



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Yonne Karoline Tenório de Menezes

**Estudo da interação entre *Mycobacterium tuberculosis* e Receptores de Ácido retinoico do hospedeiro durante a infecção *in vitro* e *in vivo***

Florianópolis  
2022

Yonne Karoline Tenório de Menezes

**Estudo da interação entre *Mycobacterium tuberculosis* e Receptores de Ácido retinoico do hospedeiro durante a infecção *in vitro* e *in vivo***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador(a): Prof. Dr. André Báfica  
Coorientador: Prof. Dr. Charles A. Scanga

Florianópolis

2022

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

Tenório de Menezes, Yonne Karoline  
Estudo da interação entre Mycobacterium tuberculosis e  
Receptores de Ácido retinoico do hospedeiro durante a  
infecção in vitro e in vivo / Yonne Karoline Tenório de  
Menezes ; orientador, André Báfica, coorientador, Charles  
Scanga, 2022.  
86 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,  
2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Ácido retinoico. 3.  
Mycobacterium tuberculosis. 4. Macrófagos. I. Báfica, André  
. II. Scanga, Charles. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. IV. Título.

Yonne Karoline Tenório de Menezes

**Estudo da interação entre *Mycobacterium tuberculosis* e receptores de Ácido retinoico do hospedeiro durante a infecção *in vitro* e *in vivo***

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 26 de agosto de 2022, pela bancaexaminadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Ana Paula Junqueira Kipnis,  
Dr.(a)Instituição Universidade Federal  
de Goiás

Prof. José Henrique Maia Campos de  
Oliveira, Dr.Instituição Universidade Federal  
de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado paraobtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. André Báfica,  
Dr.(a)Orientador(a)

Florianópolis, 2022.



Dedico este trabalho aos meus queridos pais,  
Lia e Miguel Menezes.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. André Báfica, por me guiar e caminhar ao meu lado ao longo desses quase 6 anos. Foi uma honra trabalhar com um grande exemplo de cientista e mentor. Obrigada por sempre considerar as minhas opiniões e ideias científicas, por todo apoio para que eu pudesse conquistar e vencer os desafios profissionais, e principalmente por me ensinar que fracasso e resultados negativos não é algo a ser temido. Eterna gratidão Papito!

Agradeço ao meu coorientador no exterior Prof. Dr. Charles Scanga (Chuck) pela confiança no meu trabalho, por todo os ensinamentos sobre como estudar a tuberculose *in vivo* e pela oportunidade de trabalhar em projetos tão desafiadores. Foi uma honra trabalhar com um excelente mentor. Agradeço também à Dr. Erica Larson, por todos os ensinamentos sobre T cells, citometria de fluxo e ajuda nos experimentos. Nossos momentos divertidos no BSL-3 nunca serão esquecidos.

Agradeço aos membros da banca Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Paula Junqueira Kipnis, Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira, e Prof. Dr. Edroaldo Lummertz pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pela contribuição prestada.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, University of Pittsburgh e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, por toda formação e oportunidades de crescimento profissional. Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESC e Howard Hughes Medical Institut pelo financiamento dos projetos que permitiram a realização do presente trabalho, assim como pela bolsa fornecida. Agradeço ao programa Institucional de Internacionalização da Capes (Capes PrInt) pela bolsa que permitiu a realização do meu doutorado sanduíche. Agradeço à infraestrutura e ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário (LAMEB). Agradeço aos laboratórios do Dr. Scanga e Dr. Joanne Flynn pelas contribuições científicas durante o meu doutorado sanduíche. Agradeço a todos os técnicos, em especial à Abigail e Janelle que ajudaram durante em todos os experimentos *in vivo*.

Agradeço os meus queridos colegas de trabalho que compõe ou compuseram o Laboratório de Imunobiologia nesses últimos 6 anos. Nesse ambiente eu aprendi o verdadeiro significado do trabalho em equipe e a importância de um ambiente inspirador para pensar e fazer ciência. Não tenho dúvidas de que a minha jornada não teria sido a mesma se eu não pudesse contar com a amizade de vocês. Agradeço em especial ao TB team: Murilo Delgobo, Daniel Mendes, Greicy Dias, Lucas Mascarin, Ana Luiza Abdalla, Márick Starick e Carolina Eto pela contribuição nesse trabalho. Agradeço em especial ao Murilo Delgobo, Márick Starick,

e Carolina Eto, pelas várias horas discutindo resultados, planejando e executando experimentos. Agradeço às queridas ICs Meice Mantovani, Luana Ávila, Eduarda Munari e Bianca Beck por toda ajuda nos experimentos.

Agradeço também aos meus queridos amigos Daniel Patrício, Lucilene Granella, Mariana Maraschin e Rodrigo Formiga por todo conhecimento compartilhado e conversas enriquecedoras nos corredores do laboratório.

Agradeço também aos professores Daniel Mansur, José Henrique de Oliveira, Fernando Spiller e Fabienne Ferreira pelas contribuições importantes no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço também às minhas queridas amigas, Sayonara Tavares, Mariana Maraschin, Juliana Burguer e Natália Cavalcanti por serem incríveis *roommates*, especialmente por todo suporte durante a pandemia. À minha querida amiga e professora de inglês Laura Freitas.

Agradeço aos queridos amigos que fiz em Pittsburgh, Erica Larson, Kelly Galisteu, Rodrigo Ferreira, Rosany Lisboa, Monica Snyder e Carlos Osório por todo apoio, cuidado e suporte. Agradeço ao Nico Nigro pelo carinho, suporte e cuidado ao longo dessa reta final.

Agradeço também a todos aqueles que contribuíram financeiramente com a minha 'vaquinha' para que eu pudesse realizar o meu doutorado sanduíche.

E por último, mas não menos importante, eu gostaria de agradecer a Deus e à minha amada família que sempre me apoiou e esteve do meu lado em todos os momentos. Em especial aos meus pais, Lia e Miguel, por investirem desde cedo na minha educação, por incentivarem a buscar os meus sonhos e por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus queridos irmão, Suênya e Lucas, e a toda minha família pelo suporte e apoio incondicional. E a mim mesma, por não ter desistido, pela força e resiliência que permitiram que eu chegasse até aqui.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos o que participaram direta ou indiretamente da minha formação e execução deste trabalho.

## RESUMO

### **Estudo da interação entre *Mycobacterium tuberculosis* e Receptores de Ácido retinoico do hospedeiro durante a infecção *in vitro* e *in vivo***

O Ácido retinoico (RA), forma ativa da vitamina A, é um metabólito importante na regulação do sistema imunológico e regulação gênica por meio da ativação de receptores nucleares de ácido retinoico (RAR) e receptores x retinoides (RXR). Ao realizar experimentos usando células THP-1 como modelo para infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), observamos que culturas celulares suplementadas com soro fetal bovino (FBS) exibiam aumento na ativação dos receptores RAR, sugerindo que o Mtb ativa a via RAR do hospedeiro. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a via endógena de RAR durante a infecção *in vitro* e *in vivo* por meio da inibição farmacológica dos receptores RAR. Observamos que Mtb induziu ativação de genes regulados por ácido retinoico (RARE) a nível transcricional e proteico em células THP-1 e monócitos primários humanos de maneira dependente de RAR. A atividade RAR estimulada por Mtb em células THP-1 foi observada com meios condicionados e exigiu fator(es) não proteico(s) presente(s) no soro fetal bovino. A inibição de RAR usando BMS493, um agonista inverso, em um modelo de tuberculose (TB) murina 'high-dose' reduziu a carga bacteriana e aumentou significativamente os macrófagos alveolares CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> nos pulmões. Esses resultados sugerem que o eixo de ativação do RAR endógeno contribui para a infecção por Mtb tanto *in vitro* quanto *in vivo* e sugerem os receptores RAR como um potencial alvo terapêutico do hospedeiro para melhorar o desfecho da TB pulmonar.

**Palavras-chave:** Ácido retinoico; *Mycobacterium tuberculosis*; macrófagos.

## ABSTRACT

### **Study of the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and host retinoic acid receptors during *in vitro* and *in vivo* infection**

Retinoic acid (RA) is an important vitamin A metabolite involved in regulating immune responses through the nuclear retinoic acid receptor (RAR) and retinoid x receptor (RXR). While performing experiments using THP-1 cells as a model for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection, we observed that serum-supplemented cultures had RAR activity in the presence of live but not heat-killed bacteria, suggesting that Mtb engages the endogenous RAR pathway. Since the role of endogenous RAR activity in Mtb infection has not been explored, we studied the endogenous RAR pathway during Mtb infection both *in vitro* and *in vivo* through pharmacological inhibition of RAR receptors. We found that Mtb induces classical retinoic acid response element (RARE) genes such as CD38, DHRS3, and RARG in both THP-1 cells and human primary CD14<sup>+</sup> monocytes via the RAR-dependent pathway. Mtb-stimulated RAR activity in THP-1 cells was observed with conditioned media and required non-proteinaceous factor(s) present in fetal bovine serum. Importantly, RAR inhibition using BMS493, an inverse agonist, in a high-dose murine model of tuberculosis (TB) reduced Mtb burden and significantly increased CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> alveolar macrophages in the lungs. These results suggest that the endogenous RAR activation axis contributes to Mtb infection both *in vitro* and *in vivo* and suggest RAR receptors as a potential host therapeutic target to improve the outcome of pulmonary TB.

**Keywords:** Retinoic acid; *Mycobacterium tuberculosis*; macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1: Formação do granuloma durante infecção pelo Mtb nos pulmões. ....	18
Figura 2. Relação hipotética entre a progressão da doença e os níveis de retinol durante a progressão da tuberculose.....	23
Figura 3: Metabolismo da vitamina A em células humanas.....	25
Figura 4: Regulação da expressão de genes RAREs por ácido retinoico.....	26

### MANUSCRITO

Figure 1: Increased baseline levels of RAR-mediated CD38 expression in fetal bovine serum-supplemented THP-1 cell cultures.....	57
Figure 2: Mtb activates endogenous RA/RAR pathway in primary human monocytes and THP-1 cells <i>in vitro</i> .....	58
Figure 3: Conditioned medium (CM) from Mtb culture activates RAR-dependent CD38 expression in THP-1 cells.....	59
Figure 4: Flow Self-Organizing Map (FlowSOM) analyses cellular content lungs from BMS493-treated Mtb-infected mice .....	60
Figure 5: Flow cytometry tSNE analysis identifies CD64 <sup>+</sup> CD11c <sup>high</sup> CD68 <sup>+</sup> Alveolar macrophages as the most significant leukocytes in the lungs of BMS493-treated infected mice.....	61
Figure 6: Proposed model for endogenous RAR activation by Mtb.....	62
Supplemental Figure 1. ....	63
Supplemental Figure 2. ....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADHs	Álcool Desidrogenases
ALDHs	Aldeído Desidrogenases
AP-1	Proteína Ativadora 1
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
cGAS	E <i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i>
CLRs	<i>C-Type Lectin Receptors</i>
CRBP	<i>Cellular Retinol-Binding Protein</i>
ERO	Espécies Reativas De Oxigênio
FBS	Soro Fetal Bovino
HAT	Histona Acetiltransferase
HDACs	Histonas Deacetilases
HDTs	Terapias Direcionadas Ao Hospedeiro
IFN	Interferon
IGRA	<i>Interferon Gamma Release Assay</i>
IL	Interleucina
ILCs	Células Linfoides Inatas
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase Induzida
LBD	Domínios De Ligação Ao Ligante
LRP1	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1</i>
MAs	Macrófagos Alveolares
MI	Macrófagos Intersticiais Derivados De Monócitos
MOI	Multiplicidade De Infecção
Mtb	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
N-CoR	Proteínas Co Repressoras
NF- κB	Nuclear Factor Kb
NFAT	Fator Nuclear De Células T Ativadas
NLRs	<i>Nucleotide-Binding Domain And Leucine Rich Repeat-Containing Receptors,</i>
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PPD	Prova Tuberculina
PRRs	Receptores De Reconhecimento De Padrões
RA	Ácido Retinoico

RAR	Receptores Nucleares De Ácido Retinoico (RAR)
RARE	Genes Regulados Por Ácido Retinoico
RBP	Proteína Transportadora De Retinol
RDHs	Retinol Desidrogenases
RXR	Receptores X Retinoides
scRNA- seq	<i>Single Cell RNA-Seq Analysis</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator for Retinoid And Thyroid Hormone Receptors</i>
SNPs	<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
STRA6	<i>Signaling Receptor and Transporter Of Retinol 6</i>
TB	Tuberculose
TLRs	<i>Toll-Like Receptores</i>
TNF	Tumor Necrose Factor
VAD	Deficiência De Vitamina A
APCs	Células Apresentadoras De Antígenos
Treg	Células T Reguladoras



**Nota:** Seguindo o artigo 71, do regimento deste curso de pós-graduação, o corpo principal desta tese inclui uma introdução redigida em língua portuguesa, artigos gerados redigidos em inglês e discussão e conclusão redigidas em língua portuguesa. Publicações originadas de projetos paralelos foram restritos ao anexo.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	TUBERCULOSE .....	15
1.2	A RESPOSTA IMUNE AO MTB .....	16
1.3	RESPOSTA IMUNE INICIAL DURANTE A INFECÇÃO PELO MTB .....	18
1.4	O PAPEL DE MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO .....	20
1.5	DEFICIENCIA DE VITAMINA A EM DOENÇAS INFECCIOSAS .....	22
1.6	METABOLISMO DA VITAMINA A E REGULAÇÃO GÊNICA .....	24
1.7	ÁCIDO RETINOICO E SINALIZAÇÃO RAR NO SISTEMA IMUNOLÓGICO	28
1.8	VITAMINA A E MTB .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>32</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	<b>33</b>
	ABSTRACT .....	34
	INTRODUCTION .....	35
	MATERIALS AND METHODS .....	36
	RESULTS .....	41
	DISCUSSION .....	46
	ACKNOWLEDGMENTS .....	49
	REFERENCES .....	50
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>86</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TUBERCULOSE

A Tuberculose (TB) humana é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (FOGEL, 2015). Esta é uma das doenças infecciosas humana mais antigas, possivelmente originada cerca de 150 milhões de anos atrás (MORSE; BROTHWELL; UCKO, 1964). Em 1882, Robert Koch foi o pesquisador responsável pela descoberta do patógeno causador da TB, que é o Mtb (KOCH, 1982).

Estima-se mundialmente que cerca de 2 bilhões de pessoas estejam infectadas com Mtb. Até a epidemia causada pelo coronavírus, TB foi a principal doença causadora de mortalidade por um único agente infeccioso (WHO, 2021). Entre 2019 e 2020, este patógeno foi responsável por 5.8 milhões de novos casos mundialmente, no entanto, acredita-se que este número não reflita o real número de pessoas recém-diagnosticadas devido às interrupções causadas pela pandemia COVID-19 (WHO, 2021).

A manifestação clínica da infecção por Mtb varia de assintomática (tuberculose latente ou ILTB) a tosse, febre, suores noturnos, perda de apetite e perda de peso (tuberculose ativa). (BARRY et al., 2009). Apesar da existência de uma ampla gama de sintomas clínicos, a maioria das pessoas infectadas controlarão a doença por anos ou até décadas sem manifestar sinais da doença (BARRY et al., 2009). Por outro lado, a reativação da TB pode acontecer em 5 a 10% dos indivíduos com TB latente. Somando a isso, pacientes imunocomprometidos infectados com HIV ou sob tratamentos com imunossupressores são mais susceptíveis à infecção e reativação da doença (BARRY et al., 2009; KEANE et al., 2001a).

As ferramentas de diagnóstico para detecção da infecção pelo Mtb dependem do suspeito estado clínico (doença pulmonar ativa ou latente) e das ferramentas de detecção. A infecção latente é atualmente diagnosticada pela prova tuberculínica, também conhecido como PPD, ou testes imunológicos para detecção de interferon IGRA (*interferon gamma release assay*) que consiste na exposição de células imunes do sangue à antígenos do Mtb (BRASIL, 2011a; PAI et al., 2016; WILDNER et al., 2011). Ambas as técnicas são limitadas devido a inabilidade de distinguir entre tuberculose ativa ou infecção prévia, e o teste PPD pode resultar em falsos-positivos em casos de exposição prévia a microbactérias não tuberculosas (HIZEL et al., 2004). Já a detecção da tuberculose pulmonar ativa é realizada através da análise do esfregaço e cultura de uma amostra de escarro do indivíduo (coloração de BAAR), radiografia

do tórax, ou técnicas mais avançadas como XpertMTB/RIF ou TB-LAMP *assays* (HARRIES; KUMAR, 2018; PAI et al., 2016).

Após o diagnóstico, o tratamento da tuberculose pulmonar preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) consiste na utilização de doses fixas combinadas dos fármacos antiTB (RHZE): Rifampicina (R), Etambutol (E), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) nas seguintes dosagens: R 150 mg, H 75mg, Z 400 mg e E 275 mg tomados diariamente por 2 meses, seguido de um regime adicional de 4 meses composto apenas por Rifampicina e Isoniazida (BRASIL, 2011b; WHO, 2010). Apesar da existência de antibióticos e vacina (BCG), há uma crescente prevalência de cepas Mtb resistentes a medicamentos antimicobacterianos (SINGH et al., 2020). Portanto, terapias direcionadas ao hospedeiro tornaram-se vantajosas como adjuvantes no regime de tratamento da TB pois ajudam a encurtar o regime de quimioterapia, aumentando assim a adesão ao tratamento farmacológico, e reduzem a probabilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana (LEOPOLD WAGER; ARNETT; SCHLESINGER, 2019; PALUCCI; DELOGU, 2018; YOUNG; WALZL; DU PLESSIS, 2020).

## 1.2 A RESPOSTA IMUNE AO MTB

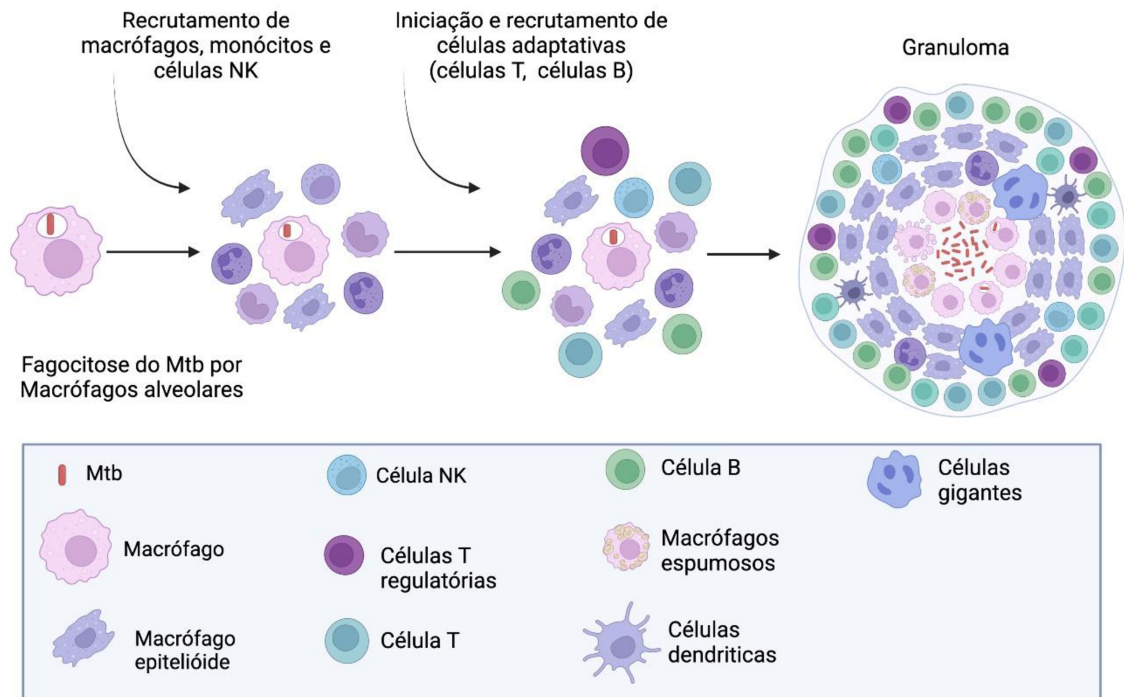
TB é primariamente uma doença pulmonar, embora possa acometer outros locais do corpo (HOUDA BEN et al., 2018). A TB pulmonar é responsável pela maioria dos casos e pela transmissão que ocorre através da tosse, fala ou espirro, resultando na formação dos aerossóis menores que 5 µm de diâmetro contendo o Mtb que podem ser inalados e transportados para o espaço alveolar do recipiente (RILEY, 2001; RILEY et al., 1962; WELLS; RATCLIFFE; CRUMB, 1948). Nos alvéolos, os bacilos são fagocitados principalmente por macrófagos alveolares (MAs) (CAMBIER; FALKOW; RAMAKRISHNAN, 2014). Estes, por sua vez, são componentes cruciais da resposta imune do hospedeiro pois atuam como sentinelas do sistema imunológico no pulmão. No entanto, durante os momentos iniciais da doença, esses macrófagos não conseguem controlar a infecção, e essa falha é evidenciada pela capacidade de até mesmo um único bacilo estabelecer uma infecção produtiva (DONALD et al., 2018). Uma vez estabelecida, a infecção pelo Mtb pode prosseguir de diferentes maneiras: I) progressão imediata da doença (TB primária). II.) estabelecimento da infecção latente (TB latente). III.) reativação da forma latente (TB pós-primária). IV) eliminação pelo sistema imunológico (BEHR; EDELSTEIN; RAMAKRISHNAN, 2018).

A infecção primária é um fator importante da carga global da TB, ao passo que a infecção latente pode persistir por anos ou até mesmo décadas antes do potencial início da doença (BEHR; EDELSTEIN; RAMAKRISHNAN, 2018). A eliminação do patógeno pelo sistema imune é difícil de ser determinada. No entanto, certos indivíduos com alta exposição ao Mtb nunca convertem em PPD-positivo, muitos supõem que isso seja um sinal de eliminação pelo sistema imunológico antes do início da imunidade adaptativa, uma vez que células T são responsáveis pela reação PPD. Além disso, a eliminação do bacilo ocorre pelo menos a nível local. Experimentos utilizando primatas não humanos mostraram que lesões individuais contendo Mtb, uma vez estabelecidas, podem ser resolvidas e esterilizadas pelo sistema imune (LIN et al., 2014).

Independente do mecanismo de progressão da infecção inicial, infecção primária, pós-primária, latente ou eliminação do patógeno, existirá o envolvimento da resposta imune adaptativa. O Granuloma (Fig. 1), é uma barreira física composta por um repertório de células imunes (principalmente células T e B) que se forma ao redor dos bacilos para conter a infecção e prevenir a disseminação (RAMAKRISHNAN, 2012). O diagnóstico e controle bem-sucedido da infecção dependem da produção de IFN- $\gamma$  por células T em resposta a antígenos do Mtb (COOPER et al., 1993; FLYNN et al., 1993), e mesmo aquelas infecções não detectáveis pelo método IGRA ainda mostram evidências de ativação de células T (LU et al., 2019).

Por outro lado, os anticorpos também desempenham um papel importante no controle da infecção, e os anticorpos de indivíduos com infecção latente são mais eficazes do que os anticorpos de indivíduos com a doença ativa (LU et al., 2016). Essa diferença destaca um aspecto comum ainda mais importante da imunidade ao Mtb. Os anticorpos da infecção latente melhoram as respostas imunológicas de macrófagos e promovem a eliminação do Mtb (LU et al., 2016). Isso demonstra que macrófagos são muito mais do que apenas simples sentinelas do sistema imunológico, sendo os principais mediadores da resposta imune desde o encontro inicial com o bacilo até a resolução ou progressão da TB. Além disso, a maneira como o granuloma está organizado revela a importância dos macrófagos (Fig. 1), uma vez que linfócitos, os quais representam a imunidade adaptativa, encontram-se na periferia e são forçados a exercer seus efeitos sobre a bactéria através das densas camadas centrais de macrófagos que estão em contato direto com o bacilo (RAMAKRISHNAN, 2012).

