHKE, T. et al. CD38 Controls the innate immune response against *listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 11, p. 4091–4099, 2013.

LIU, P. T. et al. Cutting edge: all-trans retinoic acid down-regulates TLR2 expression and function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 5, p. 2467–70, 1 mar. 2005.

LUGO-VILLARINO, G.; NEYROLLES, O. Manipulation of the Mononuclear Phagocyte System by Mycobacterium tuberculosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 11, p. a018549–a018549, 1 nov. 2014.

LUO, L. H. et al. Identification and characterization of Klebsiella pneumoniae aldehyde dehydrogenases increasing production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 9, p. 1319–1326, 2013.

LUO, M. et al. Diethylaminobenzaldehyde is a covalent, irreversible inactivator of ALDH7A1. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 3, p. 693–697, 2015.

MAERTZDORF, J. et al. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 7853–7858, 2012.

MANCA, C. et al. Mycobacterium tuberculosis CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 11, p. 6740–6, 1999.

MANCA, C. et al. Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α/β . **Pnas**, v. 98, n. 10, p. 5752–5757, 2001.

MANZANILLO, P. S. et al. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. **Cell Host and Microbe**, v. 11, n. 5, p. 469–480, 2012.

MARCHITTI, S. A. et al. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 6, p. 697–720, 8 jun. 2008.

MARCHITTI, S. A.; DEITRICH, R. A.; VASILIOU, V. Neurotoxicity and Metabolism of the Catecholamine-Derived 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyde: The Role of Aldehyde Dehydrogenase. **Pharmacological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 125–150, 22

mar. 2007.

MARLEIN, C. R. et al. All-Trans Retinoic Acid (ATRA) up-Regulates Cell Surface CD38 Expression Which Promotes Pro-Tumoral Mitochondrial Trafficking from Stromal Cells to Multiple Myeloma. **Blood**, v. 132, n. Suppl 1, p. 3153–3153, 21 nov. 2018.

MAY, M. E.; SPAGNUOLO, P. J. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity**, v. 55, n. 9, p. 2304–7, set. 1987.

MCWILLIAM, H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W597–W600, 1 jul. 2013.

MEANS, T. K. et al. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 12, p. 6748–55, 15 dez. 1999.

MEHTA, K.; CHEEMA, S. Retinoid-Mediated Signaling Pathways in CD38 Antigen Expression in Myeloid Leukemia Cells. v. 8194, n. December, 1998.

MEHTA, K.; SHAHID, U.; MALAVASI, F. Human CD38, a Cell-Surface Protein With Multiple Functions. **FASEB**, v. 10, n. 12, p. 1408–1417, 1996.

MISAWA, N. et al. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. **Journal Bacteriology**, v. 177, n. 22, p. 6575–6584, 1995.

MISSIHOUN, T. D.; KOTCHONI, S. O.; BARTELS, D. Aldehyde Dehydrogenases Function in the Homeostasis of Pyridine Nucleotides in *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2936, 13 dez. 2018.

MOISE, A. R.; AL-BABILI, S.; WURTZEL, E. T. Mechanistic Aspects of Carotenoid Biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 164–

193, 8 jan. 2014.

MOISE, A. R.; VON LINTIG, J.; PALCZEWSKI, K. Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in the metabolism of carotenoids. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 4, p. 178–186, 2005.

MOLD, C. Role of complement in host defense against bacterial infection. **Microbes and infection**, v. 1, n. 8, p. 633–8, jul. 1999.

MORGAN, C. A. et al. N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) as a substrate and mechanism-based inhibitor for human ALDH isoenzymes. **Chem Biol Interact**, v. 5, n. 234, p. 18–28, 2015.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5835, p. 256–60, 13 jul. 2007.

MURAMOTO, G. G. et al. Inhibition of Aldehyde dehydrogenase Expands Hematopoietic Stem Cells with Radioprotective Capacity. **Stem Cells**, v. 28, n. 3, p. 523–534, 2010.

MYDEL, P. et al. Roles of the Host Oxidative Immune Response and Bacterial Antioxidant Rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 7, p. e76, jul. 2006.

NAPOLI, J. L. Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 173, p. 19–33, 2017a.