Fig. 1: Formação do granuloma durante infecção pelo Mtb nos pulmões.



(Fonte: Imagem criada pela autora no BioRender).

Legenda: Macrófagos alveolares fagocitam o Mtb. Por meio da liberação de citocinas, células inatas e adaptativas são recrutadas para o local da infecção e iniciam a formação do granuloma.

### 1.3 RESPOSTA IMUNE INICIAL DURANTE A INFECÇÃO PELO MTB

A resposta imune à infecção pelo Mtb é multifacetada, incluindo respostas imunes inatas e adaptativas. A iniciação da resposta imune inata é ativada através do reconhecimento de antígenos bacterianos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos por células endoteliais, fibroblastos, células dendríticas (DCs) e macrófagos. Vários tipos de PRRs são investigados no contexto da infecção pelo Mtb, incluindo *toll-like receptores* (TLRs), *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat-containing receptors* (NLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), e *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) (KLEINNIJENHUIS et al., 2011). Estudos realizados em modelo murino mostraram que camundongos *knockouts* para ambos os genes TLR2 e TLR9 são mais susceptíveis à infecção pelo Mtb do que animais ausentes apenas para TLR2 ou TLR9 individualmente (BAFICA et al., 2005; BIYIKLI et al., 2016). Já em humanos, os polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *single-nucleotide polymorphism* SNPs) em genes TLR foram associados ao aumento no desenvolvimento da TB pulmonar

(BUKHARI et al., 2015; GRAUSTEIN et al., 2015), o que demonstra a importância dos receptores TLR no reconhecimento do Mtb.

O engajamento e sinalização via TLRs pode induzir a expressão de inúmeros genes envolvidos na produção de peptídeos antimicrobianos, intermediários reativos, citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias que auxiliam na resposta à infecção pelo bacilo da tuberculose (LASKER; NAIR, 2006; ZHANG; GHOSH, 2001). Em resposta ao reconhecimento de antígenos do Mtb por TLRs, mecanismos de controle inatos são ativados e produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), as quais possuem atividade antimicrobiana em diferentes graus (JO et al., 2007; NICHOLSON et al., 1996; SHASTRI et al., 2018). No entanto, Mtb desenvolveu mecanismos para evitar a degradação por espécies reativas de oxigênio, podendo persistir viável, apesar das tentativas de eliminação do sistema imunológico (JAMAATI et al., 2017; SHASTRI et al., 2018). Paralelamente, as células responsivas produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-1 e TNF- $\alpha$  através da sinalização via MYD88 e NF- $\kappa$ B (ZHANG; GHOSH, 2001). Durante a infecção pelo Mtb, TNF- $\alpha$  é a citocina mais estudada em modelos animais e humanos, e foi demonstrada a sua importância na fagocitose, morte da bactéria, recrutamento celular, e prevenção da reativação da TB em casos de TB latente (EHLERS, 2003; MOHAN et al., 2001; ROACH et al., 2002; SCANGA et al., 1999). Além disso, o papel do TNF na TB humana foi evidenciado em pacientes submetidos à terapia anti-TNF, os quais estão sob maior risco de reativação da doença (KEANE et al., 2001b). Embora possa ser produzida por linfócitos, células dendríticas (DCs) e macrófagos são a maior fonte produtora de TNF no contexto da infecção por Mtb (ALLIE et al., 2013; BRADBURY; MORENO, 1993; FLESCHE; KAUFMANN, 1990a).

Uma outra citocina importante, IL-1, é produzida inicialmente por células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (JAYARAMAN et al., 2013a; JUFFERMANS et al., 2000). Membros da família IL-1 incluem IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , os quais são secretados durante a infecção pelo bacilo (BOURIGAULT et al., 2013). Em modelo murino, IL-1 $\beta$  é secretada citosolicamente na pró-forma, a qual é canonicamente clivada pelo inflamassoma culminando na morte do Mtb através de apoptose celular dependente da ativação de caspase-3 e produção de TNF (JAYARAMAN et al., 2013b). Estudos realizados em camundongos revelaram que ambos interferon do tipo I e II suprimem a produção de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (MAYER-BARBER et al., 2011). Embora IL-1 seja importante em limitar a replicação e promover a eliminação do Mtb, a regulação mediada por IFN- $\gamma$  e NO (óxido nítrico) é essencial na modulação das respostas inflamatórias inatas e controle dos danos aos tecidos desencadeados por neutrófilos durante infecções persistentes

(MISHRA et al., 2013). Isso sugere que as sinalizações mediadas por citocinas exigem um equilíbrio complexo e necessário para mediar uma resposta imune protetora contra Mtb, que pode ser regulada por diversos fatores secretados pelo hospedeiro. As células que medeiam estas respostas iniciais incluem monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células linfoides inatas (do inglês *innate lymphoid cells* - ILCs), mastócitos e células endoteliais.

#### 1.4 O PAPEL DE MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO

Após a inalação do Mtb, os macrófagos alveolares (MAs) são o primeiro tipo celular a internalizar os bacilos, via fagocitose. Além disso, os MAs desempenham papel importante no controle e eliminação do Mtb (COHEN et al., 2018). Embora alguns estudos tenham definido os MAs como anti-inflamatórios, o estado de polarização e ativação dessas células depende do microambiente e fatores estimulantes (HUSSELL; BELL, 2014; MARAKALALA et al., 2018; REFAI et al., 2018).

Macrófagos expressam um amplo repertório de receptores utilizados para fagocitar o Mtb, sendo assim, são considerados um nicho celular vantajoso para o bacilo durante a infecção (GUIRADO; SCHLESINGER; KAPLAN, 2013). Após a fagocitose, Mtb é contido dentro do fagossomo, o qual acidifica e funde com lisossomos, para formar o fagolisossomo, um vacúolo de pH baixo capaz de matar a bactéria em baixa multiplicidade de infecção (do inglês *multiplicity of infection* - MOI) (SINGH et al., 2006; WELIN et al., 2011). Consequentemente, Mtb desenvolveu mecanismos para evitar a degradação e morte mediada pelos macrófagos, incluindo a inibição da formação do fagolisossomo e escape do fagossomo, os quais são mecanismos de sobrevivência do bacilo (CLEMENS; HORWITZ, 1995; EHRT; SCHNAPPINGER, 2009; TAN et al., 2006).

Estudos recentes usando *single cell RNA-seq analysis* (scRNA-seq) evidenciaram que há pelo menos nove populações distintas de macrófagos presentes nos granulomas pulmonares de primatas não-humanos infectados com Mtb (GIDEON et al., 2022). A função e capacidade protetiva dos diferentes *subsets* de macrófagos ainda não foi elucidada. Já em modelo murino, duas principais populações de macrófagos foram identificadas no pulmão de camundongos: MAs residentes de tecido e macrófagos intersticiais derivados de monócitos (MIs) (HUANG et al., 2018b). A investigação do papel dessas duas diferentes populações durante a infecção pelo Mtb *in vivo* revelou que os MAs constituem um tipo de população anti-inflamatória (tipo M2) que apresenta um ambiente favorável para replicação e disseminação bacteriana (COHEN et al., 2018; HUANG et al., 2018a; PISU et al., 2020), ao passo que MIs foram associados com



um ambiente imunológico mais estressante para a bactéria (PISU et al., 2020). A partir desse conceito, estudos posteriores foram realizados visando investigar a heterogeneidade funcional dentro dessas duas principais linhagens de macrófagos. Pisu e colaboradores (2021) por meio de experimentos envolvendo scRNA-seq de pulmão de camundongos infectados com Mtb, identificaram *subsets* de MAs que exibiram tanto um perfil restritivo quanto permissivo ao Mtb, ao passo que foram identificados três populações distintas de MIs, os quais foram divididos em inflamatórios e anti-inflamatórios (PISU et al., 2021). Sendo assim, estes estudos foram importantes para quebrar alguns paradigmas a respeito da polarização M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) de macrófagos, e de que estas células existem em um estado neutro, não programado, até que a exposição às citocinas determine seu fenótipo funcional. Por exemplo, macrófagos tem perfil M1 quando estimulados com IFN-  $\gamma$  e TNF-  $\alpha$  e perfil M2 na presença de IL-4 e IL-13 (MURRAY, 2017).

Citocinas são extremamente importantes na ativação de macrófagos, a exemplo, a citocina IFN- $\gamma$  está envolvida no controle e eliminação de Mtb em camundongos e humanos uma vez que ativa vias antimicrobianas em macrófagos infectados com a bactéria (THOMA-USZYNSKI et al., 2001a; VOGT; NATHAN, 2011). Semelhantemente, a citocina GM-CSF também está envolvida na restrição do crescimento do Mtb em macrófagos humanos e murinos (MISHRA et al., 2020; ROTHCHILD et al., 2014). Adicionalmente, a combinação de IFN-  $\gamma$  e TNF-  $\alpha$  também resulta na restrição e controle da infecção (CHAN et al., 1992; FLESCH; KAUFMANN, 1990b). Um outro tipo de sinalização que não envolve a ação de citocinas mas também pode levar a restrição da replicação do Mtb é o engajamento da via de sinalização TLR1/2, o qual foi capaz de reduzir a carga bacteriana em monócitos e macrófagos (LIU et al., 2009a; THOMA-USZYNSKI et al., 2001b). Além disso, o estímulo de monócitos e macrófagos *in vitro* com vitaminas exógenas, Vitamina D e Vitamina A, foi associado ao controle bacteriano *in vitro* (FABRI et al., 2011; LIU et al., 2009b; VERWAY et al., 2013; WHEELWRIGHT et al., 2014). Portanto, o papel de macrófagos durante a infecção tem se tornado central no desenvolvimento de terapias direcionadas ao hospedeiro (do inglês *host-directed therapy* - HDTs). A exemplo, Imatinib, um inibidor da tirosina quinase, restringe o crescimento intracelular do Mtb em macrófagos e foi inserido em ensaios clínicos como terapia adjuvante ao tratamento da TB (GIVER et al., 2019; NAPIER et al., 2011). Também foi demonstrado que altas doses de metformina, um medicamento antidiabético, reduziu a sobrevivência do Mtb em macrófagos e camundongos infectados pelo Mtb (SINGHAL et al., 2014). Sendo assim, a descoberta de novos alvos terapêuticos direcionados às respostas imunes do hospedeiro, objetivando eliminar a bactéria e reduzir os danos teciduais (O'CONNOR et al.,

2016) é de extrema importância para o desenvolvimento de terapias adjuntivas ao tratamento da TB.

## 1.5 DEFICIÊNCIA DE VITAMINA A EM DOENÇAS INFECCIOSAS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose é uma doença que está relacionada a extrema pobreza e que ocorre principalmente em países de baixa e média renda (WHO, 2021). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o estado nutricional e índice de massa corporal afeta a resposta do hospedeiro ao Mtb, além disso, tabagismo, alcoolismo, infecção pelo HIV e diabetes também são fatores de risco associados ao desenvolvimento da TB (TÉLLEZ-NAVARRETE et al., 2021). A respeito do estado nutricional, sabe-se que micronutrientes são importantes para manter uma resposta imunológica protetora durante infecções. Várias HDTs promissoras incluindo vitaminas têm sido amplamente estudadas devido as suas propriedades em influenciar o metabolismo e regulação gênica (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008).

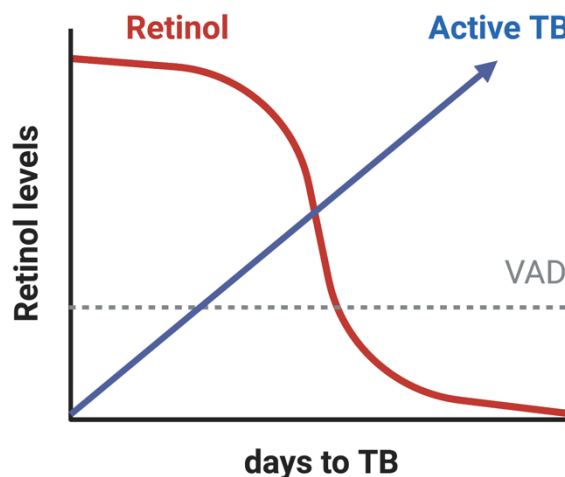
Alguns estudos, realizados em países com alta incidência de tuberculose como Coréia do Sul, Índia e Indonésia, têm demonstrado que existe uma correlação entre deficiência de vitamina A (VAD) e tuberculose (AHMAD et al., 2014; OH et al., 2017; PAKASI et al., 2010). Ao comparar os níveis de retinol, vitamina A, no soro de indivíduos com TB ativa e contatos domésticos saudáveis (*TB contacts*), evidenciou-se que os níveis séricos de retinol estão reduzidos apenas em indivíduos com TB ativa, mas não em contatos domésticos saudáveis (KIM et al., 2019). Dados semelhantes foram reportados em pacientes com doença pulmonar micobacteriana não-tuberculosa (OH et al., 2019). No entanto, a suplementação com a vitamina A não foi capaz de melhorar os sintomas ou recuperar os níveis séricos de retinol (LAWSON et al., 2010a; VISSER et al., 2011), evidenciando a complexidade do metabolismo da vitamina A *in vivo* e a importância do retinol na patogênese da tuberculose.

Por outro lado, redução nos níveis plasmáticos de vitamina A também ocorre em pacientes com outras doenças infecciosas (CHAU et al., 2000). A Deficiência de vitamina A ou hipovitaminose A foram associadas a diversos tipos de infecções como gastroenterites, otites, infecções do trato respiratório (THORNTON et al., 2014), sarampo (FRIEDEN et al., 1992), giardíase, ascaridíase e outras infecções causadas por helmintos (AL-MEKHLAFI et al., 2010; DE GIER et al., 2014; SUCHDEV et al., 2014). No entanto, se tal deficiência é causa ou efeito da infecção (ou ambos) ainda não está totalmente esclarecido.

Alguns fatores podem contribuir para o fenótipo da hipovitaminose A, como por exemplo: **(1)** perda de apetite e má nutrição, sendo que em países subdesenvolvidos, a redução do consumo de alimentos ricos em vitamina A pode impactar os níveis séricos de retinol; **(2)** pobre absorção intestinal; **(3)** perda de retinol pela urina durante infecção aguda; e **(4)** redução da expressão de proteínas transportadoras de retinol como proteínas ligadoras de retinol (do inglês *retinol binding protein* – RBP) e albumina por células hepáticas, em resposta ao processo inflamatório (LARSON et al., 2017; PAKASI et al., 2009; SCHORAH; LOUW; LABADARIOS, 1993).

Como citado anteriormente, existe uma associação entre a tuberculose e hipovitaminose A, sendo que, a deficiência de vitamina A está associada ao aumento no risco de diversas doenças respiratórias, incluindo tuberculose ativa em adultos. No entanto, o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não está totalmente esclarecido. Nesse sentido, várias questões são levantadas, como: **(1)** o que acontece com os níveis de vitamina A ao longo da progressão da doença? **(2)** células do sistema imune utilizam a via endógena da vitamina A durante a infecção? **(3)** a ativação excessiva desta via contribui para depleção de vitamina A do hospedeiro? **(4)** Mtb consome vitamina A do hospedeiro? O esclarecimento dessas perguntas contribuirá para a melhor compreensão da relação entre deficiência de vitamina A e severidade da TB (Fig. 2).

Fig. 2. Relação hipotética entre os níveis de retinol e a progressão da tuberculose



(Fonte: a autora, criado no BioRender)

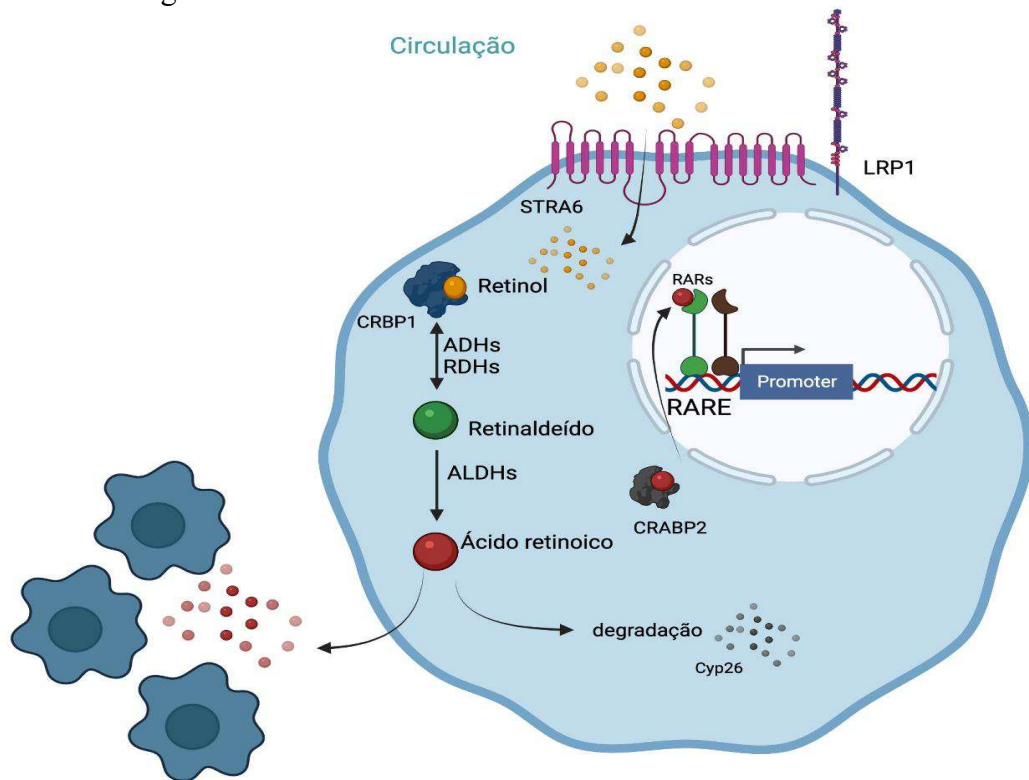
Legenda: Postula-se que há correlação inversa entre a progressão da tuberculose e os níveis séricos de retinol.

## 1.6 METABOLISMO DA VITAMINA A E REGULAÇÃO GÊNICA

A vitamina A (retinol) é adquirida por meio da dieta de precursores ésteres de retinol ou carotenoides em fontes de origem vegetal e animal. Após absorção, estes precursores são convertidos a retinoides por enterócitos, localizados no lúmen da porção proximal do intestino. A partir de então os retinoides são incorporados em quilomícrons e liberados na circulação (MARILL et al., 2003; MCKENNA, 2012; RHINN; DOLLÉ, 2012). Em seguida, essas moléculas são armazenadas no fígado sob a forma de retinol. Quando requerido pelos tecidos, o retinol é liberado na circulação associado à proteínas de transporte como a proteína transportadora de retinol (do inglês *retinol binding protein* - RBP) (KANAI; RAZ; GOODMAN, 1968), proteína amilóide sérica A (BANG et al., 2021; DEREBE et al., 2014; HU et al., 2019), e albumina (BELATIK et al., 2012).

A entrega do retinol às células de diferentes tecidos é mediada por receptores STRA6 (do inglês *signaling receptor and transporter of retinol 6*) (SUN; KAWAGUCHI, 2011), e especificamente em células imunes de origem mielóide a entrega é mediada pelo receptor LRP1 (do inglês *low density lipoprotein receptor-related protein 1*) (BANG et al., 2021). No ambiente intracelular, o retinol é oxidado a retinaldeído por retinol desidrogenases (RDHs) e álcool desidrogenases (ADHs) e posteriormente é oxidado a ácido retinoico (RA) por meio de enzimas aldeído desidrogenases (ALDH1, ALDH2, ALDH3) de maneira irreversível (JACKSON et al., 2011; METZLER; SANDELL, 2016). Ainda no citoplasma, proteínas intracelulares são requeridas para o transporte do retinol e seus metabólitos. A proteína CRBP1 (do inglês *celular retinol-binding protein 1*) é responsável pelo transporte do retinol (NAPOLI, 2017; ONG; CHYTIL, 1975a), ao passo que CRABP1 e CRABP2 são responsáveis pelo transporte do ácido retinoico (RA) (NAPOLI, 2017; ONG; CHYTIL, 1975b). RA é a forma ativa da vitamina A e existe sob forma de all-*trans*-RA ou 9-*cis*-RA, estes se ligam a receptores nucleares RAR ou RXR e ativam a expressão de genes regulados por ácido retinoico (do inglês *retinoic acid response elemento* - RAREs) (Fig. 3) (ALBALAT, 2009; HANDBERG-THORSAGER et al., 2018; MARILL et al., 2003; RASTINEJAD et al., 2000).

Fig. 3: O Metabolismo da vitamina A em células humanas.



(Fonte: a autora, criado no BioRender)

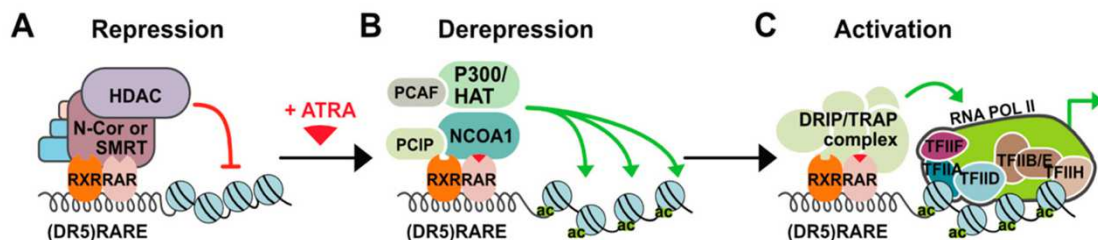
Legenda: O Retinol (círculo amarelo) na corrente sanguínea é entregue ao citoplasma por meio de receptores STRA6 ou LRP1. No citoplasma o retinol ligado a CRBP1 é convertido a retinaldeído por meio de enzimas ADHs e RDHs formando o retinaldeído. Em seguida, este é convertido em ácido retinoico (RA) através de uma reação irreversível catalisada por enzimas ALDHs. RA é entregue ao núcleo onde se liga a receptores RAR em uma região genômica RARE e regula a expressão de genes induzidos por RA; RA pode ser liberado e atuar em células vizinhas (ação parácrina), ou pode ser degradado por enzimas da família CYP26.

Receptores de ácido retinoico (RAR) e receptores x retinoides (RXR) medeiam os efeitos genômicos do RA. Estes são considerados fatores de transcrição dependentes de ligantes (WATSON; FAIRALL; SCHWABE, 2012). Cada receptor possui três isoformas RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  (*NR1B1*, *NR1B2*, *NR1B3*), RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  e RXR $\gamma$  (*NR2B1*, *NR2B2*, *NR2B3*) codificado por genes independentes (BASTIEN; ROCHETTE-EGLY, 2004).

Os receptores RAR formam heterodímeros com RXRs e estão ligados constitutivamente a regiões genômicas RAREs, (*retinoic acid elemento response*) que são regiões no DNA que contêm repetições hexaméricas (A/G)G(G/T)TCA podendo estar separadas por 1 a 12 nucleotídeos (DR1 a DR12)(BASTIEN; ROCHETTE-EGLY, 2004). Em vertebrados, o ligante natural de RAR é o *all-trans*-ácido retinoico (atRA), enquanto *9-cis*-ácido retinoico tem alta afinidade por RAR e RXR (BASTIEN; ROCHETTE-EGLY, 2004; SZYMAŃSKI et al., 2020). Na ausência de RA, RAR reprime a expressão gênica através do recrutamento de histonas deacetilases (HDACs) e proteínas co repressoras (N-CoR) ou SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*). HDACs atua na remoção do grupo acetil de histonas

resultando na condensação da cromatina que impede a ligação de outros complexos proteicos importantes na iniciação da transcrição, resultando no silenciamento da expressão gênica. Na presença de RA, alterações conformacionais são induzidas nos receptores RAR resultando na dissociação dos complexos correpressores e recrutamento de complexos ativadores com atividade de histona acetiltransferase (HAT) (ex: P300 e NCOA1) que resulta na abertura a cromatina e ativação da expressão gênica (Fig. 4) (BASTIEN; ROCHETTE-EGLY, 2004; WATSON; FAIRALL; SCHWABE, 2012). A ligação do heterodímero RAR/RXR aos RAREs é considerada a via clássica do ácido retinoico.