NAPOLI, J. L. Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 173, p. 19–33, maio 2017b.

NAVARRO-AVIÑO, J. P. et al. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes. **Yeast**, v. 15, n. 10A, p. 829–842, jul. 1999.

NESBITT, N. M. et al. A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. **Infection and Immunity**, v. 78, n.

1, p. 275–282, 2010.

NIEDERWEISS, M. Physiology of mycobacteria. v. 2911, n. 09, 2009.

OKADA, Y. et al. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Developmental Biology**, v. 275, n. 1, p. 124–142, 1 nov. 2004.

ÖNENLI-MUNGAN, N. et al. Type II hyperprolinemia: A case report. **Turkish Journal of Pediatrics**, v. 46, n. 2, p. 167–169, 2004.

ORFALI, N. et al. Induction of autophagy is a key component of all-trans-retinoic acid-induced differentiation in leukemia cells and a potential target for pharmacological modulation. **Experimental Hematology**, v. 43, n. 9, p. 781–793, 2015.

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, 2012.

PACIS, A. et al. Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. **Genome research**, v. 25, n. 12, p. 1801–11, dez. 2015.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease**, v. 2, p. 1–23, 2016.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000–1037, 2014.

PANDEY, A. K.; SASSETTI, C. M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 11, p. 4376–4380, 18 mar. 2008.

PARK, S.-H.; BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 788–792, 17 ago. 2000.

PARK, S. K. et al. Functional polymorphism in aldehyde dehydrogenase-2 gene associated with risk of tuberculosis. **BMC**

medical genetics, v. 15, p. 40, 2 abr. 2014.

PARTIDA-SÁNCHEZ, S. et al. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 279–91, mar. 2004.

PARVATIYAR, K. et al. Global Analysis of Cellular Factors and Responses Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Resistance to Arsenite. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 4853–4864, 15 jul. 2005.

PEMBERTON, T. A. et al. Structural Studies of Yeast Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate Dehydrogenase (ALDH4A1): Active Site Flexibility and Oligomeric State. **Biochemistry**, v. 53, n. 8, p. 1350–1359, 4 mar. 2014.

PENUELAS, J.; MUNNEBOSCH, S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 4, p. 166–169, abr. 2005.

PEROZICH, J. et al. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 8, n. 1, p. 137–146, 1999.

PETER, W.; OPHEM, V.; DUINE, J. A. Different types of formaldehyde-oxidizing dehydrogenases in *Nocardia* species 239: Purification and characterization of an NAD-dependent aldehyde dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 282, n. 2, p. 248–253, 1990.

PINO-LAGOS, K.; BENSON, M. J.; NOELLE, R. J. Retinoic acid in the Immune system. **Biophysical Chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2432–2437, 2012.

PUTTINI, S. et al. ALDH1A3 Is the Key Isoform That Contributes to Aldehyde Dehydrogenase Activity and Affects in Vitro Proliferation in Cardiac Atrial Appendage Progenitor Cells. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 5, p. 90, 2018.

QUEVAL, C. J.; BROSCHE, R.; SIMEONE, R. The Macrophage : A Disputed Fortress in the Battle against *Mycobacterium tuberculosis*. v. 8, n. November, p. 1–11, 2017.

RAMACHANDRAN, G. et al. Vitamin A levels in sputum-positive pulmonary tuberculosis patients in comparison with household contacts and healthy “normals”. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 9, p. 1130–3, set. 2004.

RAMAKRISHNAN, L. et al. A crtB homolog essential for photochromogenicity in *Mycobacterium marinum*: Isolation, characterization, and gene disruption via homologous recombination. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 18, p. 5862–5868, 1997.

RAPANOEL, H. A.; MAZANDU, G. K.; MULDER, N. J. Predicting and Analyzing Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Its Human Host. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67472, 2 jul. 2013.

REECE, S. T. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Unable to Express Inducible Nitric Oxide Synthase Propagate Tuberculosis in Mice. v. 1, n. February, p. 1–5, 2018.

RENAUD, J. P. et al. Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 681–9, 14 dez. 1995.

RHINN, M.; DOLLÉ, P. Retinoic acid signalling during development. **Development (Cambridge, England)**, v. 139, n. 5, p. 843–58, 2012.

RILLING, H. C. Photoinduction of carotenoid synthesis of a *Mycobacterium* sp. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 60, n. 3, p. 548–556, 1962.

RIOJAS, M. A. et al. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 324–332, 1 jan. 2018.

RIVERA-MEZA, M. et al. Activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 reduces both the acquisition and

maintenance of ethanol intake in rats: A dual mechanism?

Neuropharmacology, v. 146, p. 175–183, 4 mar. 2019.

RIZZO, W. B.; CARNEY, G. Sjögren-Larsson syndrome: Diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). **Human Mutation**, v. 26, n. 1, p. 1–10, jul. 2005.

ROBLEDO, J. A.; MURILLO, A. M.; ROUZAUD, F. Physiological role and potential clinical interest of mycobacterial pigments. **IUBMB Life**, v. 63, n. February, p. 71–78, 2011.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, v. 70, p. 62–93, 2018.

ROOYAKKERS, A. W. J.; STOKES, R. W. Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of Mycobacterium tuberculosis but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, n. 3, p. 57–67, set. 2005.

ROSS, A.; ZOLFAGHARI, R. Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 450, n. Figure 1, p. 65–87, 2011.

RUITER, B.; PATIL, S. U.; SHREFFLER, W. G. Vitamins A and D have antagonistic effects on expression of effector cytokines and gut-homing integrin in human innate lymphoid cells. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 7, p. 1214–1225, jul. 2015.

RUNYON, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **The Medical clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 273–290, 1959a.

RUNYON, E. H. Source of scotochromogens. **The American review of respiratory disease**, v. 80, p. 277–8, ago. 1959b.

RUNYON, E. H. Pigment variations in photochromogenic mycobacteria with special reference to *M. vaccae*. **Pneumonologie Pneumology**, v. 142, n. 2–4, p. 90–93, jun. 1970.

- RUSSELL, D. G. et al. Cell Host & Microbe Review Mycobacterium tuberculosis Wears What It Eats. **Cell Host and Microbe**, v. 8, p. 68–76, 2010.
- RUSSO, J. E.; HAUGUITZ, D.; HILTON, J. Inhibition of mouse cytosolic aldehyde dehydrogenase by 4-(diethylamino)benzaldehyde. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 8, p. 1639–42, 15 abr. 1988.
- RWANGABWOBA, J. M.; FISCHMAN, H.; SEMBA, R. D. Serum vitamin A levels during tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 2, n. 9, p. 771–3, set. 1998.
- SAINI, A. et al. An Accord of Nuclear Receptor Expression in M. tuberculosis Infected Macrophages and Dendritic Cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2296, 2 dez. 2018.
- SANJABI, S. et al. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 447–53, ago. 2009.
- SAVIOLA, B. Pigments and Pathogenesis. **Mycobacterial diseases**, v. 4, n. 5, 2014.
- SAVIOLA, B.; FELTON, J. Acidochromogenicity is a common characteristic in nontuberculous mycobacteria. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 466, 2011.
- SCHERZINGER, D. et al. The Mycobacterium tuberculosis ORF Rv0654 encodes a carotenoid oxygenase mediating central and excentric cleavage of conventional and aromatic carotenoids. **FEBS Journal**, v. 277, n. 22, p. 4662–4673, 2010.
- SCHLESINGER, L. S. et al. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 7, p. 2771–80, 1 abr. 1990.
- SCHLESINGER, L. S. Entry of Mycobacterium tuberculosis into mononuclear phagocytes. **Current topics in microbiology and**

immunology, v. 215, p. 71–96, 1996.

SCHLESINGER, L. S.; HULL, S. R.; KAUFMAN, T. M. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 8, p. 4070–9, 15 abr. 1994.

SCHOENEN, H. et al. Cutting Edge: Mincle Is Essential for Recognition and Adjuvanticity of the Mycobacterial Cord Factor and its Synthetic Analog Trehalose-Dibehenate. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 6, p. 2756–2760, 15 mar. 2010.

SCHOREY, J. S.; SCHLESINGER, L. S. Innate Immune Responses to Tuberculosis. p. 1–27, 2016.