Fig. 4: Regulação da expressão de genes RAREs por ácido retinoico.



(Fonte: SZYMAŃSKI et al., 2020).

Legenda: (A) Repressão da expressão gênica na ausência de RA. Receptores RAR/RXR heterodimerizados encontram-se ligados a regiões RAREs associados a complexos correpressores que condensam a cromatina e reprimem a transcrição gênica. (B-C) Desrepressão e ativação na presença de RA. RA liga-se ao domínio de ligação ao ligante no receptor RAR e induz alterações conformacionais no RAR que resulta na liberação dos complexos correpressores e recrutamento de complexos coativadores que acetilam as histonas promovendo a abertura da cromatina e consequentemente início da transcrição gênica.

Esta via pode ser modulada farmacologicamente em vários níveis: **(1)** modulação da produção de RA por meio da inibição de enzimas ALDHs e **(2)** modulação dos receptores RAR. Enzimas ALDHs produtoras de RA podem ser inibidas por dissulfiram e DEAB (*N,N*-diethylaminobenzaldehyde) (MORGAN et al., 2015; PETERSEN, 1992). O dissulfiram é um inibidor irreversível enquanto o DEAB é um inibidor competitivo de enzimas ALDHs e foi desenvolvido para substituir inibidores mais tóxicos como dissulfiram (RUSSO; HAUGUITZ; HILTON, 1988).

Já para a modulação farmacológica dos receptores RAR, o BMS493, um pan-RAR-agonista inverso tem sido bastante utilizado *in vivo* e *in vitro* para inibir a sinalização das três isoformas dos receptores RAR (FARINELLO et al., 2018; GOVERSE et al., 2016; LE MAIRE et al., 2010; LENTI et al., 2016; POLLOCK et al., 2018; ROCHETTE-EGLY; GERMAIN, 2009; TELIAS et al., 2019; WANG et al., 2017). O mecanismo de ação do BMS493 baseia-se

na ligação deste composto aos domínios de ligação ao ligante (LBD) aumentando a interação com complexos NCoR que resulta na repressão da transcrição de genes RAREs (MAIRE et al., 2019).

Em relação a vias não-canônica de regulação, já foi demonstrado que o RA ligado aos dímeros RAR/RXR podem controlar a atividade do fator de transcrição independentes de RA, como AP-1 (proteína ativadora 1). Ambos RAR/RXR heterodímeros ou homodímeros podem bloquear a ligação de AP-1 ao DNA. O controle da ativação de AP-1 por RARs podem ter consequências significativas para as células e pode estar envolvido nos efeitos anti-inflamatórios dos retinoides (KARAMOUZIS; PAPAVALASSILOU, 2005; SCHÜLE et al., 1991). Um outro exemplo é o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), ambos mRNA e expressão proteicas de várias isoformas de NFAT são drasticamente reduzidas sob condições de deficiência de vitamina A, sugerindo que RA e seus receptores podem regular a expressão de NFAT (MARUYA et al., 2011). Em contrapartida, NFAT também pode influenciar a atividade de RAR, por exemplo, em células T, NFATc2 coopera com RAR $\alpha$ /RXR para induzir expressão de genes alvos do RA como CCR9, enquanto NFATc1 inibe esta indução (OHOKA et al., 2011). A atividade inflamatória associada ao fator de transcrição NF- $\kappa$ B pode ser inibido por RA (AUSTENAA et al., 2004), conseqüentemente a ativação de NF- $\kappa$ B e respostas inflamatórias mediadas induzidas por LPS são mais proeminentes sob condições de deficiência de vitamina A (AUSTENAA et al., 2009).

Além disso, estes receptores estão envolvidos em funções extranucleares, a exemplo, o transportador STRA6 atua como receptor de citocinas e ativa a cascata de sinalização JAK/STAT em resposta ao complexo RBP-TTR-Retinol (BERRY et al., 2012). Já o receptor RAR $\alpha$  pode interagir com o RNA mensageiro no citoplasma e suprimir a tradução em células neuronais (CHEN; ONISKO; NAPOLI, 2008). O receptor RAR $\gamma$  é liberado do núcleo para orquestrar a formação dos complexos de morte citosólicos em resposta ao TNF e outros indutores de morte (XU et al., 2017). Dependendo do tipo celular, o RA e os RARs estão envolvidos em diferentes vias de sinalização como por exemplo PI3K e MAPK (AL TANOURY; PISKUNOV; ROCHETTE-EGLY, 2013; BHASKAR et al., 2015; CHEN; ONISKO; NAPOLI, 2008; COPPA et al., 2012; LU et al., 2008). Em suma, a habilidade desses receptores em participar da regulação gênica e das cascatas de sinalização extranucleares, ativando ou regulando negativamente essas vias, adicionam uma camada de complexidade aos efeitos RA e seus receptores. Ademais, o fato de o ácido retinoico sinalizar diretamente os receptores nucleares fornece ao sistema imune a capacidade de ajustar rapidamente uma resposta imunológica, por outro lado, esta via pode ser explorada por patógenos como uma

estratégia vantajosa controlar a resposta imunológica durante o processo infeccioso (BOUETIER et al., 2016; LARANGE; CHEROUTRE, 2016).

### 1.7 ÁCIDO RETINOICO E SINALIZAÇÃO RAR NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Dentre as células do sistema imunológico, células estreladas hepáticas armazenam a maior parte de vitamina A no corpo, e expressam constitutivamente ALDHs, indicando que produzem RA, no entanto, estas células não são apresentadoras de antígenos (APCs) e atuam apenas como *bystanders* capazes de influenciar a resposta imune de forma dependente de RA (ICHIKAWA et al., 2011; LEE; JEONG, 2012). Células dendríticas (DCs) CD103<sup>+</sup> da lâmina própria do intestino são uma segunda fonte importante de RA para o sistema imune. Estas células expressam ALDH2 induzidas por GM-CSF e RA, sendo o RA produzido por células estromais podoplanina<sup>+</sup>, cuja expressão de ALDHs é independente de RA, mas dependente de estímulos microbianos (HAMMERSCHMIDT et al., 2008; ICHIKAWA et al., 2011; JAENSSON-GYLLENBÄCK et al., 2011; VICENTE-SUAREZ et al., 2014). A produção de RA por DCs da mucosa é também induzida por estímulo microbianos ativados por ligantes do TLR2 (MANICASSAMY et al., 2009). Macrófagos da lâmina constitutivamente expressam ALDHs e produzem RA em resposta a GM-CSF, IL-4 e microrganismos (BROADHURST et al., 2012; MORTHA et al., 2014).

O sistema imune é fortemente influenciado pelos efeitos da vitamina A, isso é evidenciado no desenvolvimento de tecidos linfoides primários e secundários (GHYSELINCK et al., 2002; VAN DE PAVERT et al., 2014). No epitélio intestinal, RA e RARs são importantes reguladores da homeostase de células epiteliais, sendo células mesenquimais tímicas importantes fonte produtora de RA durante a embriogênese (SITNIK et al., 2012). RA influencia a maturação e a função de apresentação de antígenos de DCs e sua capacidade em primar células T tanto para forma tolerogênica quanto inflamatória. Em homeostase, RA suprime a produção de citocinas inflamatórias, ao passo que os antagonistas de RAR reduzem a expressão de TGF- $\beta$  e IL-10 e aumentam IL-12 em resposta ao estímulo de TLRs (BROADHURST et al., 2012; COOMBES et al., 2007; HALL et al., 2011). RA também medeia efeitos pró-inflamatórios em DCs (GEISSMANN et al., 2003).

Em macrófagos, RA pode exibir efeitos anti ou pró-inflamatórios. Em células estimuladas com LPS, o RA reduz a produção de IL-12, TNF- $\alpha$ , e óxido nítrico, PGE2, e COX2, enquanto aumenta a produção de IL-10 (KIM; KANG; LEE, 2004; MEHTA et al., 1994; NA et al., 1999; WANG; ALLEN; BALLOW, 2007). RA também pode cooperar com o GM-CSF



para promover a função de apresentação de antígeno de macrófagos, levando à formação de células T reguladoras induzidas (Treg) e tolerância imunológica (MORTHA et al., 2014).

Os efeitos da sinalização RA/RAR em células T dependem do contexto, da expressão específica de isoformas dos receptores, e das citocinas envolvidas no ambiente. Células T não produzem RA, mas expressam constitutivamente RAR $\alpha$  e  $\gamma$ . *In vitro*, RA induz a expressão de moléculas de direcionamento ao intestino em células T ativadas do baço,  $\alpha_4\beta_7$  e CCR9, além de influenciar a migração de células T ativadas para a periferia durante processos inflamatórios (IWATA et al., 2004). RA e RAR $\alpha$  promovem a diferenciação de células T regulatórias (Tregs), enquanto isso suprime a diferenciação de células Th17 (MUCIDA et al., 2007). RA em baixas concentrações é essencial para uma diferenciação funcional de células T efectoras, a diferenciação de células T CD4 efectoras também é defeituosa em camundongos VAD ou camundongos deficientes para RAR $\alpha$  (HALL et al., 2011). A sinalização RA/RAR em células T é dose dependente. A concentração de RA disponível é um fator crítico para seus efeitos pró ou anti-inflamatórios em células T. Enquanto 10 nM reprime a diferenciação celular Th17 e aumenta a diferenciação de Treg *in vitro*, 1 nM aumenta a diferenciação de células Th17 com pouco efeito na geração de Treg (TAKAHASHI et al., 2012). No entanto, dado que a sinalização RAR é criticamente dose-dependente, outro mecanismo que provavelmente contribui para os efeitos pleiotrópicos e às vezes paradoxais da sinalização RA/RAR é o catabolismo de RA mediado por membros da família CYP26 de citocromo P450 oxidases. Nesse sentido, foi demonstrado que camundongos com deleção condicional de Cyp26b1 em células T exibem desenvolvimento linfóide normal, mas suas células T mostram uma sensibilidade aumentada aos níveis séricos de RA e uma polarização aumentada para células Tregs ou Th17 *in vitro* (CHENERY et al., 2013). RA também influencia direta ou indiretamente o *homing*, proliferação, diferenciação e função de vários linfócitos inatos, incluindo ILCs, TCR $\gamma\delta$ s e células NKT, bem como células NK (KIM; TAPAROWSKY; KIM, 2015; MCCARTHY et al., 2013; RUITER; PATIL; SHREFFLER, 2015).

Em suma, os efeitos do RA e sinalização RAR nem sempre são previsíveis, e depende da concentração, da isoforma dos receptores, do tipo celular, e das condições experimentais ou ambientais. Sendo assim, os resultados podem ser bem diferentes e às vezes paradoxal, suprimindo o desenvolvimento de um tipo de célula, mas promovendo ao mesmo tempo o desenvolvimento de outro tipo, ou conduzindo efeitos imunossupressores em algumas situações, mas promovendo respostas inflamatórias em outro contexto. RA e RARs funcionam como controladores-chave, capazes de detectar pistas ambientais e conectá-las a cascatas de

sinalização que levam a redes de expressão gênica que, em última análise, controlam o resultado da resposta imune.

## 1.8 VITAMINA A E MTB

Alguns, mas nem todos os estudos sugerem que a vitamina A exógena pode controlar a replicação do Mtb *in vitro* e *in vivo* (ABD-NIKFARJAM et al., 2018; BABUNOVIC et al., 2022; COLEMAN et al., 2018; JACOBO-DELGADO et al., 2021; KIM et al., 2019; O'CONNOR et al., 2019; WHEELWRIGHT et al., 2014). A maioria desses trabalhos concentrou-se no potencial terapêutico do ácido retinoico e empregaram concentrações supra fisiológicas para ensaios de *killing in vitro*. No entanto, sabe-se que a exposição direta do Mtb ao RA exógeno não afeta a viabilidade da bactéria (BABUNOVIC et al., 2022; COLEMAN et al., 2018), mas ativa mecanismos antimicrobianos no hospedeiro. O RA exógeno promove autofagia em macrófagos humanos infectados com Mtb, o que resulta em maior eliminação da carga bacteriana (COLEMAN et al., 2018). Também induz o efluxo de colesterol em macrófagos, o que contribui para redução da sobrevivência intracelular do Mtb (WHEELWRIGHT et al., 2014). Adicionalmente, reduz a expressão de receptores de transferrina, levando à redução de ferro no fagossomo. O ferro é importante pois favorece o crescimento da bactéria (ITURRALDE et al., 1992; JOHNSON et al., 2010). Vale ressaltar que estes trabalhos abordam apenas a função que o RA exógeno exerce sobre a ativação destas células *in vitro* concentrando-se apenas no potencial terapêutico. Até o momento, são escassos os estudos que investigam a função endógena desta via durante a infecção em modelos animais (TRASINO et al., 2020) ou em humanos.

No cenário clínico, vários ensaios clínicos avaliaram uma ampla gama de doses orais de suplementação de retinol (5.000 UI por dia - 200.000 UI/dose única) como terapia adjuvante. Esses ensaios foram realizados no México (ARMIJOS et al., 2010), Nigéria (LAWSON et al., 2010b), Indonésia (KARYADI et al., 2002; PAKASI et al., 2010), África do sul ((HANEKOM et al., 1997; VISSER et al., 2011), Malawi (SEMBA, 1999), China (WANG et al., 2020), e Índia (GINAWI et al., 2013). Uma meta-análise descobriu, que em geral, a suplementação oral com retinol não afetou significativamente a positividade do escarro em 2 semanas, 1 mês ou 2 meses. Também não foi encontrada diferenças significativas carga bacteriana, patologia, ou mortalidade (GROBLER et al., 2016).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o papel da via endógena de ácido retinoico durante a infecção pelo Mtb *in vitro* e *in vivo* por meio da inibição

farmacológica dos receptores RAR. E têm como hipótese que *Mycobacterium tuberculosis* ativa a via RAR/RARE do hospedeiro durante a infecção e promove a replicação intracelular.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos endógenos da via do ácido retinoico durante a infecção por *Mtb in vivo* e *in vitro* por meio da inibição dos receptores ácido retinoico (RAR).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se a via endógena RAR/RARE é ativada pelo *Mtb* durante a infecção em monócitos;
- Investigar a interação entre o *Mtb* e o soro na ativação da via RAR/RARE em células hospedeiras;
- Investigar o papel dos receptores RAR na replicação do *Mtb in vitro* e *in vivo*;
- Investigar os efeitos do BMS493 no perfil fenotípico de células imunes e vias inflamatórias nos tecidos de animais infectados com *Mtb*.

### 3 MANUSCRITO

Manuscrito submetido e sob revisão na revista *Journal of Immunology*.

***Mycobacterium tuberculosis* exploits the endogenous Retinoic Acid Receptor pathway to modulate myeloid responses, both in vitro and in vivo.**

*Running title: M. tuberculosis* exploits the endogenous RAR pathway

Yonne Karoline Tenório de Menezes\*, Carolina Eto\*, Erica C. Larson†, Daniel A. B. Mendes\*, Murilo Delgobo‡, Abigail K. Gubernat†, Janelle L. Gleim†, Eduarda Laís Munari\*, Greicy Dias\*, Marick Starick\*, Fabienne Ferreira§, Daniel Santos Mansur\*, Charles A Scanga†<sup>1</sup> & André Báfica\*<sup>1</sup>.

\*Laboratory of Immunobiology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

† Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America.

‡Department of Internal Medicine I, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany.

§Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>1</sup>Corresponding authors:

Email: [andre.bafica@ufsc.br](mailto:andre.bafica@ufsc.br), [scangaca@pitt.edu](mailto:scangaca@pitt.edu)

## ABSTRACT

Retinoic acid (RA) is a fundamental vitamin A metabolite involved in regulating immune responses through the nuclear retinoic acid receptor (RAR) and retinoid x receptor (RXR). While performing experiments using THP-1 cells as a model for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection, we observed that serum-supplemented cultures displayed high levels of baseline RAR activation in the presence of live, but not heat-killed bacteria, suggesting that Mtb robustly induces the endogenous RAR pathway. Using *in vitro* and *in vivo* models, we have further explored the role of endogenous RAR activity in Mtb infection through pharmacological inhibition of RAR receptors. We found that Mtb induces classical retinoic acid response element (RARE) genes such as CD38, DHRS3, and RARG in both THP-1 cells and human primary CD14<sup>+</sup> monocytes via a RAR-dependent pathway. Mtb-stimulated RAR activation was observed with conditioned media, and required non-proteinaceous factor(s) present in fetal bovine serum. Importantly, RAR blockade by BMS493, a specific inverse pan-RAR agonist, in a high-dose murine model of tuberculosis (TB) significantly increased CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> alveolar macrophages in the lungs and marginally reduced mycobacterial burden. These results suggest that the endogenous RAR activation axis contributes to Mtb infection both *in vitro* and *in vivo* and suggest RAR receptors as a potential host therapeutic target in TB.

## INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a major infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), which spreads from person-to-person through the air by inhaling aerosol particles containing the bacteria (1). Mtb infects phagocytic cells such as monocytes and macrophages, which are crucial elements during the immune response against intracellular pathogens (2–4). Although macrophages internalize Mtb and launch a repertoire of mycobactericidal responses, Mtb possesses several immune evasion strategies (5, 6). One such strategy is the ability of Mtb to directly regulate host cell signaling pathways during infection, enabling the bacterium to modulate cellular responses at the transcriptional level (5, 7, 8).

Nuclear receptors (NRs) are a superfamily of transcription factors comprising 48 receptors in the genome of humans and 49 in that of rodents (9, 10). NRs are involved in the regulation of important processes such as homeostasis, metabolism, and transcriptional regulation (9, 11, 12). One such NR, the retinoic acid receptor (RAR), is activated by retinoic acid (RA) to regulate gene expression (13–15). Three RAR isoforms have been identified -  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  - which upon RA signaling heterodimerize with retinoid x receptors (RXR) and then bind to retinoic acid response elements (RAREs) motifs present in the cell genome (15). The binding of these RAR/RXR complexes to RAREs then induces or suppresses gene expression (16, 17). The agonist RA, derived from vitamin A (retinol), is an essential micronutrient for both vertebrates and invertebrates; however, it is not found naturally in its active form. The biosynthesis of active RA requires two enzymatic steps. First, retinol is converted to retinaldehyde by retinol dehydrogenases (DHR/RDH), and then retinaldehyde is converted to RA by aldehyde dehydrogenase enzymes. Once RA is formed, it can either enter the nucleus to regulate RAREs-controlled genes, or it can be degraded by Cyp26 enzymes. The RA pathway is highly conserved in mammals and plays an important role in embryogenesis and homeostasis (18).

Bioinformatics and molecular biology studies demonstrate that Mtb-infected macrophages display significant enrichment for transcription factors including NRs (19, 20), suggesting bacterial infection could regulate NR downstream pathways. However, the role of NRs in Mtb infection is not completely understood. Macrophages express all the enzymes and components of the RAR pathway, which could be targeted by intracellular pathogens to regulate immunity (21, 22). Several studies have investigated the effects of exogenous vitamin A supplementation in human TB and murine models of TB (23–25). For instance, while supraphysiologic doses of vitamin A and RA appear to influence Mtb growth in vitro (26–32),

it remains unclear whether the endogenous vitamin A/RAR axis plays a role during Mtb infection. Interestingly, it has been observed that Mtb express ALDH enzymes (33), raising the possibility that Mtb could metabolize vitamin A and regulate immunity during infection.

While performing experiments using different sources of human monocytes as an in vitro model to study Mtb infection, we observed that serum-supplemented cell cultures displayed high levels of baseline RAR activation. Thus, in the present study, we assessed whether the Mtb infection engages the endogenous vitamin A pathway and regulates myeloid responses. Pharmacological blockade of the RAR pathway in vitro using human cells and in vivo using a murine TB model revealed a role for endogenous activation of the RAR axis during Mtb infection. Our results suggest that Mtb activates the endogenous RAR pathway to escape myeloid-mediated mycobacterial control.

## MATERIALS AND METHODS

### **Ethics Statement**

All animal-related protocols were approved by the University of Pittsburgh's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). The IACUC approval number for this project is 21069517. All experiments using blood samples obtained from healthy volunteer donors were approved by institutional review boards of Universidade Federal de Santa Catarina and The University Hospital Prof. Polydoro Ernani de São Thiago (IRB# 89894417.8.0000.0121). Informed consent was obtained from all subjects.

### **Reagents**

BMS493(4-[(E)-2-[5,5-dimethyl-8-(2-phenylethynyl)-6H-naphthalen-2-yl]ethenyl]benzoic acid) was purchased from Tocris Biosciences (Ellisville, MO). DEAB (4-Diethylaminobenzaldehyde) and retinol were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Retinoic acid was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Proteinase K was from Ludwig Biotec (Ludwig Biotechnologia, Alvorada - RS, Brazil).



## **Mice, infection, and treatment**

Female C57BL/6J mice, aged 6-8 weeks, were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and housed in an AAALAC-approved facility at the University of Pittsburgh under specific pathogen-free conditions. *M. tuberculosis*, Erdman strain (kindly provided by Dr. J.L. Flynn, University of Pittsburgh) was used for infection. Bacteria were prepared as described previously (34). For infection, mycobacteria were suspended in PBS containing 0.05% Tween 80, and clumps were dissociated by brief sonication using a cup-horn sonicator. A total of ~600 CFU were delivered via aerosol in a nose-only inhalation system (In-Tox Products, Moriarty, NM). The infectious dose was confirmed by harvesting and homogenizing lungs of two animals one day post-infection. Mtb colonies were quantified by plating serial dilutions of tissue homogenates onto Middlebrook 7H11 (BD Biosciences, USA) agar enriched with 10% OADC (BD Biosciences) and 0.5% glycerol. Beginning one day before infection, mice were treated with 5 mg/kg of BMS493 (Tocris Bioscience) diluted in sterile PBS (PBS; Lonza BioWhittaker) three times a week for the entire study, up to 28 days post-infections. Treatment started one day before infection. Control mice were infected with Mtb identically and injected with sterile PBS on the same schedule. Both the BMS493 and PBS injections were given intraperitoneal.

## **Bacteria**

*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* (BCG), and *M. smegmatis* were maintained in biosafety containment facilities at UFSC as described elsewhere (35). Briefly, Mtb was cultured in Löwenstein-Jensen medium (Laborclin) and incubated for 21 days at 37°C. Prior to use, bacterial suspensions were prepared by disruption in PBS (Lonza) using sterile glass beads. Bacteria concentration was determined using 1 McFarland scale equivalent to 3x10<sup>8</sup> bacteria/mL and subsequently plated onto 7H10 Middlebrook agar for confirmation. *E. coli* (ATCC25922) was grown in Luria-Bertani medium for 24 h. Bacteria concentration was determined as described above.

## **Cells and Mtb infections**

PBMC from healthy donors were obtained from whole blood using Ficoll-Paque (GE Healthcare) in accordance with the manufacturer's instructions, and as previously described (7).