SCHWENDER, J. et al. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. **The Biochemical journal**, v. 316 (Pt 1), n. Pt 1, p. 73–80, 15 maio 1996.

SCRIBA, T. J. et al. Sequential inflammatory processes define human progression from *M. tuberculosis* infection to tuberculosis disease. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006687, 16 nov. 2017.

SEVER, R.; GLASS, C. K. Signaling by nuclear receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, p. 1–4, 2013.

SHETE, V.; QUADRO, L. Mammalian metabolism of β -carotene: gaps in knowledge. **Nutrients**, v. 5, n. 12, p. 4849–68, 27 nov. 2013.

SHINNICK, T. M.; GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 884–901, 1994.

SHUBINSKY, G.; SCHLESINGER, M. The CD38 lymphocyte differentiation marker: New insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. **Immunity**, v. 7, n. 3, p. 315–324, 1997.

SINGH, C. R. et al. Processing and Presentation of a Mycobacterial Antigen 85B Epitope by Murine Macrophages Is Dependent on the Phagosomal Acquisition of Vacuolar Proton ATPase and In Situ Activation of Cathepsin D. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3250–3259, 2006.

SINGH, S. et al. Aldehyde Dehydrogenases in Cellular Responses to Oxidative/ electrophilic Stress. **FREE RADICAL BIOL MED**, v. 1, n. 303, p. 89–101, 2013a.

SINGH, S. et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/ electrophilic stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 89–101, 2013b.

SINGH, S. P. et al. Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* triggered by the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (4-HNE). **Aging**, v. 1, n. 1, p. 68–80, 18 dez. 2008.

SINHA, R. et al. Retinoic acid decreases the severity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediated gastroenteritis in a mouse model. **Immunobiology**, v. 221, n. 7, p. 839–844, jul. 2016.

SMITH, N. H. et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Theoretical Biology**, v. 239, n. 2, p. 220–225, 2006.

SOBREIRA, T. J. P. et al. Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 1, p. 226–31, 2011.

STAMM, C. E.; COLLINS, A. C.; SHILOH, M. U. Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 204–219, 2015.

STANLEY, S. A. et al. The Type I IFN Response to Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Requires ESX-1-Mediated Secretion and Contributes to Pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 3143–3152, 2007.

STINEAR, T. P. et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. **Genome Research**, v. 17, n. 2, p. 192–200, 2007.

STINEAR, T. P. et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 729–741, 21 fev. 2008.

SU, M. et al. 3-Hydroxypropionaldehyde-specific aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis* catalyzes 3-hydroxypropionic acid production in *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 3, p. 717–724, 2015.

SUN, H.; KAWAGUCHI, R. The membrane receptor for plasma retinol-binding protein, a new type of cell-surface receptor. **International review of cell and molecular biology**, v. 288, p. 1–41, 2011.

SUN, L. et al. Structure and functional regulation of the CD38 promoter. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 3, p. 804–809, 2006.

SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. Pvclust : an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. v. 22, n. 12, p. 1540–1542, 2006.

TANAKA, M. et al. Implication of an aldehyde dehydrogenase gene and a phosphinothricin N-acetyltransferase gene in the diversity of *Pseudomonas cichorii* virulence. **Genes**, v. 3, n. 1, p. 62–80, 2012.

TÁRNOK, I.; TÁRNOK, Z. Carotene and xanthophylls in mycobacteria. I. Technical procedures; thin-layer chromatographic patterns of mycobacterial pigments. **Tubercle**, v. 51, n. 3, p. 305–12, set. 1970.

TOCCI, A. et al. Dual action of retinoic acid on human embryonic/fetal hematopoiesis: blockade of primitive progenitor proliferation and shift from multipotent/erythroid/monocytic to granulocytic differentiation program. **Blood**, v. 88, n. 8, p. 2878–88, 15 out. 1996.

TOMITA, H. et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and

cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 10, 2016.

TORNACK, J. et al. Human and mouse hematopoietic stem cells are a depot for dormant mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2017.

TORRELLES, J. B.; AZAD, A. K.; SCHLESINGER, L. S. Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidylmyo-inositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-type lectin pattern recognition receptors. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 3, p. 1805–16, 1 ago. 2006.

TREPIAKAS, R. et al. Addition of interferon-alpha to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function. **Vaccine**, v. 27, n. 16, p. 2213–2219, 6 abr. 2009.

UNDERHILL, D. M. et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 25, p. 14459–63, 7 dez. 1999.

URAY, I. P.; DMITROVSKY, E.; BROWN, P. H. Retinoids and Rexinoids in Cancer Prevention: From Laboratory to Clinic. **Semin Oncol**, v. 43, n. 12, p. 773–779, 2016.

VERSHININ, A. Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. **Bio Factors**, v. 10, n. 2–3, p. 99–104, 1999.

VIVEIROS, M. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A+. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, n. 1, p. 95–101, 2000.

WALTER, M. H.; FLOSS, D. S.; STRACK, D. Apocarotenoids: Hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. **Planta**, v. 232, n. 1, p. 1–17, 2010.

WALTER, M. H.; STRACK, D. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 663, abr. 2011.

WANG, X.; ALLEN, C.; BALLOW, M. Retinoic Acid Enhances the

Production of IL-10 While Reducing the Synthesis of IL-12 and TNF- α from LPS-Stimulated Monocytes/Macrophages. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 2, p. 193–200, 28 fev. 2007.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 182–203, mar. 2015.

WHEELWRIGHT, M. et al. All-Trans Retinoic Acid-Triggered Antimicrobial Activity against Mycobacterium tuberculosis Is Dependent on NPC2. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 5, p. 2280–2290, 2014.

WIENS, K. E.; ERNST, J. D. The Mechanism for Type I Interferon Induction by Mycobacterium tuberculosis is Bacterial Strain-Dependent. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 8, p. 1–20, 2016.

WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: Epidemiologia e Diagnóstico. **Revista De Patologia Tropical**, v. 40, n. 3, p. 207–229, 2011.

WIPPERMAN, M. F.; SAMPSON, N. S.; T. THOMAS, S. **Tuberculosis**. [s.l: s.n.]. v. 49

WU, C.; SU, S.; PENG, Y. Molecular cloning and differential expression of an aldehyde dehydrogenase gene in rice leaves in response to infection by blast fungus. **Biologia**, v. 62, n. 5, p. 523–528, 1 jan. 2007.

WYSS, A. et al. Expression pattern and localization of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. **The Biochemical Journal**, v. 354, n. Pt 3, p. 521–9, 2001.

XIN M. LUO; ROSS, A. C. Retinoic Acid Exerts Dual Regulatory Actions on the Expression and Nuclear Localization of Interferon Regulatory Factor-1. v. 231, n. 5, p. 619–631, 2006.

YOKOYAMA, A. et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 3, p. 433–9, mar. 2001.

YOSHIDA, A. et al. Human aldehyde dehydrogenase gene family. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 251, n. 3, p. 549–57, 1998.

YOSHIDA, A.; HSU, L. C.; DAVÉ, V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. **Enzyme**, v. 46, n. 4–5, p. 239–44, 1992.

ZHAO, D. et al. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. **European journal of biochemistry**, v. 240, n. 1, p. 15–22, 15 ago. 1996.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas - Divisão de Imunologia
88049 - 900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil

Coordenador do projeto:
Prof. Andre Bafica, M.D., PhD.
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus da Trindade, CCB-MIP, sala 211.
88037-000 Florianópolis – SC - BRAZIL
55.48.3721.5203
andre.bafica@ufsc.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO I

(Amostras de sangue periférico de doadores voluntários)

A Universidade Federal de Santa Catarina está empenhada em investigar como diferentes células de defesa do corpo reconhecem e respondem ao agente causador da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*. O *M. tuberculosis* é capaz de infectar diferentes células, podendo comprometer a funcionalidade dessas células. Dessa forma, buscamos entender como as micobactéria afetam o desenvolvimento e função de células brancas do sangue. Estas células são encontradas também na medula óssea, o local que produz todas as células de defesa do nosso corpo. O estudo desta interação pode levar à descoberta de novos aspectos na doença tuberculose, como a criação de vacinas e terapias mais potentes.