The THP-1 (ATCC® TIB-202TM) cell line was grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, 1.2 mM HEPES, 10% heat-inactivated FBS (Gibco) and 1 U/ml penicillin/streptomycin. For serum-free experiments, THP-1 cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 1% BSA, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, 1.2 mM HEPES, and 1 U/ml penicillin/streptomycin. Cells were tested for Mycoplasma contamination before experiments. For in vitro infections, bacteria at 1 McFarland scale were diluted in media to obtain the desired MOI. To confirm the initial bacterial input, the inoculum was plated on Middlebrook 7H10 agar (BD Biosciences) supplemented with 10% OADC and incubated at 37°C. In some experiments, Mtb H37Rv was heat-killed (HK) at 100°C for 30 minutes. At different time points post-infection, cells were harvested and centrifuged at 400 xg for 10 min at 20°C. Supernatants were collected and stored at -20°C. Cells were washed once in PBS and lysed using 0.05% Tween 80 (Vetec) in sterile saline. Cell lysates were serially diluted, plated onto Middlebrook 7H10 agar supplemented with 10% OADC and 0.5% glycerol, and incubated at 37°C for 28 days. CFU were enumerated and the results were plotted as CFU/mL.

### **Production of bacterial-conditioned medium (CM)**

A suspension of Mtb was prepared at 3x10<sup>8</sup> CFU/mL as described above. This suspension was added to RPMI medium supplemented with 20% FBS without antibiotics for 24 hours at 37°C. The culture then was centrifuged at 12,850 xg for 10 minutes at 20°C. The resulting CM was collected, transferred to a new sterile tube, filtered-sterilized using a 0.22 µm filter, and stored at -80°C until use. The effectiveness of filtration was confirmed by plating the CM onto 7H10 Middlebrook agar, incubating at 37° C for 21 days, and finding no culturable bacilli. CM from Mtb-HK, M-*bovis* BCG, *M. smegmatis*, and *E. coli* were prepared similarly. Control CM, to which bacterial suspensions were not added, were also prepared side-by-side in all experiments.

### **CM Proteinase K treatment**

CM-Mtb, CM-Mtb-HK, and control CM were treated with 50 µg/mL proteinase K for 3 hours at 37° C. The enzyme was inactivated at 95° C for 10 minutes. To confirm protein digestion, proteinase K-treated CMs were run on SDS-PAGE gels (10%) and stained with

Coomassie blue. The efficiency of protein digestion was evaluated by monitoring the density of the band corresponding to BSA protein.

### **Flow cytometry**

**In vivo studies:** After euthanasia with CO<sub>2</sub>, lungs, and spleens were sterily harvested. Single-cell suspensions were prepared from the lungs by passing them through 40 µm cell strainers. Red blood cells were lysed using RBC lysis buffer (eBioscience™) and the viable cells were then enumerated by trypan blue staining. Cells were stained with Zombie Aqua dye (BV510) (Biolegend) at 1:1000 for 15 minutes at room temperature protected from the light. Non-specific antibody binding was blocked by TruStain FcX™ CD16/CD32 (Clone 93, Biolegend). The cells were stained with different antibody panels containing the following antibodies: Anti-CD45-APC-Cy7 (Clone 30-F11, Biolegend), Anti-CD3-BV421 (Clone 17A2, Biolegend), Anti-CD4-PE-Cy7 (Clone RM4-5, Biolegend), Anti-CD8-BUV395 (Clone RPA-T8 (BD Biosciences), Anti-CD11c-PerCP (Clone N418, Biolegend), Anti-CD64-FITC (Clone: X54-5/7.1, Biolegend), Anti-CD11b-BV605 (Clone M1/70, Biolegend), Anti-CD38-AF647 (Clone 90, Biolegend), Anti-CD68-PE (Clone FA-11, Biolegend), for 30 minutes at 4°C, fixed for 20 minutes with 1% paraformaldehyde, and washed with FACS buffer. Data were acquired with a LSRII flow cytometer (Becton Dickinson) in the Unified Flow Core at the University of Pittsburgh Department of Immunology. FCS files were analyzed using FlowJo software (version 10.1). Gating strategy for lung is shown in Supplemental Fig. 2B.

**In vitro studies:** PBMCs or THP-1 cells were stained with Zombie NIR fixable viability dye (Biolegend) 15 minutes at room temperature protected from the light. Non-specific antibody binding was blocked by AB serum. The cells were stained with antibody panels containing the following antibodies: Anti-CD14-AF488 (Clone M5E2, Biolegend), Anti-CD38-APC (Clone HIT2, BD Biosciences), Anti-CD36-FITC (Clone TR9, Immunotools), Anti-CD46-FITC (Clone MEM-258, Immunotools), Anti-CD3-PE (Clone UCHT1, Biolegend), Anti-HLA-DR-PE-Cy7 (Clone L243, Biolegend), Anti-CD56-FITC (Clone NCAM16.2, BD Biosciences), Anti-CD11c-PE (Clone 3.9, Biolegend), Anti-CD19-FITC (Clone 4G7, BD Biosciences), for 30 minutes at 4°C, fixed for 20 minutes with 1% paraformaldehyde, and washed with FACS buffer. Data were acquired with a BD FACSVerser flow cytometer (Becton Dickinson) in the Laboratory of immunobiology at the University Federal of Santa Catarina Department of Microbiology, Immunology and Parasitology.

## Real-time quantitative PCR

THP-1 cell line: Total RNA was extracted from THP-1 cells exposed or not with Mtb. RNA was extracted using TRIzol reagent (Thermo) according to the manufacturer's instructions. Using 1 µg of RNA, cDNA was produced with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and 2 µL of 1:8 diluted product was used to the quantitative PCR reaction in a final volume of 10 µL using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Real time PCR was performed on ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems). The following primers were used: DHRS3\_Fwd 5'CCCCTCCACCTCTTTTACCG3', DHRS3\_Rev 5'GTGTTGGGACTTGAGGAGGG3', ALDH1A1\_Fwd 5'ATGGCATGATTCAGTGAGTG3', ALDH1A1\_Rev 5'ACATCCTCCTTATCTCCTTC3' RARG\_Fwd 5'CTGTTTCGCCGACTTGAATC3', RARG\_Rev: 5'GCTCTGTGTCTCCACCGATTG3'

Mouse: Total RNA was isolated from lungs 4 weeks post infection and real-time PCR was performed on QuantStudio 6 flex (Applied Biosystem). RNA was extracted using TRIzol reagent (Thermo) according to the manufacturer's instructions. Using 1 µg of RNA, cDNA was produced with ZymoScript RT Pre-Mix (2X) (Zymo Research) and 2 µL of 1:8 diluted product was used to the quantitative PCR reaction in a final volume of 10 µL using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). The relative level of gene expression was determined by the comparative Ct method, whereby data for each sample were normalized to GAPDH and expressed as a ratio saline/BMS493. The following primers were used:

GAPDH\_Fwd 5'ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGAA3', GAPDH\_Rev 5'GGGATAGGGCCTCTCTTGCT3', CD38\_Fwd 5'GGTCCAAGTGATGCTCAATGGG3', CD38\_Rev 5'AGCTCCTTCGATGTCGTGCATC3, CYP26B1\_Fwd 5'TGAGAGCAGCAAGGAACATGGC3', CYP26B1\_REV 5'TCAAGGATGTGCTTGCACTGGC3', STRA6\_Fwd 5'CCTGACAGGAACAGCCACTTAC3', STRA6\_Rev 5'TGCCTGTCTTCAGAGAGCACGA3', TNFa\_Fwd 5'ACTGAACTTCGGGGTGATCG3', TNFa\_Rev 5'TGATCTGAGTGTGAGGGTCTGG3', IL4\_Fwd 5'ATGGATGTGCCAAACGTCCT3', IL4\_Rev 5'AAGCACCTTGAAGCCCTAC3', CSF2\_Fwd 5'CCAGCTCTGAATCCAGCTTCTC3', CSF2\_Rev 5'TCTCTCGTTTGTCTTCCGCTGT3', CXCR2\_Fwd 5'GGTGGGGAGTTCGTGTAGAA3', CXCR2\_Rev 5'CGAGGTGCTAGGATTTGAGC3',

CCL2\_Fwd 5'ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCTC3', CCL2\_Rev  
 5'TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC3', IL12p40\_Fwd  
 5'CTCACATCTGCTGCTCCACAAG3', IL12p40\_Rev  
 5'AATTTGGTGCTTCACACTTCAGG-', NOS2\_Fwd  
 5'TGCATGGACCAGTATAAGGCAAGC3', NOS2\_Rev  
 5'GCTTCTGGTCGATGTCATGAGCAA3, ARG1\_Fwd  
 5'AGGGTCTACGTCTCGCAAGCCA3', ARG1\_Rev  
 5'AACGGCAGCATGGTATGGAGTG3', IL13\_Fwd  
 5'AACGGCAGCATGGTATGGAGTG3', IL13\_Rev  
 5'TGGGTCCTGTAGATGGCATTGC3'

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using 2-tailed t-test for comparing two variables or one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey multiple corrections tests for comparing three or more variables. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ . Graphs are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M) or as standard deviation (S.D), as noted. Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad V9, La Jolla, CA).

## RESULTS

### An in vitro system to study endogenous RAR activities using THP-1 cells

Fetal bovine serum (FBS) is the most frequently used nutritional supplement for cell culture (36). Although FBS provides optimal conditions for cell growth, it contains retinoids which may mask or modulate the effect of a test condition (37). We first investigated whether FBS activates RAR signaling responses in THP-1 cells. Cells were grown in either serum-free (1% BSA) or inactivated serum-containing (10% FBS) medium. Expression of CD38, a canonical RARE gene, was measured on live cells by flow cytometry as an indicator of RAR activation (38) (Fig. 1A) (see Supplemental Fig. 1A for gating strategy). Roughly 90% of live cells expressed high levels of surface CD38 in the presence of FBS as measured by mean fluorescence intensity (MFI) (Fig. 1B-D). In contrast, in BSA cultures, we observed lower baseline frequency of CD38<sup>+</sup> cells and CD38 expression (Fig. 1B-D). To confirm this reduced expression was due to lack of FBS factors in BSA-cultured cells, the ability of FBS to restore

CD38 expression was determined. We added increasing concentrations of FBS to THP-1 cells growing in 1% BSA and found that FBS increased CD38 expression in a dose-dependent manner, by ~2-3 fold over untreated cells (Fig. 1E), suggesting that FBS in cell culture could affect the baseline levels of RARE gene expression. In contrast, FBS did not stimulate the cell surface expression of CD46, an unrelated non-RARE gene (Supplemental Fig. 1B). Supplementation with retinol (ROL) also dose-dependently rescued CD38 expression in serum-deprived cells (Fig. 1F), indicating that cells grown in BSA can metabolize retinol to bioactive retinoic acid (RA) (see scheme in Fig. 1G). Accordingly, cells stimulated with ROL in the presence of N,N-diethylammoniumbenzaldehyde (DEAB), a selective ALDH inhibitor (39), displayed lower CD38 expression when compared to untreated cells (Supplemental Fig. 1C). As a proof of concept, serum-deprived cells treated with increasing concentrations of RA showed a robust enhancement of CD38, but not CD46 expression (Fig. 1H and Supplemental Fig. 1D). As expected, CD38 expression was abrogated when RA-treated cells were cultured in the presence of BMS493, a specific RAR inverse pan-agonist (40) (Fig. 1H). Additionally, BMS493 treatment significantly reduced the levels of ROL-induced CD38 expression (Supplemental Fig. 1C). Together, these data confirm that THP-1 cells contain the major Vitamin A/retinoid metabolism pathways sequentially involved in RARE gene transcription, which are: Vitamin A > retinol > retinoic acid > RAR activation > RARE expression. Next, we investigated the autocrine effects of FBS on the activation of RAR receptors. THP-1 cells were grown in 10% FBS media in the presence or absence of BMS493. As expected, THP-1 cells cultured in the presence of BMS493 displayed low frequency of CD38<sup>+</sup> cells and decreased level of surface CD38 expression when compared with untreated cells (Fig. 1I and J). Taken together, these results suggest that THP-1 cells cultured in FBS maintain RAR-dependent activities such as regulating RARE expression and activating endogenous RAR-dependent responses. Additionally, these data suggest that studies of retinoid metabolism in monocytes/macrophages may consider the potential effect of the FBS used as a culture media supplement.

### **Mtb activates host RAR/RAREs during infection of human monocytes in vitro**

To address whether the endogenous RAR pathway is triggered by Mtb infection, we treated 1% autologous serum PBMC cultures with BMS493 and measured CD38 expression. We observed that Mtb infection led to increased CD38 expression by human CD14<sup>+</sup> monocytes, but not in CD3<sup>+</sup> T cells, CD19<sup>+</sup> B cells, CD56<sup>+</sup> NK cells or HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>

DCs (Fig. 2A-E and Supplemental Fig. 1E). Strikingly, increased CD38 expression was prevented by BMS493, suggesting that Mtb-induced CD38 expression by human CD14<sup>+</sup> monocytes is mediated by RAR receptors (Fig. 2A). Similarly, Mtb induced CD38 in a host RAR-dependent manner in THP-1 cells (Fig. 2F). Mtb infection also increased the expression of several canonical RARE genes such as DHRS3, ALDH1A1, and RARG (Fig. 2G-I), which are all genes involved in vitamin A metabolism (41). This effect was also dependent on host RAR receptors (Fig. 2G-I). Taken together, our findings indicate that the host endogenous RAR pathway is activated by Mtb *in vitro* in both human monocytes and THP-1 cells. Therefore, we next used THP-1 cells to gain insights on the interaction between Mtb and host RAR receptors.

### **Soluble factor(s) in conditioned medium from Mtb cultures activate host RAR signaling *in vitro***

We reasoned that during the infection process, Mtb must be exposed to extracellular serum components. Also, since serum such as FBS is a source of retinoids (42) and is commonly used in infection experiments, we investigated the combinatorial effects of Mtb and FBS on host RAR activation. To do so, Mtb bacilli were cultured in RPMI supplemented with 20% FBS for 24 hours (Conditioned medium - CM). As a control, RPMI containing 20% FBS without bacteria was prepared in parallel. CM was then used to stimulate serum-free THP-1 cells (Fig. 3A) and CD38 expression was measured by flow cytometry. First, we evaluated the kinetics of CD38 expression on cells exposed to CM and RA. RA (10 nM) was used as a control for RAR activation and the fold-increase in CD38 expression over unstimulated cells was calculated. As expected, RA treatment resulted in a 10-fold increase in CD38 expression, peaking at 48h (Fig. 3B). Surprisingly, CM from Mtb cultures (CM-Mtb) induced a robust ~5-fold-increase in CD38 expression (Fig. 3B) while control CM induced a ~2-fold increase of CD38 expression that did not increase further over time (Fig. 3B). We hypothesized that FBS factor(s) metabolized by Mtb enhanced CD38 expression via RAR receptors. Indeed, CM-Mtb-induced CD38 expression was abrogated in the presence of BMS493 (Fig. 3C). Importantly, this effect was dependent on a heat sensitive function of Mtb as CM obtained from heat-killed bacteria experiments did not induce CD38 expression (Fig. 3C). Additionally, FBS was required for CD38-induced expression by CM-Mtb (Supplemental Fig. 1F). While similar findings were observed for CM from a different Mtb complex strain *M. bovis*, CM from other mycobacteria (*M. smegmatis*) or Gram-negative bacteria (*E. coli*) did not stimulate CD38

expression by THP1 monocytes (Fig. 3D) suggesting this effect is specifically related to Mtb complex species.

To assess the contribution of host ALDH for the CD38 expression induced by CM-Mtb, we stimulated cells with CM-Mtb in the presence or absence of DEAB. Surprisingly, our results demonstrate that host ALDHs are not involved in CD38-induced expression by Mtb-CM (Fig. 3E), suggesting that, during interaction with FBS, Mtb produce direct RAR/RXR modulator(s). This modulator does not seem to be proteinaceous, since proteinase K-treated CM-Mtb (Supplemental Fig. 1G) triggers high levels of RAR-dependent CD38 expression by THP1 cells (Fig. 3F). Taken together, these results indicate that yet-to-be-identified soluble non-proteinaceous metabolites(s) produced by Mtb complex species activate the RAR/CD38 axis in THP-1 monocytes.

### **BMS493 treatment of infected mice altered immune cell subsets in the lungs**

To investigate the endogenous RA/RAR pathway during Mtb infection in vivo, C57BL/6 mice were aerogenically infected with a high dose of Mtb Erdman and were treated either with BMS493 (5mg/kg) injected intraperitoneal (IP) 3 times per week, starting 1 day prior to infection. Control mice were identically infected with Mtb and received IP saline on the same schedule (Fig. 4A). Lungs were harvested 28 days post-infection, and cell subsets were analyzed by flow cytometry using an antibody panel targeting both myeloid and lymphoid cells to provide a high-dimensional immunophenotypes. 58,000 random events gated on singlets, and live CD45<sup>+</sup> cells were analyzed with t-stochastic neighbor embedding (t-SNE) to create a 2-dimensional map and subjected these cells to Flow Self-organizing MAP (FlowSOM) to define cell clusters (43). Based on the expression of 8 proteins, we identified 8 clusters present in lungs from both Saline- and BMS493-treated mice infected with Mtb (Fig. 4B). We compared the distribution of cellular compartments between the Saline- and BMS493-treated groups. Clusters 1 and 4 were significantly larger in the lungs from BMS493-treated mice (Fig. 4B, right), although both groups had similar frequencies of CD45<sup>+</sup> leukocytes in the lungs (Supplemental Fig. 2A). Surface marker staining intensity on t-SNE dimension-reduced space revealed territories harboring myeloid and lymphocytic cells (Fig. 4C). The lymphocyte marker CD3 was primarily expressed by clusters 3 and 6, while CD4 was expressed by cluster 6, and CD8 by cluster 3. Myeloid markers such as CD11b were expressed by clusters 1, 3, and 7. The macrophage markers CD64 and CD68 were mostly expressed by clusters 1,4 and 7, while CD11c was detected in clusters 1 and 7. CD38, a RA-regulated gene, was most highly expressed



by cluster 2, although it was expressed to varying degrees by all clusters (Fig. 4 C). Taken together, these data suggest that BMS493 treatment in vivo enhanced macrophage populations in the lungs of Mtb-infected mice.

### **BMS493 treatment expands CD64+CD11c<sup>high</sup> alveolar macrophages in lungs during Mtb infection and influences bacterial growth.**

Two distinct macrophage populations are present in lungs: alveolar macrophages (AMs) and interstitial macrophages (IMs) (44, 45). AMs express high levels of CD11c and CD68 while IMs express lower levels of CD11c and CD68 (46, 47). Murine tissue-resident macrophages also constitutively express CD64 (48). Because CD64 and CD68 were expressed by clusters 1 and 4 (Fig. 4), we investigated further the impact of BMS493 treatment on lung macrophages (Fig. 5A). We found that cluster 1 expressed not only high levels of CD64 but also higher levels of CD68 and CD11c, suggesting that cluster 1 is composed of AMs (Fig. 5A). In addition, cluster 1 was larger in BMS493-treated mice compared to saline-treated controls (Fig. 5A). Cluster 4 expressed moderate levels of CD64, CD68, and CD11c, suggesting that this population represents IMs (Fig. 5A). Using these data to guide manual validation, parallel analyses were done on viable cells using traditional biaxial gating (see Supplemental Fig. 2B for gating strategy). Based on the expression of CD64 and CD11c, we clearly identified two populations of macrophages in Mtb-infected mice, consisting of AMs and IMs (Fig. 5B). To further confirm these assigned identities, we analyzed CD68 expression on both populations and we found that CD68 was highly expressed by the putative AMs and was present at lower levels on the putative IMs, in agreement with previous reports (46, 47) (Supplemental Fig. 2C). BMS493 did not alter the population of IMs (Fig. 5C). Consistent with the t-SNE data (Fig. 5D), BMS493 treatment was associated with a significant increase in AMs total cell counts over saline-treated controls (Fig. 5D and E). In contrast, analysis of lymphocyte subsets revealed that BMS493 did not affect CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, or CD8<sup>+</sup> T cells (Supplemental Fig. 2D-F).

To confirm that the in vivo BMS493 treatment did indeed inhibit RAR, we used flow cytometry expression to evaluate the effect of the drug on the RA-regulated molecule CD38. We found that CD38 was predominantly expressed by AMs from lungs of Mtb-infected mice, with low levels of expression on IMs. Notably, CD38 expression was significantly reduced on AMs from BMS493-treated animals (Fig. 5F). Together, these results suggest that BMS493 treatment of Mtb-infected mice inhibits the expression of RAR-regulated genes. Furthermore, these effects appear to be cell-specific, affecting mostly the AMs compartment in the lungs. In

addition, we have not observed differences in mRNA expression of RA-regulated genes such as CD38, CYP26B1 and STRA6 from total lungs between saline and BMS493-treated mice, supporting the hypothesis that the effects of BMS493 in the lungs are cell-specific (Supplemental Fig. 2G-I).

We also investigated whether the RAR pathway influences intracellular bacterial replication in both our in vitro and in vivo models. THP-1 cells were treated with BMS493, infected with Mtb at different multiplicities of infection, and bacterial burden was determined at different time points. While BMS493 did appear to have some effect on controlling Mtb replication in this cell line, it was marginal (Fig. 5G-I). We then evaluated the effects of BMS493 in our high dose infection model. We determined the bacterial burden in the lungs and spleen 28 days after infection and again found a marginal effect of BMS493 on bacterial growth (Fig. 5J and K). Collectively, these results suggest that the endogenous RA/RAR pathway i.) is activated during Mtb infection, ii.) regulates the immune cell composition in Mtb-infected mice, expanding the population of AMs, and iii.) may influence control of intracellular Mtb replication in a high dose model of infection.

## DISCUSSION

Some, but not all studies suggest that exogenous vitamin A can control Mtb replication in vitro and in vivo (26–32, 49–53). Most of these reports focused on the potential therapeutic benefits of Vitamin A in TB and employed supraphysiologic concentrations of vitamin in vitro killing assays. However, these studies have not directly addressed whether endogenous Vitamin A and its metabolites play a role during establishment of Mtb infection. To gain insights into Mtb and host RAR, a major receptor for vitamin A-induced effects, we employed in vitro and in vivo models to investigate whether the RA/RAR axis regulates mycobacterial infection. In the present study, we show that Mtb endogenously activates the RAR pathway to modulate myeloid programs and Mtb growth.

We developed an in vitro system to study endogenous RAR activity using THP-1 cells. We found that THP-1 cells cultured in the presence of FBS expressed higher levels of CD38 than cells cultured with BSA, which can be explained by the presence of retinoid precursors in FBS (42, 54, 55). To support this concept, FBS-cultured THP-1 cells presented decreased CD38 expression by 30-50% when exposed to either DEAB (ALDH inhibitor) or BMS493 (RAR inhibitor) (Supplemental Fig. 2J). Thus, studies of retinoid metabolism in macrophages should

consider the effect of FBS used as a culture supplement because it may mask the signal of endogenously produced retinoids. Indeed, serum-free protocols have proven to be a useful approach in metabolic and molecular biology research (56). For instance, the mechanism of insulin action in skeletal muscle cells was only revealed under serum-free protocols (57).

RA signaling is mediated through RAR and RXR receptors and regulates gene transcription by recruiting coactivators proteins (58). RAR signaling can be inhibited by BMS493, a pan inverse RAR agonist that allosterically binds to all three RAR isoforms and strongly enhances the interaction between RAR ligand-binding domain with nuclear corepressor, decreasing the basal transcriptional activity of RAR (59). It has been reported this inhibitor is safe and specifically inhibits RAR in vivo (40, 60). Our results demonstrate that the host RAR pathway is activated by Mtb in human CD14<sup>+</sup> monocytes from PBMC as well as in the THP-1 monocytic cell line. RAR activation was analyzed during Mtb infection by measuring the expression of genes regulated by RA, such as CD38, DHRS3, ALDH1A1, and RARG. All these genes were robustly increased at the transcriptional and protein levels during Mtb infection. BMS493 prevented this increase, supporting the hypothesis that Mtb infection activates the host endogenous RAR pathway via an yet-to-be-identified molecule(s). These findings agree with a study by Bouttier et al. which demonstrated that RAR receptor binding motifs were enriched during Mtb infection in macrophages (19).