Termo de Consentimento

Você está sendo convidado a fazer parte de um estudo realizado na Universidade Federal de Santa Catarina:

O estudo será realizado no MIP/CCB/UFSC, Santa Catarina e inteiramente voluntário.

Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou retirar-se a qualquer momento.

Você pode não receber nenhum benefício caso decida fazer parte do estudo. Porém, a pesquisa a ser realizada nesse estudo pode dar-nos conhecimento para ajudarmos outras pessoas no futuro.

Algumas pessoas têm opinião pessoal, religiosa ou ética que pode limitar as pesquisas ou tratamento médico (ex.: transfusão de sangue). Se você tiver tal opinião, discuta, por favor, com os médicos da UFSC ou com a equipe de pesquisa antes que você concorde em participar do estudo.

Qual é a pesquisa?

“O impacto da infecção por micobactérias no desenvolvimento e ativação de células mielóides humanas”

Por que será feita a pesquisa?

A pesquisa está sendo desenvolvida a fim de compreendermos mais a respeito de uma doença chamada tuberculose. A tuberculose é uma doença que pode atingir vários tecidos do corpo, ocorrendo principalmente nos pulmões. O agente causador da tuberculose é o *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch, que é capaz de infectar diferentes células do sistema imune. No entanto, não existem dados suficientes a respeito da interação da micobactéria com células tronco-progenitoras. As células tronco-progenitoras são encontrados em grande número na medula óssea. O objetivo geral do presente projeto é estudar como *M. tuberculosis* afeta o desenvolvimento, ativação e função destas células. Os resultados obtidos nessa pesquisa podem ajudar no entendimento da tuberculose e no futuro ajudar a desenvolver novas vacinas e terapias.

População de estudo

Doadores de Sangue: Nós recrutaremos 30 indivíduos adultos saudáveis doadores de sangue no HU-UFSC entre 18 e 45 anos. Se você concordar em participar no estudo, nós utilizaremos os glóbulos brancos que serão separados do sangue doado.

O sangue que você está doando servirá para a obtenção de glóbulos vermelhos (hemácias) e plaquetas. No entanto, a outra parte do seu sangue, que contém os glóbulos brancos, seria descartada. Se você for elegível, seus os glóbulos brancos serão utilizadas para experimentos no laboratório. As células serão colocadas no tubo de ensaio e serão expostas ao bacilo *in vitro*. Assim, podemos estudar os aspectos relacionados a defesa contra o bacilo. Nós pedimos também sua permissão para mantermos suas células e soro em condições apropriadas para uso no futuro. Essas amostras serão armazenadas por 5 anos.

SIM, você pode armazenar minhas amostras para a pesquisa futura.

NÃO, você não pode armazenar minhas amostras para a pesquisa futura.

As amostras biológicas (soro, células e sobrenadantes de células) serão estocadas num freezer -80°C localizado no laboratório do Coordenador do projeto por 5 anos. Apenas o coordenador terá acesso a estas amostras. Nós mediremos os mediadores inflamatórios pelo método de ELISA nestas amostras para investigar se as micobactérias influenciam a resposta imunológica do hospedeiro.

Entretanto, nenhuma pesquisa com as amostras estocadas será realizada sem antes ter a aprovação pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos da UFSC.

Riscos/Desconfortos:

Os riscos e desconfortos associados com a participação do estudo são os mesmos relacionados à doação de sangue que você já está doando. A retirada de sangue é um procedimento padrão rotineiro com riscos mínimos envolvidos. Você pode experimentar algum desconforto ligeiro no local da entrada da agulha e pode haver alguma lesão. Além disso, há um risco muito pequeno de você desmaiar ou ter infecção no local da entrada da agulha. Não serão testados medicamentos ou substâncias de qualquer natureza. Você tem a garantia de plena liberdade de recusar-se a participar, ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. A participação no estudo não é obrigatória e caso não deseje participar ou se quiser abandonar o estudo, receberá a mesma atenção da nossa equipe. Sempre existe a possibilidade remota da quebra de sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei.

Benefícios Potenciais:

Você não receberá benefícios diretos deste estudo. O benefício principal que você pode ter neste estudo é a satisfação de participar uma investigação que possa entender o desenvolvimento de respostas imunes contra a tuberculose no homem. Este conhecimento pode ser usado para a compreensão da patogênese dessa doença, beneficiando outros indivíduos no futuro.

Achados novos: Todos os novos achados desenvolvidos neste estudo que pode se relacionar a tua participação, serão comunicados diretamente aos participantes.

OUTRAS INFORMAÇÕES IMPORTANTES

Garantia de sigilo e confidencialidade:

Seus registros médicos na UFSC são confidenciais. O sigilo e a privacidade dos participantes da pesquisa estão garantidos durante todas as fases desta pesquisa. Quando os resultados de um estudo da UFSC são relatados em jornais médicos ou em reuniões científicas, as pessoas que fazem parte do exame não são identificadas. Na maioria dos casos a UFSC não liberará nenhuma informação sobre sua participação na pesquisa sem sua permissão escrita. Entretanto, você deve saber que nós podemos liberar alguma informação de seu registro médico sem sua permissão, por exemplo, se for requerido por oficiais da lei ou outras pessoas autorizadas.

Plano de ação concernente à lesões relacionadas na pesquisa:

No geral, nenhum cuidado médico ou compensação financeira a longo prazo para os ferimentos relacionados à pesquisa serão fornecidos pela UFSC. Entretanto, você tem o direito de possuir tratamento se você acredita que lesões ocorreram devido a participação no presente estudo.

Garantia de indenização e ressarcimento:

Os pacientes não são pagos para fazer parte das pesquisas na UFSC. Esta pesquisa não lhe tará gastos, mas caso você tenha despesas comprovadamente decorrentes da pesquisa será ressarcido. Você também tem direito a indenização, nos termos da lei, se houver dano comprovadamente decorrente da pesquisa.

Problemas ou perguntas:

Se você tiver quaisquer problemas ou perguntas sobre este estudo, ou sobre toda lesão relacionada à pesquisa, contate o diretor do projeto, Prof. Dr. André Báfica; Universidade Federal de Santa Catarina MIP, telefone: 48.3721.5203

Endereço do CEPESH-UFSC: Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, no 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400, Contato: (48) 3721-6094, cep.propesq@contato.ufsc.br.

Todos os pesquisadores cumprirão os termos da resolução 466/12.

Consentimento do Documento. Mantenha por favor uma cópia deste original caso você queira ler outra vez. Como participante da pesquisa você tem a garantia de receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Eu o li, ou leram para mim, a explanação sobre este estudo e tive a oportunidade de discutí-lo e de fazer perguntas. Eu consinto por este meio fazer parte neste estudo. A testemunha que assinou este consentimento informado é alfabetizada e foi escolhida por mim. Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado em duas vias, rubricadas e assinadas. O participante receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura do Voluntário	Data
---------------------------------	-------------

Assinatura da pessoa informando consentimento obtido	Data
---	-------------

Assinatura da Testemunha	Data
---------------------------------	-------------

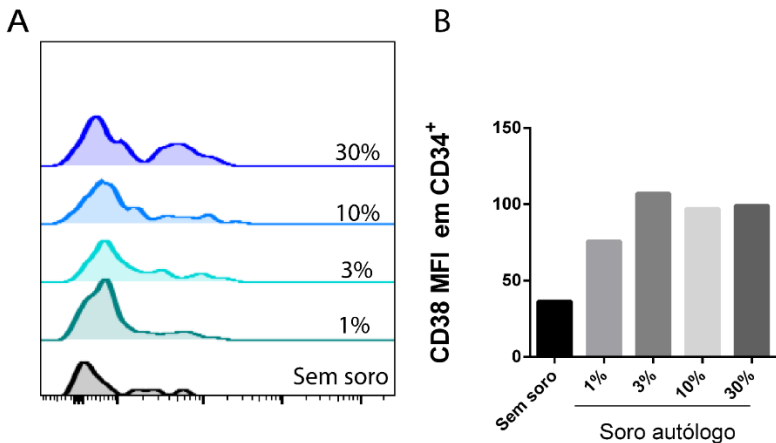


Figura 18 - Os retinóides presentes no soro autólogo induzem o aumento da expressão do CD38 em células CD34⁺. (A) Histograma representativo de um doador mostra que o MFI do CD38 em células expostas a diferentes concentrações de soro autólogo. (B) Gráfico em barra demonstra que diferentes concentrações do soro aumentam a expressão do CD38 de maneira concentração-dependente. Dados de 1 experimento. n:1.