Our studies proved several lines of evidence suggesting that Mtb/FBS interactions regulate RAR pathway in monocytes. For instance, conditioned medium experiments indicate that RAR-induced effects in monocytes require live Mtb or *M. bovis* activity, suggesting that these bacteria metabolize serum component(s) to regulate host responses at the transcription level. This mechanism is proposed in Fig. 6A. In addition, the chemical nature of the yet-to-be-defined RAR inducer does not appear to be proteinaceous, as suggested by proteinase K experiments. Mass spectrometry coupled with functional CD38 expression screening experiments could be employed to resolve this matter. So far, all-trans RA has been identified as an exclusive ligand of the three RAR subtypes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), while 9-cis RA can bind to RARs or RXRs (61–63), suggesting that RA or RA-like molecule could be the product released by mycobacteria. While ALDH enzymes are key elements in vitamin A metabolism (18), we provide evidence that activation of RAR/CD38 by CM-Mtb is not dependent on host ALDHs suggesting “Mtb/FBS metabolite” directly act on RAR. Nevertheless, it has been shown that bacterial ALDHs can convert either retinol or retinaldehyde to RA, both in vitro and in vivo (64, 65). In addition, segmented filamentous bacteria (SFB) and *Bifidobacterium bifidum* are a direct source of RA and regulate RAR response in intestinal cells to enhance pathogen host

defense in mice (65). Whether Mtb ALDH and/or other enzymes participate in the production of RA during infection and activate host RAR merits further exploration.

Interestingly, activation of different families of nuclear receptors such as PPAR- $\gamma$  and TR4 have been implicated in susceptibility of Mtb growth by human monocytes (5). On the other hand, knockdown of the nuclear receptors VDR and LXR $\alpha$  resulted in higher bacterial numbers, suggesting that when activated, VDR and LXR $\alpha$  potentiate infection control (5). Collectively, nuclear receptors may be an important molecular hub in regulating Mtb infection.

Data from our mouse model of high-dose Mtb infection showed a trend towards lower bacterial burden in the lungs of the BMS493-treated animals. This response was associated with increased frequencies and numbers of CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> AMs in lungs during Mtb infection, with little difference in the IMs population. This suggests that the effects of BMS493 may be cell-specific, and that AMs play a predominant role in RAR-mediated effects during Mtb infection. By using a genetic model of vitamin A deficiency (VAD), LRAT <sup>-/-</sup> mice, that are unable to synthesize and store retinil esters, Trasino et al. (66) demonstrated higher expression of macrophage marker F4/80 in the lungs of LRAT <sup>-/-</sup> infected mice compared to infected wild-type mice supplemented with vitamin A. In that model (66), reduced expression of RARE genes in the lungs were also observed and it could be explained by reduction of the local retinoid pools, which was associated with an increase in the expression of pro-inflammatory genes such as TNF and IL1 $\beta$ , and minimal differences in bacterial burden. While LRAT <sup>-/-</sup> VAD mice model impaired the systemic storage of retinoids worsening the disease outcome, our model demonstrated that BMS493 affected specifically RAR signaling in AMs population in the lungs, which could be a candidate for host-directed therapy. AMs are thought to be the first cell type to take up Mtb in the murine aerosol model of infection and they are an anti-inflammatory M2-type population whose cellular environment is favorable for Mtb replication and dissemination (3, 67–70). However, the mechanism by which BMS493 induced AMs expansion in our in vivo model, and how this expansion correlates with marginally reduced bacteria loads, remains to be investigated. Repopulation of lung tissue-resident macrophages in the lung is dependent on local production of IL-4, IL-13, CSF-1, and GM-CSF (71, 72). Therefore, BMS493 may induce local expansion of AMs by increasing the production of these cytokines, pushing AMs towards a more pro-inflammatory state influencing Mtb replication. Analysis of the ratios in mRNA expression involved in inflammation, cell migration and expansion showed no differences between the groups (Supplemental Fig. 2K-R). Our data suggests that BMS493 effects should be investigated on isolated AMs. In fact, scRNA-seq analysis revealed two distinct pro-inflammatory sub-populations of AMs associated with Mtb that up-regulate pro-inflammatory

genes and transcripts associated with glycolysis (73). Thus, macrophage heterogeneity goes beyond the paradigm that these cells exist in a non-programmed, neutral state until cytokine exposure determines their functional phenotype (i.e. M1 or M2) (74).

In summary, to the best of our knowledge, this study is the first to show that endogenous host RAR receptors regulate Mtb infection both *in vitro* and *in vivo*. Pharmacological inhibition of the RAR receptors by BMS493 *in vivo* induces the expansion of the AMs population in the lungs, and is associated with a trend to better control of the infection, this mechanism is proposed in Fig. 6B. These data suggest that RAR receptors may be a therapeutic target to improve the outcome of pulmonary TB. Future studies testing anti-TB antibiotics + BMS493 in Mtb infection models could be performed to address this hypothesis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Howard Hughes Medical Institute – Early Career Scientist (AB; 55007412), CNPQ-PQ Scholars (AB and DSM) and FAPESC scholarship (GD and DAGBM) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 (YKTM). Additional support was provided by the National Institutes of Health grant AI142662 (CAS). We are grateful to Amy Fraser and Janelle Stack (U.Pitt) for assistance with Mtb aerosolization and tissue processing, and LAMEB/UFSC for technical assistance.

## REFERENCES

1. Pai, M., M. A. Behr, D. Dowdy, K. Dheda, M. Divangahi, C. C. Boehme, A. Ginsberg, S. Swaminathan, M. Spigelman, H. Getahun, D. Menzies, and M. Raviglione. 2016. Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2:1 2: 1–23.
2. Bhardwaj, V., and M. J. Colston. 1988. The processing and presentation of mycobacterial antigens by human monocytes. *European Journal of Immunology* 18: 691–696.
3. Cohen, S. B., B. H. Gern, J. L. Delahaye, D. R. Sherman, M. Y. Gerner, and K. B. Urdahl. 2018. Alveolar Macrophages Provide an Early Short Article Alveolar Macrophages Provide an Early Mycobacterium tuberculosis Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host and Microbe* 1–8.
4. Sampath, P., K. Moideen, U. D. Ranganathan, and R. Bethunaickan. 2018. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol* 9: 1726.
5. Mahajan, S., H. K. Dkhar, V. Chandra, S. Dave, R. Nanduri, A. K. Janmeja, J. N. Agrewala, and P. Gupta. 2012. Mycobacterium tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR $\gamma$  and TR4 for Survival . *The Journal of Immunology* 188: 5593–5603.
6. Liu, C. H., H. Liu, and B. Ge. 2017. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & Molecular Immunology* 2017 14:12 14: 963–975.
7. Delgobo, M., D. A. G. B. Mendes, E. Kozlova, E. L. Rocha, G. F. Rodrigues-Luiz, L. Mascarin, G. Dias, D. O. Patrício, T. Dierckx, M. A. Bicca, G. Bretton, Y. K. T. de Menezes, M. R. Starick, D. Rovaris, J. del Moral, D. S. Mansur, J. van Weyenbergh, and A. Báfica. 2019. An evolutionary recent IFN/IL-6/CEBP axis is linked to monocyte expansion and tuberculosis severity in humans. *Elife* 8: 1–32.
8. Manzanillo, P. S., M. U. Shiloh, D. A. Portnoy, and J. S. Cox. 2012. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host and Microbe* 11: 469–480.
9. Barish, G. D., M. Downes, W. A. Alaynick, R. T. Yu, C. B. Ocampo, A. L. Bookout, D. J. Mangelsdorf, and R. M. Evans. 2005. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* 19: 2466–2477.
10. Maglich, J. M., A. Sluder, X. Guan, Y. Shi, D. D. McKee, K. Carrick, K. Kamdar, T. M. Willson, and J. T. Moore. 2001. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol* 2: research0029.1.
11. Mazaira, G. I., N. R. Zgajnar, C. M. Lotufo, C. Daneri-Becerra, J. C. Sivils, O. B. Soto, M. B. Cox, and M. D. Galigniana. 2018. The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nucl Receptor Res* 5.
12. Sever, R., and C. K. Glass. 2013. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: 1–4.

13. Rochette-Egly, C., and P. Germain. 2009. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7.
14. Duong, V., and C. Rochette-Egly. 2011. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1812: 1023–1031.
15. Piskunov, A., Z. al Tanoury, and C. Rochette-Egly. 2014. The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level. 70: 75–102.
16. Bastien, J., and C. Rochette-Egly. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1–16.
17. Hashimoto, Y., H. Kagechika, and K. Shudo. 1990. Expression of retinoic acid receptor genes and the ligand-binding selectivity of retinoic acid receptors (RAR'S). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166: 1300–1307.
18. Marill, J., N. Idres, C. C. Capron, E. Nguyen, and G. G. Chabot. 2003. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* 4: 1–10.
19. Bouttier, M., D. Laperriere, B. Memari, J. Mangiapane, A. Fiore, E. Mitchell, M. Verway, M. A. Behr, R. Sladek, L. B. Barreiro, S. Mader, and J. H. White. 2016. Alu repeats as transcriptional regulatory platforms in macrophage responses to M.Tuberculosis infection. *Nucleic Acids Research* 44: 10571–10587.
20. Saini, A., S. Mahajan, N. Ahuja, E. Bhagyaraj, R. Kalra, A. K. Janmeja, and P. Gupta. 2018. An Accord of Nuclear Receptor Expression in M. tuberculosis Infected Macrophages and Dendritic Cells. *Scientific Reports* 8: 2296.
21. Niu, H., G. Hadwiger, H. Fujiwara, and J. S. Welch. 2016. Pathways of retinoid synthesis in mouse macrophages and bone marrow cells. *Journal of Leukocyte Biology* 99: 797–810.
22. Ito, K., R. Zolfaghari, L. Hao, and A. C. Ross. 2014. Inflammation rapidly modulates the expression of ALDH1A1 (RALDH1) and vimentin in the liver and hepatic macrophages of rats in vivo. *Nutrition and Metabolism* 11: 1–13.
23. Mathur, M. 2007. Role of vitamin A supplementation in the treatment of tuberculosis. *Natl Med J India* 20: 16–21.
24. Crowle, A. J., and E. J. Ross. 1989. Inhibition by retinoic acid of multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infection and Immunity* 57: 840–844.
25. Yamada, H., S. Mizuno, A. C. Ross, and I. Sugawara. 2007. Retinoic Acid Therapy Attenuates the Severity of Tuberculosis While Altering Lymphocyte and Macrophage Numbers and Cytokine Expression in Rats Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Nutr* 137: 2696.
26. Wheelwright, M., E. W. Kim, M. S. Inkeles, A. de Leon, M. Pellegrini, S. R. Krutzik, and P. T. Liu. 2014. All- Trans Retinoic Acid–Triggered Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* Is Dependent on NPC2 . *The Journal of Immunology* 192: 2280–2290.

27. Jacobo-Delgado, Y. M., F. Torres-Juarez, A. Rodríguez-Carlos, A. Santos-Mena, J. E. Enciso-Moreno, C. Rivas-Santiago, G. Diamond, and B. Rivas-Santiago. 2021. Retinoic acid induces antimicrobial peptides and cytokines leading to *Mycobacterium tuberculosis* elimination in airway epithelial cells. *Peptides (N.Y.)* 142.
28. Kim, E. W., A. de Leon, Z. Jiang, R. A. Radu, A. R. Martineau, E. D. Chan, X. Bai, W.-L. Su, D. J. Montoya, R. L. Modlin, and P. T. Liu. 2019. Vitamin A Metabolism by Dendritic Cells Triggers an Antimicrobial Response against *Mycobacterium tuberculosis*. *mSphere* 4.
29. Babunovic, G. H., M. A. DeJesus, B. Bosch, M. R. Chase, T. Barbier, A. K. Dickey, B. D. Bryson, J. M. Rock, and S. M. Fortune. 2022. CRISPR Interference Reveals That All-Trans-Retinoic Acid Promotes Macrophage Control of *Mycobacterium tuberculosis* by Limiting Bacterial Access to Cholesterol and Propionyl Coenzyme A. *mBio* 13.
30. Coleman, M. M., S. A. Basdeo, A. M. Coleman, C. N. Cheallaigh, C. P. de Castro, A. M. McLaughlin, P. J. Dunne, J. Harris, and J. Keane. 2018. All-trans retinoic acid augments autophagy during intracellular bacterial infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 59: 548–556.
31. Abd-Nikfarjam, B., M. Nassiri-Asl, M. Hajiaghayi, and T. Naserpour Farivar. 2018. Role of Chicoric Acid and 13-Cis Retinoic Acid in *Mycobacterium tuberculosis* Infection Control by Human U937 Macrophage. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 0: 0.
32. O'Connor, G., N. Krishnan, A. Fagan-Murphy, J. Cassidy, S. O'Leary, B. D. Robertson, J. Keane, M. P. O'Sullivan, and S. A. Cryan. 2019. Inhalable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles encapsulating all-trans-Retinoic acid (ATRA) as a host-directed, adjunctive treatment for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 134: 153–165.
33. Kim, C. Y., C. Webster, J. K. M. Roberts, J. H. Moon, E. Z. Alipio Lyon, H. Kim, M. Yu, L. W. Hung, and T. C. Terwilliger. 2009. Analysis of nucleoside-binding proteins by ligand-specific elution from dye resin: Application to *Mycobacterium tuberculosis* aldehyde dehydrogenases. *Journal of Structural and Functional Genomics* 10: 291–301.
34. Winchell, C. G., B. B. Mishra, J. Y. Phuah, M. Saqib, S. J. Nelson, P. Maiello, C. M. Causgrove, C. L. Ameel, B. Stein, H. J. Borish, A. G. White, E. C. Klein, M. D. Zimmerman, V. Dartois, P. L. Lin, C. M. Sasseti, and J. A. L. Flynn. 2020. Evaluation of IL-1 Blockade as an Adjunct to Linezolid Therapy for Tuberculosis in Mice and Macaques. *Frontiers in Immunology* 11: 891.
35. Yamashiro, L. H., C. Eto, M. Soncini, V. Horewicz, M. Garcia, A. D. Schindwein, E. C. Grisard, D. B. Rovaris, and A. Báfica. 2016. Isoniazid-induced control of *Mycobacterium tuberculosis* by primary human cells requires interleukin-1 receptor and tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 46: 1936–1947.
36. van der Valk, J., D. Mellor, R. Brands, R. Fischer, F. Gruber, G. Gstraunthaler, L. Hellebrekers, J. Hyllner, F. H. Jonker, P. Prieto, M. Thalen, and V. Baumans. 2004. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro* 18: 1–12.



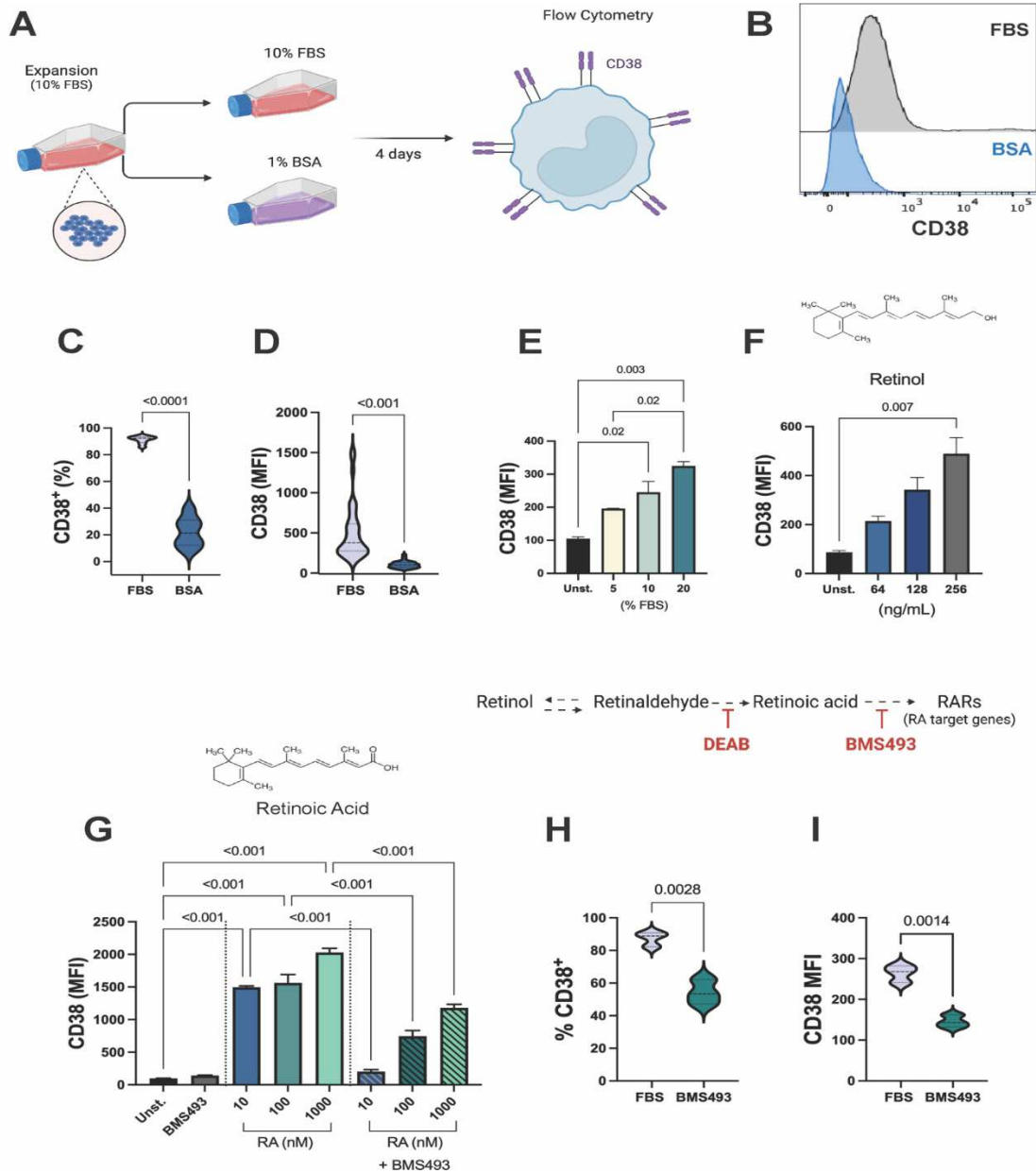
37. Pirkmajer, S., and A. v. Chibalin. 2011. Serum starvation: Caveat emptor. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 301: 272–279.
38. Drach, J., T. Mcqueen, H. Engel, M. Andreeff, K. A. Robertson, S. J. Collins, F. Malavasi, and K. Mehta. 1994. Retinoic Acid-induced Expression of CD38 Antigen in Myeloid Cells Is Mediated through Retinoic Acid Receptor- $\alpha$ . *Cancer Research* 54: 1746–1752.
39. Morgan, C. A., B. Parajuli, C. D. Buchman, K. Dria, D. Thomas, U. States, and U. States. 2015. N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) as a substrate and mechanism-based inhibitor for human ALDH isoenzymes. *Chem Biol Interact* 5: 18–28.
40. Germain, P., C. Gaudon, V. Pogenberg, S. Sanglier, A. van Dorsselaer, C. A. Royer, M. A. Lazar, W. Bourguet, and H. Gronemeyer. 2009. Differential Action on Coregulator Interaction Defines Inverse Retinoid Agonists and Neutral Antagonists. *Chemistry and Biology* 16: 479–489.
41. Metzler, M. A., and L. L. Sandell. 2016. Enzymatic Metabolism of Vitamin A in Developing Vertebrate Embryos. *Nutrients* 8.
42. Napoli, J. L. 1986. Quantification of physiological levels of retinoic acid. *Methods Enzymol* 123: 112–124.
43. van Gassen, S., B. Callebaut, M. J. van Helden, B. N. Lambrecht, P. Demeester, T. Dhaene, and Y. Saeys. 2015. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A* 87: 636–645.
44. Chakarov, S., H. Y. Lim, L. Tan, S. Y. Lim, P. See, J. Lum, X. M. Zhang, S. Foo, S. Nakamizo, K. Duan, W. T. Kong, R. Gentek, A. Balachander, D. Carbajo, C. Bleriot, B. Malleret, J. K. C. Tam, S. Baig, M. Shabeer, S. A. E. S. Toh, A. Schlitzer, A. Larbi, T. Marichal, B. Malissen, J. Chen, M. Poidinger, K. Kabashima, M. Bajenoff, L. G. Ng, V. Angeli, and F. Ginhoux. 2019. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* 363.
45. Byrne, A. J., S. A. Mathie, L. G. Gregory, and C. M. Lloyd. 2015. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax* 70: 1189–1196.
46. Zaynagetdinov, R., T. P. Sherrill, P. L. Kendall, B. H. Segal, K. P. Weller, R. M. Tighe, and T. S. Blackwell. 2013. Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49: 180–189.
47. Misharin, A. v., L. Morales-Nebreda, G. M. Mutlu, G. R. S. Budinger, and H. Perlman. 2013. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49: 503–510.

48. Tamoutounour, S., S. Henri, H. Lelouard, B. de Bovis, C. de Haar, C. J. van der Woude, A. M. Woltman, Y. Reyal, D. Bonnet, D. Sichien, C. C. Bain, A. M. Mowat, C. Reis e Sousa, L. F. Poulin, B. Malissen, and M. Williams. 2012. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *European Journal of Immunology* 42: 3150–3166.
49. Crowle, A. J., and E. J. Ross. 1989. Inhibition by retinoic acid of multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infection and Immunity* 57: 840.
50. Hanekom, W. A., S. Potgieter, E. J. Hughes, H. Malan, G. Kessow, and G. D. Hussey. 1997. Vitamin A status and therapy in childhood pulmonary tuberculosis. *The Journal of Pediatrics* 131: 925–927.
51. Range, N., Å. B. Andersen, P. Magnussen, A. Mugomela, and H. Friis. 2005. The effect of micronutrient supplementation on treatment outcome in patients with pulmonary tuberculosis: a randomized controlled trial in Mwanza, Tanzania. *Tropical Medicine & International Health* 10: 826–832.
52. Visser, M. E., H. M. S. Grewal, E. C. Swart, M. A. Dhansay, G. Walzl, S. Swanevelder, C. Lombard, and G. Maartens. 2011. The effect of vitamin A and zinc supplementation on treatment outcomes in pulmonary tuberculosis: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93: 93–100.
53. Lawson, L., T. D. Thacher, M. A. Yassin, N. A. Onuoha, A. Usman, N. E. Emenyonu, A. Shenkin, P. D. O. Davies, and L. E. Cuevas. 2010. Randomized controlled trial of zinc and vitamin A as co-adjuvants for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Tropical Medicine & International Health* 15: 1481–1490.
54. Keith Randolph, R., and M. Simon. 1993. Characterization of Retinol Metabolism in Cultured Human Epidermal Keratinocytes\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY and Molecular Biology* 268: 9198–9205.
55. McGuire, J., N. Fedarko, E. Johanssen, J. LaVigne, G. Lyons, L. Milstone, and M. Osber. 1982. The influence of retinoids on cultivated human keratinocytes. *J Am Acad Dermatol* 6: 630–639.
56. Klip, A., G. Li, and W. J. Logan. 1984. Induction of sugar uptake response to insulin by serum depletion in fusing L6 myoblasts. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1984.247.3.E291> 10.
57. Ching, J. K., P. Rajguru, N. Marupudi, S. Banerjee, and J. S. Fisher. 2010. A role for AMPK in increased insulin action after serum starvation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 299: 1171–1179.
58. Mangelsdorf, D. J., E. S. Ong, J. A. Dyck, and R. M. Evans. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345: 224–229.
59. le Maire, A., C. Teyssier, C. Erb, M. Grimaldi, S. Alvarez, A. R. de Lera, P. Balaguer, H. Gronemeyer, C. A. Royer, P. Germain, and W. Bourguet. 2010. A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nature Structural and Molecular Biology* 17: 801–807.

60. Wang, B., X. Fu, X. Liang, Z. Wang, Q. Yang, T. Zou, W. Nie, J. Zhao, P. Gao, M. J. Zhu, J. M. de Avila, J. Maricelli, B. D. Rodgers, and M. Du. 2017. Maternal Retinoids Increase PDGFR $\alpha$ + Progenitor Population and Beige Adipogenesis in Progeny by Stimulating Vascular Development. *EBioMedicine* 18: 288–299.
61. Taneja, R., B. Roy, J. L. Plassat, C. F. Zusi, J. Ostrowski, P. R. Reczek, and P. Chambon. 1996. Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR $\beta$ 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6197–6202.
62. Zou, C. P., W. K. Hong, and R. Lotan. 1999. Expression of retinoic acid receptor  $\beta$  is associated with inhibition of keratinization in human head and neck squamous carcinoma cells. *Differentiation* 64: 123–132.
63. McCarroll, J. A., P. A. Phillips, N. Santucci, R. C. Pirola, J. S. Wilson, and M. v. Apte. 2006. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 55: 79–89.
64. Hong, S. H., H. P. T. Ngo, H. K. Nam, K. R. Kim, L. W. Kang, and D. K. Oh. 2016. Alternative biotransformation of retinal to retinoic acid or retinol by an aldehyde dehydrogenase from *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 3940–3946.
65. Woo, V., E. M. Eshleman, S. Hashimoto-Hill, J. Whitt, S. en Wu, L. Engleman, T. Rice, R. Karns, J. E. Qualls, D. B. Haslam, B. A. Vallance, and T. Alenghat. 2021. Commensal segmented filamentous bacteria-derived retinoic acid primes host defense to intestinal infection. *Cell Host and Microbe* 29: 1744-1756.e5.
66. Trasino, S. E., X. H. Tang, C. Trujillo, J. Andres, S. Ehrt, and L. J. Gudas. 2020. Mycobacterium tuberculosis Infection is Exacerbated in Mice Lacking Lecithin:Retinol Acyltransferase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866: 165909.
67. Huang, L., E. v. Nazarova, S. Tan, Y. Liu, and D. G. Russell. 2018. Growth of Mycobacterium tuberculosis in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *The Journal of Experimental Medicine* 215: 1135.
68. Pisu, D., L. Huang, J. K. Grenier, and D. G. Russell. 2020. Dual RNA-Seq of Mtb-Infected Macrophages In Vivo Reveals Ontologically Distinct Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep.* 30: 335–350.
69. Srivastava, S., J. D. Ernst, and L. Desvignes. 2014. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. *Immunol Rev* 262: 179–192.
70. Rothchild, A. C., G. S. Olson, J. Nemeth, L. M. Amon, D. Mai, E. S. Gold, A. H. Diercks, and A. Aderem. 2019. Alveolar macrophages generate a noncanonical NRF2-driven transcriptional response to Mycobacterium tuberculosis in vivo. *Sci Immunol* 4.
71. Jenkins, S. J., D. Ruckerl, P. C. Cook, L. H. Jones, F. D. Finkelman, N. van Rooijen, A. S. MacDonald, and J. E. Allen. 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T H2 inflammation. *Science* (1979) 332: 1284–1288.

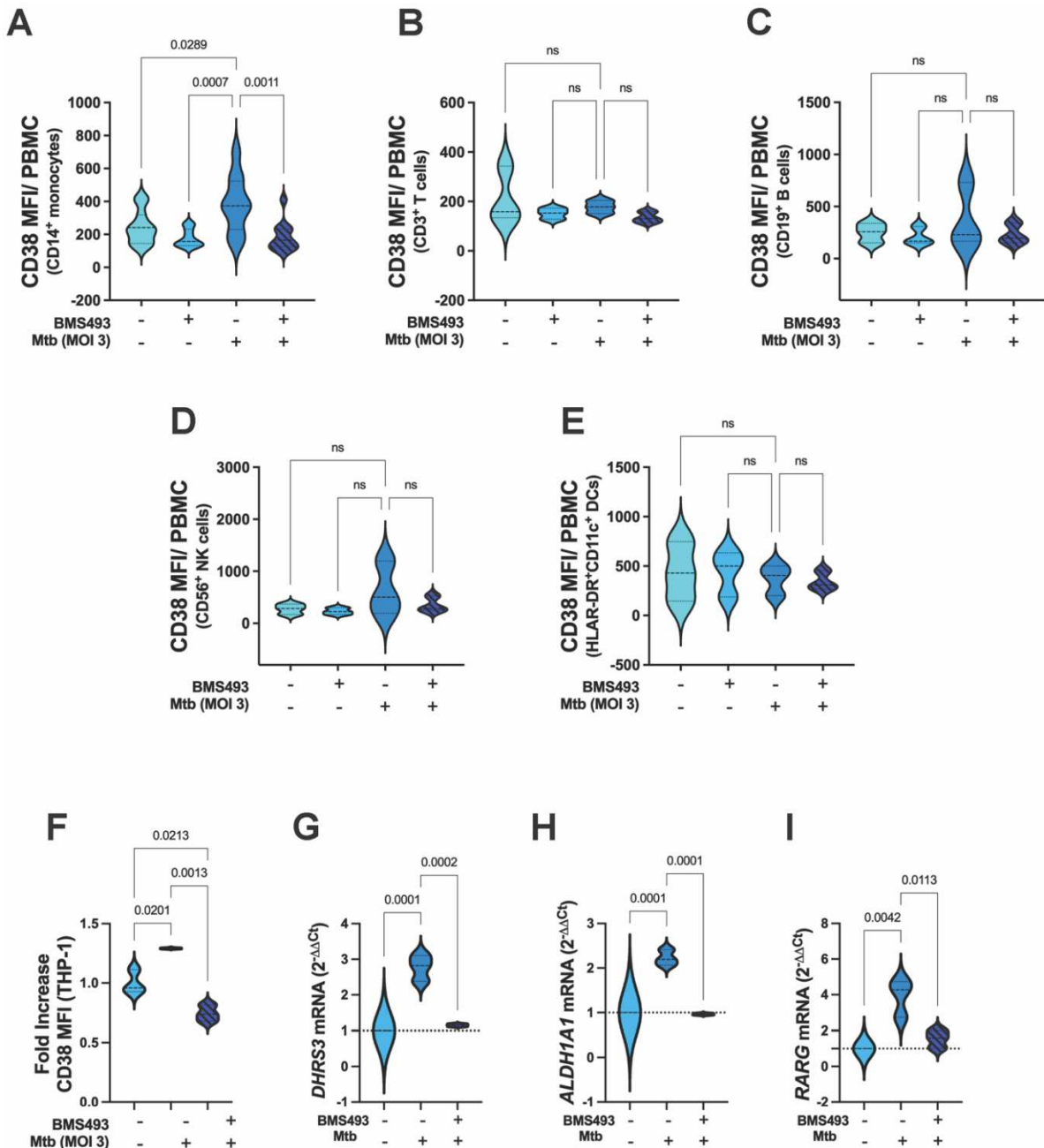
72. Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M. B. Beasley, M. Leboeuf, C. D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S. W. Boyer, E. C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. García-Sastre, E. R. Stanley, F. Ginhoux, P. S. Frenette, and M. Merad. 2013. Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38: 792–804.
73. Pisu, D., L. Huang, V. Narang, M. Theriault, G. Lê-Bury, B. Lee, A. E. Lakudzala, D. T. Mzinza, D. v. Mhango, S. C. Mitini-Nkhoma, K. C. Jambo, A. Singhal, H. C. Mwandumba, and D. G. Russell. 2021. Single cell analysis of *M. tuberculosis* phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *Journal of Experimental Medicine* 218.
74. Murray, P. J. 2017. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol* 79: 541–566.

Figure 1: Menezes et al.



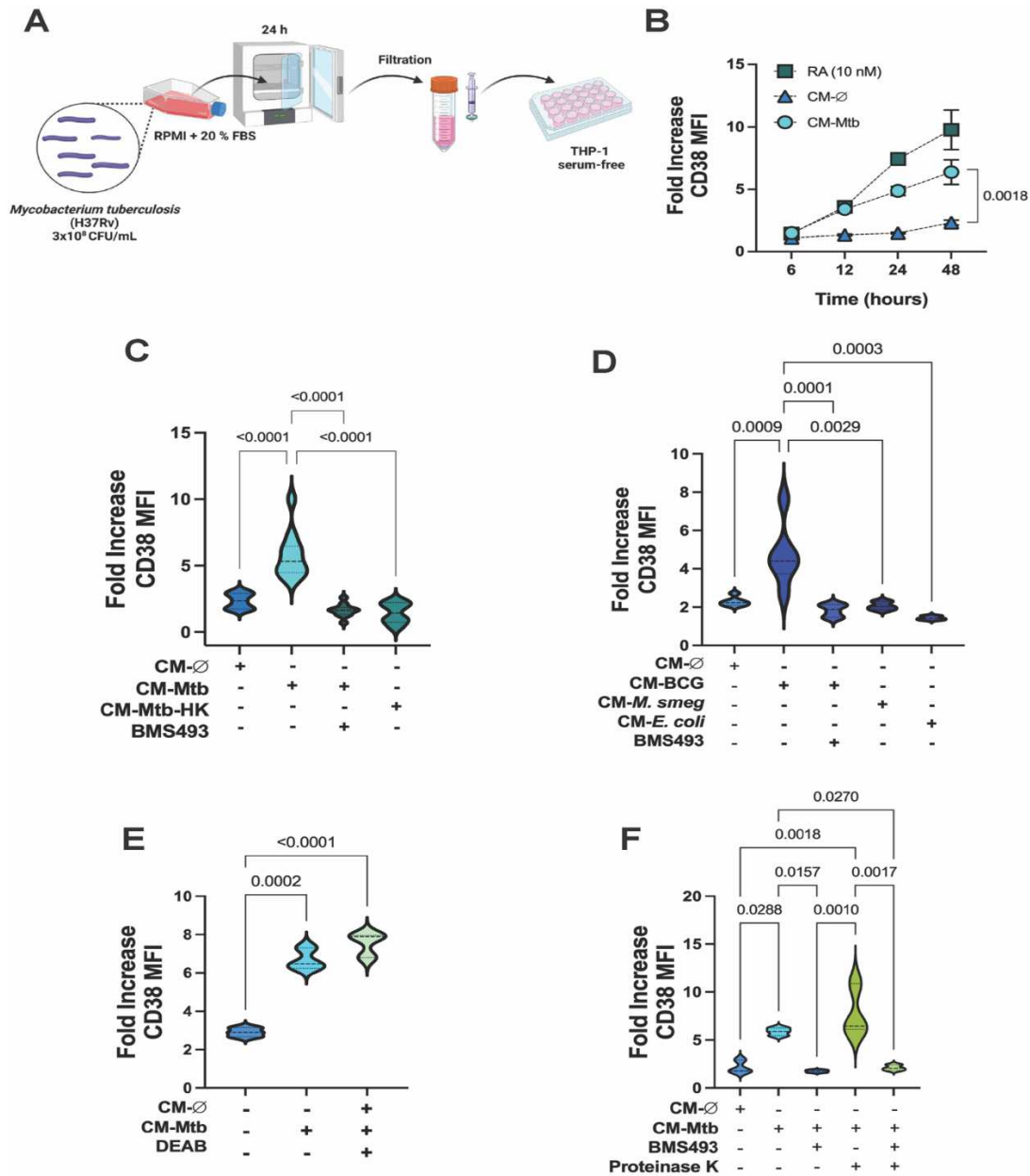
**Fig. 1: Increased baseline levels of RAR-mediated CD38 expression in fetal bovine serum-supplemented THP-1 cell cultures.** (A) Representative scheme showing the experimental approach used to investigate the effects of FBS on RAR activation. THP-1 cells were expanded in RPMI-1640 medium containing 10% FBS. Cells were cultured in RPMI containing either 10% FBS or 1% BSA. By day 4, CD38 expression was evaluated by flow cytometry and (B) represents a typical histogram of CD38 MFI in cells grown either in 10%FBS or 1%BSA. (C) Violin plot shows the frequency of viable cells expressing CD38<sup>+</sup>. Data pooled from five independent experiments performed in triplicates. (D) Expression of CD38 (MFI) on viable cells. Data pooled from twelve experiments performed in triplicates. (E) CD38 expression (MFI) in serum-free THP-1 cells stimulated with 5, 10, and 20 % FBS for 48h. Results are means  $\pm$  SEM of data pooled from one experiment performed in duplicates. (F) Bar graph shows CD38 expression (MFI) in serum-free THP-1 cells stimulated with 64, 128, and 256 ng/mL for 48h. Results are means  $\pm$  SEM of data pooled from one experiment performed in duplicates. (G) Metabolic pathway of Vitamin A for regulation of RARE gene expression. (H) CD38 expression (MFI) in serum-free THP-1 cells stimulated with retinoic acid 10, 100, or 1000 nM (final concentration) in the presence or absence of 3  $\mu$ M BMS493 for 48h. Results are means  $\pm$ SEM of data pooled from one experiment performed in triplicates. (I-J) Frequency and MFI of CD38 on viable cells grown either FBS or BMS493 (3  $\mu$ M) data from one experiment in triplicates. Results are means  $\pm$  SEM. (E,F,G) One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons, and (C-D, I-J) Unpaired Student's *t* test were performed to determine significance. ns, not significant; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 2: Menezes et al.



**Fig. 2: Mtb activates endogenous RA/RAR pathway in primary human monocytes and THP-1 cells *in vitro*.** PBMC from healthy donors were exposed to Mtb (H37Rv) at MOI 3. By 72h post-infection, RAR activation was evaluated by measuring CD38 expression in CD14<sup>+</sup> monocytes, CD3<sup>+</sup> lymphocytes, CD19<sup>+</sup> B cells, CD56<sup>+</sup> NK cells, and HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs by flow cytometry. **(A)** Violin plot shows CD38 expression (MFI) on viable CD14<sup>+</sup> cells exposed or not to Mtb (MOI 3) in the presence or absence of 3  $\mu$ M of BMS493. Results are means  $\pm$ SEM of data pooled from three independent experiments (n=11 healthy donors). **(B-E)** Violin plots show CD38 expression (MFI) on viable CD3<sup>+</sup> lymphocytes, CD19<sup>+</sup> B cells, CD56<sup>+</sup> NK cells, and HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs. Results are means  $\pm$ SEM of data from one experiment (n=3 healthy donors). **(F)** Fold increase of CD38 MFI in THP-1 cells exposed to Mtb (MOI 3) in the presence or absence of 3  $\mu$ M of BMS493 24h post-infection. Fold increase was calculated over uninfected controls. Results are means  $\pm$ SEM of data from one experiment performed in triplicates. **(G-I)** Relative expression of vitamin A responsive genes, *DHR3*, *ALDH1A1*, and *RARG* in THP-1 cells. Results are means  $\pm$ SEM of data from one experiment performed in triplicates. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons was performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

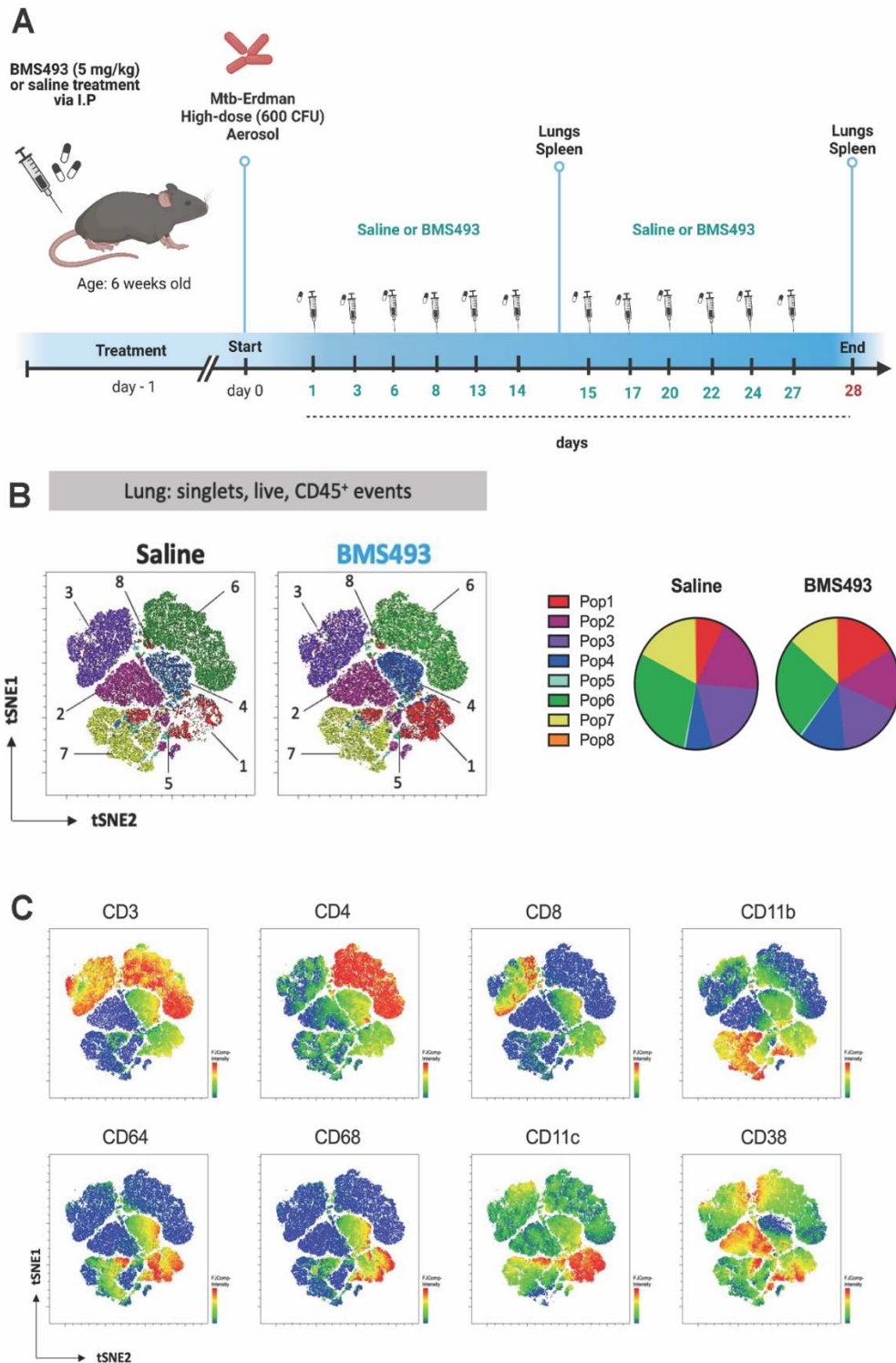
Figure 3: Menezes et al.



**Fig. 3: Conditioned medium (CM) from Mtb culture activates RAR-dependent CD38 expression in THP-1 cells.** (A) Representative scheme showing the experimental approach used to produce conditioned medium from Mtb cultures. (B) Panel shows CD38 expression of serum-free THP-1 cells exposed to RA (10 nM), CM-Mtb, and CM-control (CM-∅, without bacteria). CD38 Fold increase was calculated over unstimulated cells. Results are means ±SEM of one experiment performed in triplicates. (C) CD38 MFI Fold increase in serum-free THP-1 cells stimulated with CM-control (CM-∅), CM-Mtb, CM-Mtb heat-killed in the presence or absence of 3 μM BMS493 for 48h. Results mean ± SEM of data pooled from two to three independent experiments performed in triplicates. (D) CD38 MFI Fold increase in serum-free THP-1 cells stimulated with CM-control (CM-∅), CM- *M.bovis* BCG, CM- *M. smegmatis*, and CM- *E. coli* in the presence or absence of 3 μM BMS493 48h post-stimuli. Results are means ±SEM of data pooled from two independent experiments performed in triplicates (CM-∅, CM-BCG, and CM-BCG + BMS493) and one experiment in triplicates (CM- *M. smegmatis* and CM- *E. coli*). (E) CD38 MFI Fold increase in serum-free THP-1 cells stimulated with CM-control, CM-Mtb in the presence or absence of 100 μM DEAB (ALDH inhibitor) 48h post-stimuli. Data from one experiment performed in triplicate (F) CD38 MFI fold increase in serum-free THP-1 cells exposed to either CM-Mtb treated or proteinase-K in the presence or absence of 3 μM BMS493 48h post-stimuli. Data from one experiment performed in triplicate. Results are means ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons was performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.



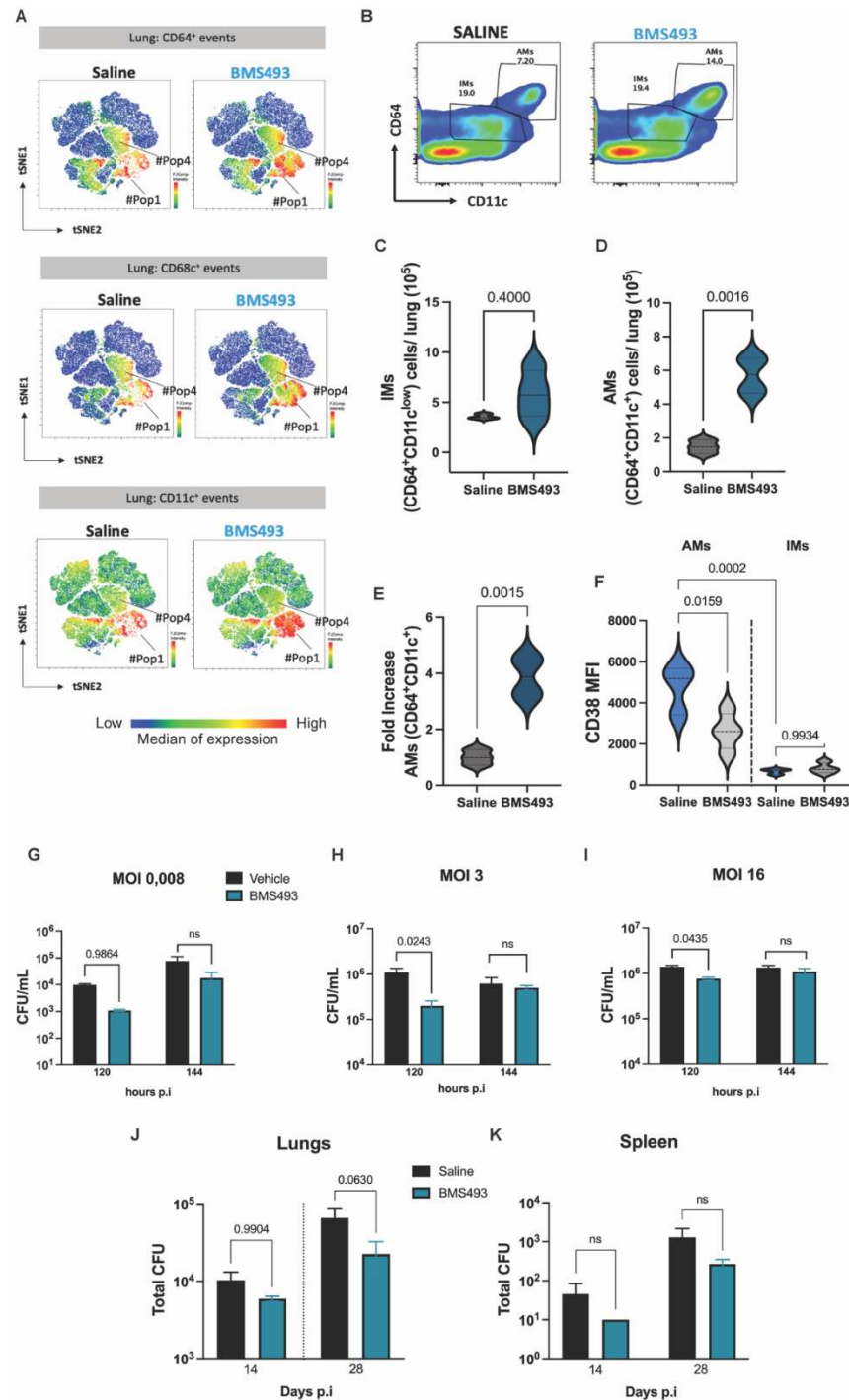
Figure 4: Menezes et al.