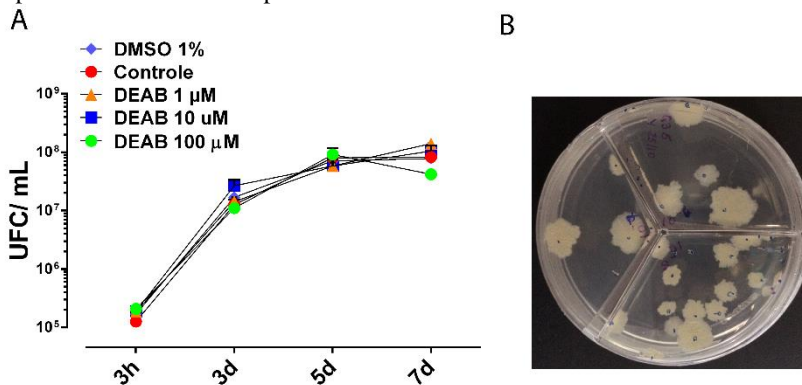


Figura 19 - As ALDHs de *Mtb* não são essenciais para o seu crescimento em meio de cultura *in vitro*. (A) Curva de crescimento de *Mtb* em meio líquido Middlebrook 7H9 exposta a diferentes concentrações de DEAB. Losango lilás: veículo do inibidor; Círculo vermelho: bactéria sem tratamento; Triângulo laranja: Bactéria exposta a 1 μM do DEAB; Quadrado azul: Bactéria exposta a 10 μM do DEAB; Círculo verde: Bactéria exposta a 100 μM do DEAB. Após cada tempo UFC foi realizado. (B) Fotografia representativa de uma placa contendo meio Middlebrook 7H10 após 30 dias de crescimento. Dados representativos de 1 experimento feito em duplicata técnica.

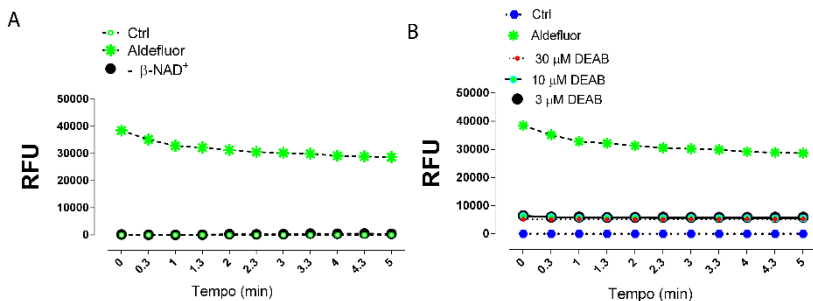


Figura 20 - O DEAB inibe a atividade enzimática de enzimas ALDHs presentes no extrato proteico do *Mtb*. (A) Atividade enzimática de ALDHs presente no extrato proteico total. RFU representa unidade relativa de fluorescência. Círculo verde: representa o controle com proteínas inativadas à 60° C por 15 minutos e todos os reagentes; Asterisco verde: representa o extrato proteico com o substrato Aldefluor e o co-fator; Círculo preto: extrato proteico total e o substrato aldefluor sem o co-fator. (B) Círculo azul: representa o controle com proteínas inativadas à 60° C por 15 minutos e todos os reagentes; Asterisco verde: representa o extrato proteico com o substrato Aldefluor e o co-fator; Círculo vermelho: representa o extrato proteico na presença de 30 μ M do DEAB, aldefluor e co-fator; Círculo azul céu: representa o extrato proteico na presença de 10 μ M do DEAB, aldefluor e co-fator; Círculo preto: representa o extrato proteico na presença de 3 μ M do DEAB, aldefluor e co-fator. Dados representativos de 1 experimento feito em duplicata técnica.