**Fig. 4: Flow Self-Organizing Map (FlowSOM) analyses cellular content lungs from BMS493-treated Mtb-infected mice.** (A) Timeline of BMS493-treated Mtb infected mice. (B) Results of FlowSOM projected on t-stochastic neighbor embedding (t-SNE) space. Flow cytometry analysis of cells recovered from the lungs of Mtb-infected mice at 28 dpi. Files were normalized with events gated on CD45<sup>+</sup> total viable single cells from infected saline (n=3) and BMS493-treated mice (n=3). Samples were concatenated in 58,000 random events and analyzed with the tSNE script in FlowJO to create a 2-dimensional map and clusters identified using FlowSOM projected on tSNE analysis. Pier charts demonstrate the distribution of cell clusters in the lungs of saline and BMS493 groups. (C) Relative staining intensity for indicated surface markers across t-SNE space.



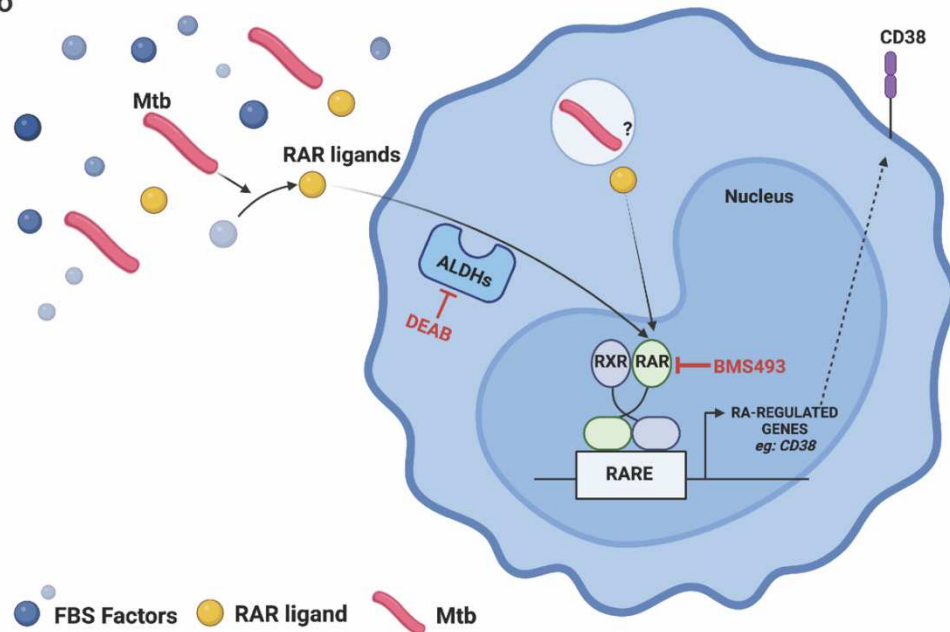
Figure 5: Menezes et al.



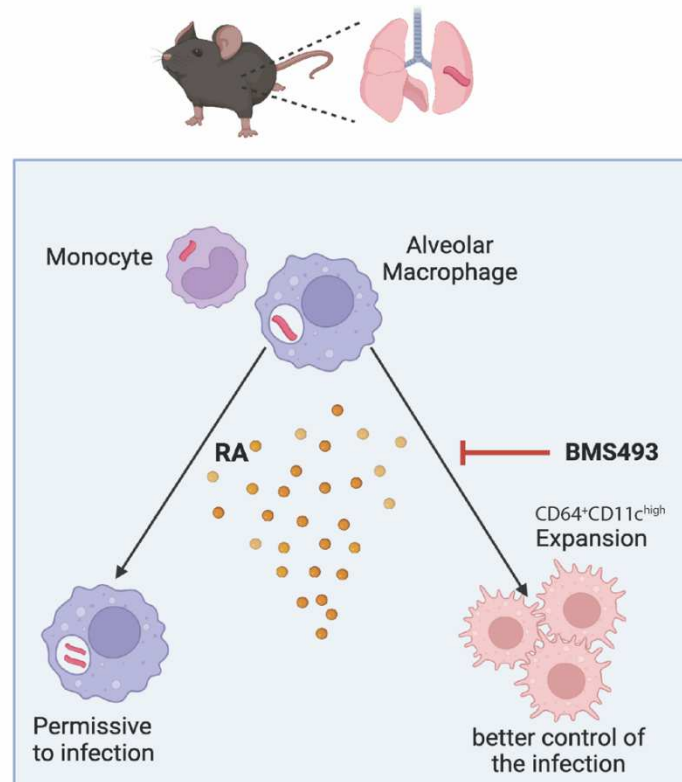
**Fig. 5: Flow cytometry tSNE analysis identifies CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>CD68<sup>+</sup> Alveolar macrophages as the most significant leukocytes in the lungs of BMS493-treated infected mice.** Results of FlowSOM projected on t-stochastic neighbor embedding (t-SNE) space show (A) the relative staining intensity for lung resident-macrophages markers CD64, CD68, and CD11c. (B) Biaxial gating strategy on populations 1 and 4 identified two macrophages based on the expression of CD64 and CD11c. Alveolar macrophages (AMs) was defined as CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>, and Interstitial macrophages (IMs) as CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>low</sup>. (C) Viable IMs (CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>low</sup>) cell numbers per lung. (D) Viable AMs (CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>) cell numbers per lung. (E) Fold-increase of AMs calculated over saline group. (F) CD38 expression (MFI) in AMs and IMs from saline and BMS493-treated animals 28 dpi. (G-I) Mtb CFU in THP-1 cells treated with BMS493. Bacterial burden in (J) lungs and (K) spleen 14 and 28 dpi. Results are mean ± SE of measurements from 3 to 4 animals. An unpaired t-test or one-way ANOVA was followed by Tukey's multiple comparisons were performed to determine significance. The p-value is shown. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

Figure 6: Menezes et al.

## A In vitro

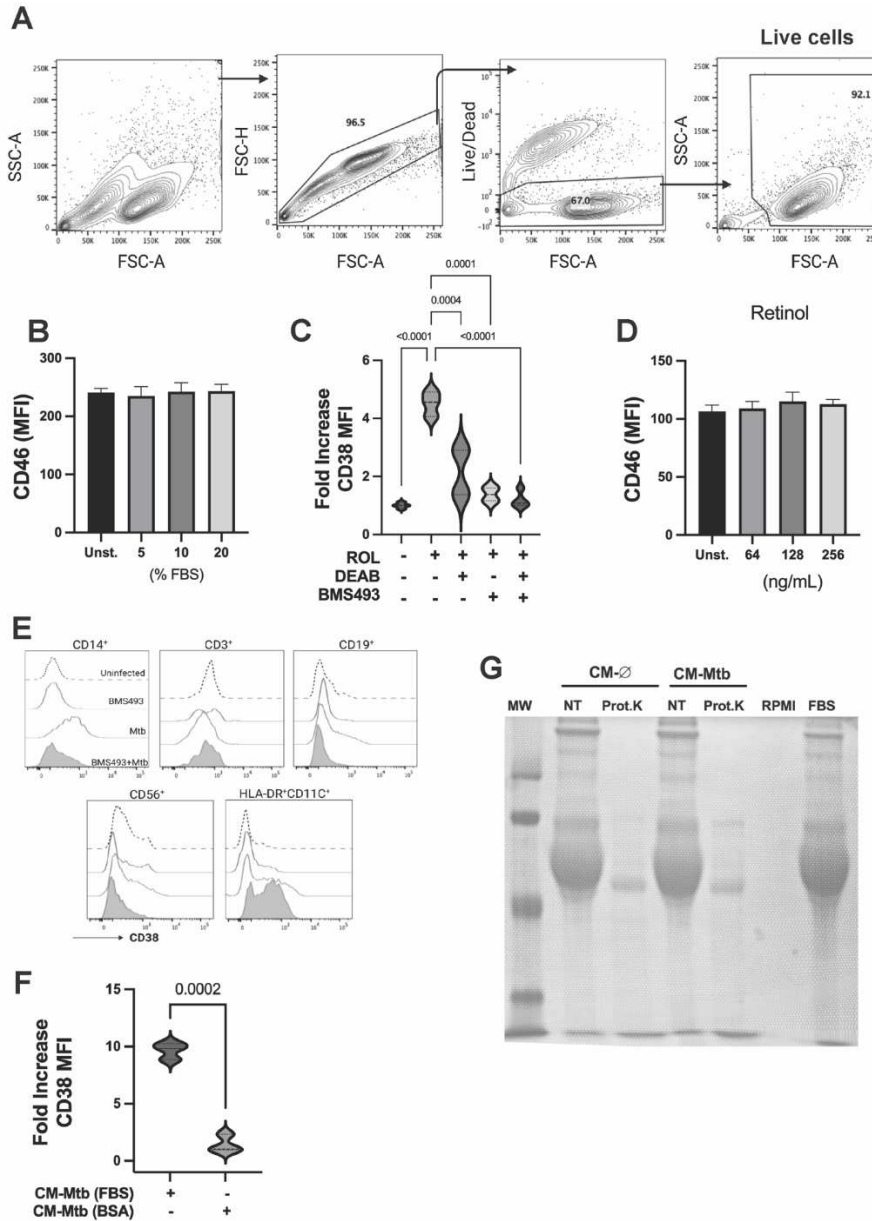


## B Lung environment



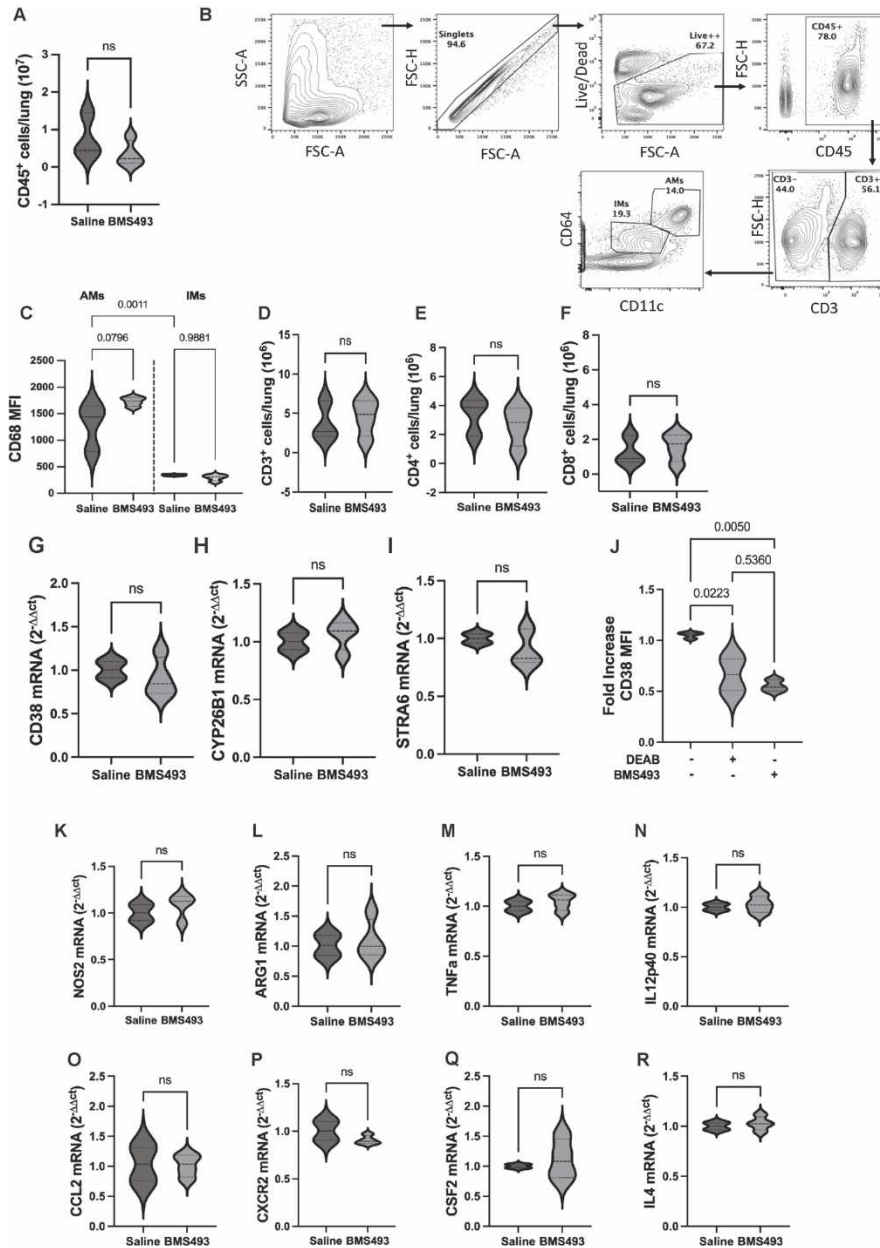
**Fig. 6: Proposed model for endogenous RAR activation by Mtb.** Endogenous RAR activation axis contributes to Mtb infection both *in vitro* and *in vivo*. (A) Live Mtb release soluble non-proteinaceous factor(s) present in serum to activate the RAR pathway in monocytes. Extracellular processes are sufficient to produce the RAR activator(s), but whether intracellular Mtb can induce serum-dependent RAR activation was not addressed in the present study. Inhibition of RARs by pan-inverse agonist BMS493 abrogates RAREs expression and affects Mtb intracellular replication. (B) BMS493 treatment *in vivo* expands alveolar macrophages and influences control of Mtb replication.

## Supplemental figure 1: Menezes et al.



**Supplemental Fig. 1.** (A) Representative gating strategy of THP-1. All THP-1 data were gated the same. (B) Serum-free THP-1 cells were exposed to FBS at different concentrations for 48 hours, and CD46 expression was measured by flow cytometry. Results are means  $\pm$ SEM of data from one experiment performed in triplicates. (C) serum-free THP-1 cells were exposed to 4,4  $\mu$ M retinol in the presence or absence of 100  $\mu$ M DEAB or 3  $\mu$ M BMS493, and Fold increase of CD38 was measured by flow cytometry. Fold increase was calculated over unstimulated cells. Results are means  $\pm$ SEM of data from one experiment performed in triplicates. ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons was performed to determine significance. The p-value is shown. ns, not significant. (D) Serum-free THP-1 cells were exposed to retinol at different concentrations for 48 hours, and CD46 expression was measured by flow cytometry. Results are means  $\pm$ SEM of data from one experiment performed in triplicates. (E) CD38 expression in primary CD14<sup>+</sup> monocytes, T cells, B cells, NK cells and DCs. Representative histogram from one donor shows CD38 MFI on different cell types from human PBMC uninfected or exposed to Mtb (MOI 3) for 72 hours in the presence or absence of BMS493 (3  $\mu$ M). (F) Serum component(s) is required for the RAR-mediated CD38 expression induced by CM-Mtb. Mtb was incubated with RPMI with 10% FBS or 1% BSA for 24h as described in M&M. CM was exposed to serum-free THP-1 cells for 48 hours and CD38 MFI was measured by flow cytometry. Results are means  $\pm$ SEM of data from one experiment performed in triplicates. Unpaired t-test was performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. (G) Representative SDS-PAGE of untreated (NT) and proteinase-K treated (Prot. K) conditioned medium. Digestion efficiency was evaluated by the reduction of the BSA band.

## Supplemental figure 2: Menezes et al.



**Supplemental Fig. 2.** (A) BMS493 treatment does affect the number of CD45<sup>+</sup> leukocytes in lungs from Mtb-infected mice. Total viable CD45<sup>+</sup> leukocytes in the lungs. Results are means ±SEM of data from one experiment (n=3-4 animals). Unpaired t-test was performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. (B) Gate strategy used to validate AMs and IMs in the lungs manually. (C) CD68 expression in AMs and IMs population. and one-way ANOVA with multiple comparisons were performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. (D-F) Lymphocytes total counts. Unpaired t-test was performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. (G-I) mRNA expression of RA-regulated genes is unaltered in lungs from BMS493-treated Mtb-infected mice. Gene ratios (Saline/BMS493) from infected mouse lungs were determined by RT-qPCR 4 weeks post-infection. Saline (n=2), BMS493 (n=4). Unpaired t-test was performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. (J) Baseline CD38 expression by FBS-cultured THP-1 cells is inhibited by DEAB or BMS493 treatment. FBS-cultured THP-1 cells were exposed to DEAB (100 μM) or BMS493 (3 μM) for 48h in the presence of 10% FBS. One-way ANOVA with multiple comparisons was performed to determine significance. ns, not significant; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. (K-R) mRNA expression of genes involved in cells inflammation, expansion, and migration are unaltered in lungs from BMS493-treated Mtb-infected mice. Gene ratios (Saline/BMS493) from infected mouse lungs were determined by RT-qPCR 4 weeks post-infection. Saline (n=2), BMS493 (n=4). Unpaired t-test was performed to determine significance. ns, not significant.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos da interação entre o Mtb e o soro fetal bovino (FBS) na ativação dos receptores RAR do hospedeiro, bem como a via de ácido retinoico endógeno durante a infecção por Mtb *in vitro* e *in vivo*.

Diversos métodos de cultura celular empregam o uso do FBS, que contém retinoides (NAPOLI, 1986). Primeiramente investigamos se o FBS ativa os receptores RAR em células de linhagem THP-1. Para isso, desenvolvemos um sistema *in vitro* para estudar a atividade endógena de RAR. Observamos que células THP-1 cultivadas na presença de FBS expressaram elevados níveis de CD38 quando comparado à células cultivadas com BSA, esse dado pode ser explicado pela presença de retinoides no FBS (KEITH RANDOLPH; SIMON, 1993; MCGUIRE et al., 1982; NAPOLI, 1986). Reforçando essa hipótese, células cultivadas em FBS apresentaram redução na expressão do CD38 quando expostas ao DEAB (inibidor de ALDHs) e BMS493 (inibidor de RAR). Além disso, células THP-1 cultivadas em BSA e estimuladas com diferentes concentrações de FBS, retinol e RA resgataram a expressão do CD38 de maneira dependente de RAR. Estes dados sugerem que o FBS pode afetar a expressão basal de genes RAREs e que o estudo do metabolismo de retinoides em monócitos e macrófagos devem considerar os efeitos do FBS utilizado no meio de cultura porque isso pode mascarar a sinalização dos retinoides produzidos endogenamente. A exemplo, a descoberta do mecanismo de ação da insulina em células musculares esqueléticas só foi revelada sob condições *serum-free* (KAIN CHING et al., 2010; KLIP; LI; LOGAN, 1984). Isso demonstra que protocolos envolvendo condições *serum-free* são ferramentas importantes nas pesquisas metabólicas e biologia molecular.

Nossos resultados demonstraram que a via RAR do hospedeiro é ativada pelo Mtb em monócitos humanos (CD14<sup>+</sup>) do PBMC e monócitos THP-1, mas não em linfócitos, células NK e células dendríticas. A ativação dos receptores RAR também foi analisada por meio da expressão de genes regulados por RA como DHRS3, ALDH1A1 e RARG. Todos estes genes estavam altamente expressos durante a infecção pelo Mtb em células THP-1. Interessantemente, a expressão desses genes durante a infecção foi dependente dos receptores RAR, reforçando a hipótese que a via endógena RAR do hospedeiro é ativada durante a infecção. Corroborando a estes achados, Bouttier e colaboradores (2019) demonstraram que durante a infecção pelo Mtb em macrófagos, os *motifs* de ligação de receptores RAR estavam enriquecidos, o que fortalece a hipótese de que esta via é ativada durante a infecção (BOUTTIER et al., 2016).

Neste trabalho também demonstramos várias linhas de evidências que sugerem que a interação entre Mtb e FBS regula a via RAR em monócitos. Dados provenientes de experimentos com meios condicionados do Mtb e *M. bovis* revelaram que produtos liberados pela bactéria viva, mas não morta, induz de forma robusta a expressão do CD38 de maneira dependente de RAR, sugerindo que estas bactérias metabolizam componentes do soro para regular a resposta do hospedeiro a nível transcricional. Este mecanismo é proposto na Fig 6 A (manuscrito). Adicionalmente, esse efeito não foi mediado por ação de proteínas, como demonstrado pelos experimentos com proteinase K, apontando assim para a possibilidade de ser um fator solúvel. Sendo assim, experimentos envolvendo espectrometria de massas deverão ser realizados visando a identificação da natureza desse fator. Até o presente momento, *all-trans*-ácido retinoico é o único ligante natural dos três subtipos do receptor RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), ao passo que *9-cis*-ácido retinoico atua como ligante de RARs ou RXRs (MCCARROLL et al., 2006; TANEJA et al., 1996; ZOU; HONG; LOTAN, 1999), diante disso, sugerimos que RA ou uma molécula com propriedades semelhantes ao RA possa ser o produto liberado por micobactérias. Estes dados também trazem grandes implicações para a descoberta de novos biomarcadores, uma vez que a identificação dos fator(es) solúveis, metabólitos no soro ou plasma de pacientes com TB podem revelar quais as vias que estão envolvidas no desenvolvimento e resolução da doença (WEINER et al., 2018). Além disso, experimentos posteriores deverão ser realizados para investigar se o Mtb também interage com o soro humano para ativar RAR do hospedeiro.

Sabendo que enzimas ALDHs são elementos chave no metabolismo da vitamina A (NIU et al., 2016), os dados obtidos evidenciaram que a ativação do eixo RAR/CD38 induzido pelo meio condicionado do Mtb não é dependente de ALDHs do hospedeiro, o que sugere que o metabólito produzido durante a interação Mtb/FBS possa atuar diretamente no RAR do hospedeiro. Nesse sentido, já foi demonstrado a capacidade da enzima bcALDH1A1 purificada de *Bacillus cereus* em realizar a conversão de retinaldeído para ácido retinoico *in vitro* (HONG et al., 2016). Semelhantemente, bactérias filamentosas segmentadas (SFB) e *Bifidobacterium bifidum* cultivadas na presença de retinol são capazes de produzir ácido retinoico *in vitro* (WOO et al., 2021). Já foi demonstrado que SFB e *B. bifidum* são fonte direta de ácido retinoico no intestino de camundongos e regulam a resposta RAR de células intestinais do hospedeiro para aumentar a resposta contra patógenos (WOO et al., 2021). Entretanto, se ALDHs do Mtb, ou outras enzimas, participam da produção de RA durante a infecção e ativam RAR do hospedeiro deverão ser investigados em experimentos futuros.



A respeito de receptores nucleares, a ativação de diferentes famílias de receptores como por exemplo, PPAR- $\gamma$  e TR4 estão associados à susceptibilidade do crescimento do Mtb durante infecção em monócitos humanos (MAHAJAN et al., 2012). Corroborando estes achados, experimentos de infecção em camundongos BALB/c evidenciaram que macrófagos pulmonares *knockouts* para o gene PPAR- $\gamma$  controlam melhor a infecção, sugerindo que Mtb ativa estes receptores para sobrevivência em macrófagos pulmonares. Além disso, esse feito demonstrou ser célula-específico, uma vez que não foi observado diferenças no crescimento do Mtb em macrófagos peritoneais e da medula, ambos *knockouts* para PPAR- $\gamma$  (GUIRADO et al., 2018). Por outro lado, foi demonstrado que o *knockdown* dos receptores nucleares VDR e LXR $\alpha$  resultou em maior carga bacteriana, sugerindo que quando ativados, estes receptores estão envolvidos no controle da infecção em monócitos humanos (MAHAJAN et al., 2012). Sendo assim, os receptores nucleares podem ser um importante alvo molecular na regulação da infecção por Mtb. Dessa forma, compreender as interações entre o Mtb e a via RARE do hospedeiro tanto na eliminação do patógeno quanto na doença são de extrema importância para o desenvolvimento de novas terapias que favoreçam o aumento de uma resposta imune protetora.

Tendo isso em vista, o nosso próximo passo foi investigar qual a contribuição dos receptores RAR no contexto da infecção por Mtb *in vivo*. Dados obtidos a partir do nosso modelo murino de tuberculose (*high-dose*) mostrou uma tendência de menor carga bacteriana nos pulmões de camundongos tratados com BMS493. No entanto, esse fenótipo não alcançou significância estatística, o que poderia ser explicado pelo baixo número de animais utilizados nos experimentos (n=4). Interessantemente, esta resposta foi associada com aumento na frequência e contagem absoluta de macrófagos alveolares CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> durante a infecção, bem como a redução na expressão do CD38, sem impactar a população de macrófagos intersticiais. Isso sugere que os efeitos do BMS493 possam ser célula-específicos, e que macrófagos alveolares desempenham um papel predominante nos efeitos mediados por RAR durante a infecção pelo Mtb. Um estudo realizado por Trasino e colaboradores (2020) em camundongos C57BL/6 knockout para o gene LRAT, incapazes de sintetizar e armazenar ésteres de retinol no pulmão, fígado e outros tecidos, demonstrou alta expressão de células expressando o marcador de macrófagos F4/80 no pulmão de animais LRAT -/- comparado aos animais WT infectados, no entanto essas populações não foram estudadas de maneira individual (TRASINO et al., 2020). Nesse mesmo modelo, foi observado redução na expressão de genes RARES no pulmão, o que pode ser explicado pela redução de retinol armazenado nos tecidos,

isso também foi associado com o aumento na expressão de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , com mínima diferença na carga bacteriana pulmonar (TRASINO et al., 2020).

Acredita-se que macrófagos alveolares são o primeiro tipo celular a entrar em contato e fagocitar o Mtb no modelo murino de infecção por aerossol, e que estas células apresentam um perfil anti-inflamatório (M2), representando um nicho favorável à replicação e disseminação do Mtb (COHEN et al., 2018; HUANG et al., 2018a; PISU et al., 2020; SRIVASTAVA; ERNST; DESVIGNES, 2014). No entanto, o mecanismo pelo qual o BMS493 induziu a expansão de macrófagos alveolares em nosso modelo *in vivo*, e como essa expansão se correlaciona com a redução marginal da carga bacteriana no pulmão, deverá a ser investigado. Hashimoto e colaboradores (2013) demonstrou que macrófagos residentes de tecidos se originam independentemente de monócitos da circulação e progenitores hematopoiéticos (HASHIMOTO et al., 2013), e esse fenômeno é dependente da produção local de IL-4, IL-13, CSF-1 e GM-CSF, citocinas importantes na expansão local do *pool* macrófagos residentes (HASHIMOTO et al., 2013; JENKINS et al., 2013). Além disso, expansão de macrófagos residentes pode ocorrer em resposta às infecções para o controle de patógenos (JENKINS et al., 2011, 2013). Dessa forma, hipotetizamos que BMS493 induz a expansão local de macrófagos alveolares por meio do aumento da produção dessas citocinas, polarizando estas células para perfil mais pro-inflamatório que é capaz de controlar a replicação do Mtb. No entanto, não observamos diferenças entre os grupos na expressão de genes envolvidos na migração celular, inflamação e expansão no pulmão total destes camundongos infectados (Figura suplementar 2K-R – manuscrito). Sendo assim, investigações posteriores deverão ser realizadas em macrófagos alveolares isolados. De fato, análises de scRNA-seq relevou a presença de duas subpopulações macrófagos alveolares no pulmão de camundongos infectados com Mtb as quais apresentaram um perfil pró-inflamatório (M1) com aumento na expressão de genes inflamatórios e genes associados ao metabolismo de glicose (PISU et al., 2021), sugerindo que estas subpopulações controlem melhor a infecção, corroborando à hipótese mencionada anteriormente.

Em suma, este trabalho é o primeiro a mostrar que a via endógena RAR do hospedeiro regula a infecção pelo Mtb *in vitro* e *in vivo*. A inibição farmacológica dos receptores RAR induz a expansão de macrófagos alveolares que foi associada com uma tendência de melhor controle da infecção. Portanto, estes dados sugerem que os receptores RAR podem ser um alvo terapêutico para o tratamento da tuberculose pulmonar.



## 5 CONCLUSÃO

Concluimos com os dados apresentados nesta tese que células THP-1 cultivadas com FBS ativam uma resposta endógena dependente de RAR, demonstrando a importância de considerar o potencial efeito do FBS nos fenótipos em estudos que envolvam metabolismo de retinoides em monócitos e macrófagos. Além disso, concluimos que a via endógena RA/RAR do hospedeiro é ativada durante a infecção pelo Mtb. Paralelamente, observamos que o Mtb metaboliza componentes presentes no FBS para regular a resposta RAR do hospedeiro de maneira independente de ALDHs do hospedeiro. A inibição dos receptores RAR expandiu macrófagos alveolares nos pulmões de camundongos infectados que foi associado com uma redução da carga bacteriana. Em suma, sugerimos que em contato com uma fonte de vitamina A, o Mtb ativa a via endógena RAR do hospedeiro para regular a composição de macrófagos alveolares nos pulmões e beneficiar a replicação intracelular.

## 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.
- AHMAD, I. et al. Serum zinc levels and its association with vitamin A levels among tuberculosis patients. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 130, 2014.
- 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. 1761–1775, 2013.
- ALBALAT, R. The retinoic acid machinery in invertebrates: Ancestral elements and vertebrate innovations. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 313, n. 1–2, p. 23–35, 2009.
- ALLIE, N. et al. Prominent role for T cell-derived Tumour Necrosis Factor for sustained control of Mycobacterium tuberculosis infection. **Scientific Reports** 2013 3:1, v. 3, n. 1, p. 1–14, 9 maio 2013.
- AL-MEKHLAFI, H. M. et al. Giardiasis and Poor Vitamin A Status among Aboriginal School Children in Rural Malaysia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 523, set. 2010.
- ARMIJOS, R. X. et al. Adjunctive micronutrient supplementation for pulmonary tuberculosis. **Salud publica de Mexico**, v. 52, n. 3, p. 185–189, 2010.
- AUSTENAA, L. M. et al. Retinoic acid dampens LPS-induced NF- $\kappa$ B activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF- $\kappa$ B reporter mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 726–734, 2009.
- AUSTENAA, L. M. I. et al. Vitamin A status significantly alters nuclear factor- $\kappa$ B activity assessed by in vivo imaging. **FASEB Journal**, v. 18, n. 11, p. 1255–1257, 2004.
- BABUNOVIC, G. H. et al. CRISPR Interference Reveals That All- Trans -Retinoic Acid Promotes Macrophage Control of Mycobacterium tuberculosis by Limiting Bacterial Access to Cholesterol and Propionyl Coenzyme A. **mBio**, v. 13, n. 1, p. 1–19, 2022.
- 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, 12 dez. 2005.
- BANG, Y. et al. Serum amyloid A delivers retinol to intestinal myeloid cells to promote adaptive immunity. **Science**, v. 373, n. 6561, 2021.
- 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.

BEHR, M. A.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the timetable of tuberculosis. **BMJ**, v. 362, 23 ago. 2018.

BELATIK, A. et al. Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 114–123, 2012.

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

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.

BIYIKLI, O. O. et al. Role of Toll-Like Receptors in Tuberculosis Infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 20224, 1 out. 2016.

BOURIGAULT, M. L. et al. Relative contribution of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 1, n. 1, p. 47, 1 out. 2013.

BOUTTIER, 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.

BRADBURY, M. G.; MORENO, C. Effect of lipoarabinomannan and mycobacterium on tumour necrosis factor production by different populations of murine macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, n. 1, p. 57–63, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Tratamento Diretamente Observado da Tuberculose na Atenção Básica: Protocolo de Enfermagem.

BRASIL. Manual de recomendações PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL.

BROADHURST, M. J. et al. Upregulation of retinal dehydrogenase 2 in alternatively activated macrophages during retinoid-dependent type-2 immunity to helminth infection in mice. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 8, ago. 2012.

BUKHARI, M. et al. TLR8 gene polymorphism and association in bacterial load in southern Punjab of Pakistan: an association study with pulmonary tuberculosis. **International journal of immunogenetics**, v. 42, n. 1, p. 46–51, 1 fev. 2015.

CAMBIER, C. J.; FALKOW, S.; RAMAKRISHNAN, L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1497–1509, 18 dez. 2014.

- CHAN, J. et al. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, n. 4, p. 1111–1122, 1 abr. 1992.
- CHAU, N. et al. Relationship between Plasma Retinol and Infectious Diseases in the Elderly. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 44, n. 5–6, p. 256–262, 2000.
- CHEN, N.; ONISKO, B.; NAPOLI, J. L. The nuclear transcription factor RAR $\alpha$  associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 30, p. 20841–7, 25 jul. 2008.
- CHENERY, A. et al. The Retinoic Acid-Metabolizing Enzyme Cyp26b1 Regulates CD4 T Cell Differentiation and Function. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72308, 22 ago. 2013.
- CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 1, p. 257–270, 1 jan. 1995.
- COHEN, S. B. et al. Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 3, p. 439–446.e4, 2018.
- COLEMAN, M. M. et al. All-trans retinoic acid augments autophagy during intracellular bacterial infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 59, n. 5, p. 548–556, 2018.
- COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid-dependent mechanism. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 8, p. 1757–1764, 6 ago. 2007.
- COOPER, A. M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2243–2247, 1 dez. 1993.
- COPPA, A. et al. The p85 $\alpha$  regulatory subunit of PI3K mediates cAMP-PKA and retinoic acid biological effects on MCF7 cell growth and migration. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 5, p. 1627–1635, 21 fev. 2012.
- DE GIER, B. et al. Helminth infections and micronutrients in school-age children: a systematic review and meta-analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1499–1509, 1 jun. 2014.
- DEREBE, M. G. et al. Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection. **eLife**, v. 3, n. July2014, p. 1–18, 2014.
- DONALD, P. R. et al. Droplets, dust and Guinea pigs: An historical review of tuberculosis transmission research, 1878-1940. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 22, n. 9, p. 972–982, 1 set. 2018.
- EHLERS, S. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. Suppl 2, p. ii37, 1 nov. 2003.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 8, p. 1170–1178, 2009.

FABRI, M. et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. **Science translational medicine**, v. 3, n. 104, 12 out. 2011.

FARINELLO, D. et al. A retinoic acid-dependent stroma-leukemia crosstalk promotes chronic lymphocytic leukemia progression. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

FLESCH, I. E. A.; KAUFMANN, S. H. E. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. **Infection and immunity**, v. 58, n. 8, p. 2675–2677, 1990a.

FLESCH, I. E. A.; KAUFMANN, S. H. E. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. **Infection and immunity**, v. 58, n. 8, p. 2675–2677, 1990b.

FLYNN, J. A. L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2249–2254, 1 dez. 1993.

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

FRIEDEN, T. R. et al. Vitamin A levels and severity of measles. New York City. **American journal of diseases of children (1960)**, v. 146, n. 2, p. 182–186, 1992.

GEISSMANN, F. et al. Retinoids Regulate Survival and Antigen Presentation by Immature Dendritic Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 4, p. 623, 8 ago. 2003.

GHYSELINCK, N. B. et al. Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 41, n. 3, p. 425–447, 1 maio 2002.

GIDEON, H. P. et al. Multimodal profiling of lung granulomas in macaques reveals cellular correlates of tuberculosis control. **Immunity**, v. 55, n. 5, p. 827- 846.e10, 10 maio 2022.

GINAWI, I. A. M. et al. Effect Of Zinc And Vitamin A Supplementation Along With Inter-Tubercular Treatment In Pulmonary Tuberculosis In North Indian Patients. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 9, p. 3426, 2013.

GIVER, C. R. et al. IMPACT-TB\*: A Phase II Trial Assessing the Capacity of Low Dose Imatinib to Induce Myelopoiesis and Enhance Host Anti-Microbial Immunity Against Tuberculosis. \*Imatinib Mesylate per Oral As a Clinical Therapeutic for TB. **Blood**, v. 134, n. Supplement\_1, p. 1050–1050, 13 nov. 2019.

GOVERSE, G. et al. Vitamin A Controls the Presence of ROR $\gamma$  + Innate Lymphoid Cells and Lymphoid Tissue in the Small Intestine . **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 12, p. 5148–5155, 2016.

GRAUSTEIN, A. D. et al. TLR9 gene region polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Vietnam. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 95, n. 2, p. 190–196, 1 mar. 2015.

GROBLER, L. et al. Nutritional supplements for people being treated for active tuberculosis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2016, n. 6, 29 jun. 2016.

GUIRADO, E. et al. Deletion of PPAR $\gamma$  in lung macrophages provides an immunoprotective response against *M. tuberculosis* infection in mice. **Tuberculosis**, v. 111, n. May, p. 170–177, 2018.

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

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.

HAMMERSCHMIDT, S. I. et al. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 11, p. 2483, 10 out. 2008.

HANDBERG-THORSAGER, M. et al. The ancestral retinoic acid receptor was a low-affinity sensor triggering neuronal differentiation. fev. 2018.

HANEKOM, W. A. et al. Vitamin A status and therapy in childhood pulmonary tuberculosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 131, n. 6, p. 925–927, 1 dez. 1997.

HARRIES, A. D.; KUMAR, A. M. V. Challenges and Progress with Diagnosing Pulmonary Tuberculosis in Low- and Middle-Income Countries. **Diagnostics**, v. 8, n. 4, p. 78, 23 nov. 2018.

HASHIMOTO, D. et al. Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792–804, 4 abr. 2013.

HIZEL, K. et al. The influence of BCG immunisation on tuberculin reactivity and booster effect in adults in a country with a high prevalence of tuberculosis. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 11, p. 980–983, 2004.

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.

HOUDA BEN, A. et al. Extrapulmonary Tuberculosis: Update on the Epidemiology, Risk Factors and Prevention Strategies. **International Journal of Tropical Diseases**, v. 1, n. 1, 31 dez. 2018.

- HU, Z. et al. Molecular basis for retinol binding by serum amyloid A during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 38, p. 19077–19082, 17 set. 2019.
- HUANG, L. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 4, p. 1135–1152, 2 abr. 2018a.
- HUANG, L. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 4, p. 1135, 4 abr. 2018b.
- HUSSELL, T.; BELL, T. J. **Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context**. **Nature Reviews Immunology**, fev. 2014.
- ICHIKAWA, S. et al. Hepatic Stellate Cells Function as Regulatory Bystanders. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5549–5555, 15 maio 2011.
- ITURRALDE, M. et al. Effect of iron and retinoic acid on the control of transferrin receptor and ferritin in the human promonocytic cell line U937. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1133, n. 3, p. 241–246, 3 fev. 1992.
- IWATA, M. et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 527–538, out. 2004.
- JACKSON, B. et al. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. **Human genomics**, v. 5, n. 4, p. 283–303, 2011.
- JACOBO-DELGADO, Y. M. et al. Retinoic acid induces antimicrobial peptides and cytokines leading to *Mycobacterium tuberculosis* elimination in airway epithelial cells. **Peptides**, v. 142, 1 ago. 2021.
- JAENSSON-GYLLENBÄCK, E. et al. Bile retinoids imprint intestinal CD103<sup>+</sup> dendritic cells with the ability to generate gut-tropic T cells. **Mucosal Immunology** 2011 4:4, v. 4, n. 4, p. 438–447, 2 fev. 2011.
- JAMAATI, H. et al. Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. OCT, 12 out. 2017.
- JAYARAMAN, P. et al. IL-1 $\beta$  promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 8, p. 4196–4204, 15 abr. 2013a.
- JAYARAMAN, P. et al. IL-1 $\beta$  promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 8, p. 4196–4204, 15 abr. 2013b.
- JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T H2 inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284–1288, 2011.

- JENKINS, S. J. et al. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 11, p. 2477, 10 out. 2013.
- JO, E. K. et al. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1087–1098, maio 2007.
- JOHANNEKE KLEINNIJENHUIS et al. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical & developmental immunology**, v. 2011, 2011.
- JOHNSON, E. E. et al. Role of Ferroportin in Macrophage-Mediated Immunity. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5099, dez. 2010.
- JUFFERMANS, N. P. et al. Interleukin-1 Signaling Is Essential for Host Defense during Murine Pulmonary Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 3, p. 902–908, 1 set. 2000.
- KAIN CHING, J. et al. A role for AMPK in increased insulin action after serum starvation. **J Physiol Cell Physiol**, v. 299, p. 1171–1179, 2010.
- KANAI, M.; RAZ, A.; GOODMAN, D. S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. **The Journal of clinical investigation**, v. 47, n. 9, p. 2025–2044, 1968.
- KARAMOUZIS, M. V.; PAPAVALASSILOU, A. G. Retinoid receptor cross-talk in respiratory epithelium cancer chemoprevention. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p. 10–16, 2005.
- KARYADI, E. et al. A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status. **The American journal of clinical nutrition**, v. 75, n. 4, p. 720–727, 2002.
- KEANE, J. et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 15, p. 1098–1104, 11 out. 2001a.
- KEANE, J. et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 15, p. 1098–1104, 11 out. 2001b.
- KEITH RANDOLPH, R.; SIMON, M. Characterization of Retinol Metabolism in Cultured Human Epidermal Keratinocytes\*. **The Journal Of Biological Chemistry and Molecular Biology**, v. 268, n. 13, p. 9198–9205, 1993.
- KIM, B. H.; KANG, K. S.; LEE, Y. S. Effect of retinoids on LPS-induced COX-2 expression and COX-2 associated PGE(2) release from mouse peritoneal macrophages and TNF-alpha release from rat peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology letters**, v. 150, n. 2, p. 191–201, 21 abr. 2004.



KIM, E. W. et al. Vitamin A Metabolism by Dendritic Cells Triggers an Antimicrobial Response against *Mycobacterium tuberculosis*. **mSphere**, v. 4, n. 3, 2019.

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. 107–119, 21 jul. 2015.

KLIP, A.; LI, G.; LOGAN, W. J. Induction of sugar uptake response to insulin by serum depletion in fusing L6 myoblasts. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1984.247.3.E291>, v. 10, n. 3, 1984.

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.

LARSON, L. M. et al. Adjusting retinol-binding protein concentrations for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, n. Suppl 1, p. 390S–401S, 1 jul. 2017.

LASKER, M. V.; NAIR, S. K. Intracellular TLR signaling: a structural perspective on human disease. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 1, p. 11–16, 1 jul. 2006.

LAWSON, L. et al. Essai randomisé contrôlé de l'utilisation du zinc et de vitamine A comme co-adjuvants dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 12, p. 1481–1490, 2010a.

LAWSON, L. et al. Randomized controlled trial of zinc and vitamin A as co-adjuvants for the treatment of pulmonary tuberculosis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 12, p. 1481–1490, 1 dez. 2010b.

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

LEE, Y. S.; JEONG, W. IL. Retinoic acids and hepatic stellate cells in liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. SUPPL.2, p. 75–79, 2012.

LENTI, E. et al. Transcription factor TLX1 controls retinoic acid signaling to ensure spleen development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 7, p. 2452–2464, 1 jul. 2016.

LEOPOLD WAGER, C. M.; ARNETT, E.; SCHLESINGER, L. S. *Mycobacterium tuberculosis* and macrophage nuclear receptors: What we do and don't know. **Tuberculosis**, v. 116, n. October 2018, p. S98–S106, 2019.

LIN, P. L. et al. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. **Nature medicine**, v. 20, n. 1, p. 75–79, 2014.

- LIU, P. T. et al. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. **PloS one**, v. 4, n. 6, 5 jun. 2009a.
- LIU, P. T. et al. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. **PloS one**, v. 4, n. 6, 5 jun. 2009b.
- LU, L. L. et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 433-443.e14, 6 out. 2016.
- LU, L. L. et al. IFN- $\gamma$ -independent immune markers of Mycobacterium tuberculosis exposure. **Nature Medicine** 2019 **25:6**, v. 25, n. 6, p. 977–987, 20 maio 2019.
- LU, T.-C. et al. Retinoic acid utilizes CREB and USF1 in a transcriptional feed-forward loop in order to stimulate MKP1 expression in human immunodeficiency virus-infected podocytes. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 18, p. 5785–94, set. 2008.
- MAHAJAN, S. et al. Mycobacterium tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR $\gamma$  and TR4 for Survival . **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5593–5603, 2012.
- MAIRE, A. et al. RAR-Specific Ligands and Their Combinations. **Cells**, v. 8, n. 1392, p. 1–24, 2019.
- MANICASSAMY, S. et al. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. **Nature medicine**, v. 15, n. 4, p. 401–409, abr. 2009.
- MARAKALALA, M. J. et al. Macrophage heterogeneity in the immunopathogenesis of tuberculosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1028, 23 maio 2018.
- MARILL, J. et al. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. **Current drug metabolism**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2003.
- MARUYA, M. et al. Vitamin A-dependent transcriptional activation of the nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) is critical for the development and survival of B1 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 2, p. 722–727, 2011.
- MAYER-BARBER, K. D. et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 1023–1034, 23 dez. 2011.
- MCCARROLL, J. A. et al. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 79–89, 1 jan. 2006.
- MCCARTHY, N. E. et al. Proinflammatory V $\delta$ 2+ T cells populate the human intestinal mucosa and enhance IFN- $\gamma$  production by colonic  $\alpha\beta$  T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 5, p. 2752–2763, 1 set. 2013.

MCGUIRE, J. et al. The influence of retinoids on cultivated human keratinocytes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 6, n. 4, p. 630–639, 1 abr. 1982.

MEHTA, K. et al. Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 55, n. 3, p. 336–342, 1994.

METZLER, M. A.; SANDELL, L. L. Enzymatic Metabolism of Vitamin A in Developing Vertebrate Embryos. **Nutrients**, v. 8, n. 12, 15 dez. 2016.

MISHRA, A. et al. GM-CSF Dependent Differential Control of Mycobacterium tuberculosis Infection in Human and Mouse Macrophages: Is Macrophage Source of GM-CSF Critical to Tuberculosis Immunity? **Frontiers in Immunology**, v. 11, 23 jul. 2020.

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

MOHAN, V. P. et al. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host Immune Response in Chronic Persistent Tuberculosis: Possible Role for Limiting Pathology. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1847, 2001.

MORA, J. R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 685, set. 2008.

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.

MORSE, D.; BROTHWELL, D. R.; UCKO, P. J. TUBERCULOSIS IN ANCIENT EGYPT. **The American review of respiratory disease**, v. 90, p. 524–541, out. 1964.

MORTHA, A. et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. **Science**, v. 343, n. 6178, 28 mar. 2014.

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. 256–260, 13 jul. 2007.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 541–566, 10 fev. 2017.

NA, S. Y. et al. Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 12, p. 7674–7680, 19 mar. 1999.

NAPIER, R. J. et al. Imatinib-sensitive tyrosine kinases regulate mycobacterial pathogenesis and represent therapeutic targets against tuberculosis. **Cell host & microbe**, v. 10, n. 5, p. 475–485, 17 nov. 2011.

NAPOLI, J. L. Quantification of physiological levels of retinoic acid. **Methods in enzymology**, v. 123, n. C, p. 112–124, 1 jan. 1986.

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 2017.

NICHOLSON, S. et al. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 5, p. 2293–2302, 1 maio 1996.

NIU, H. et al. Pathways of retinoid synthesis in mouse macrophages and bone marrow cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 6, p. 797–810, jun. 2016.

O'CONNOR, G. et al. Sharpening nature's tools for efficient tuberculosis control: A review of the potential role and development of host-directed therapies and strategies for targeted respiratory delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 102, p. 33–54, 1 jul. 2016.

O'CONNOR, G. et al. Inhalable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles encapsulating all-trans-Retinoic acid (ATRA) as a host-directed, adjunctive treatment for Mycobacterium tuberculosis infection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 134, p. 153–165, 2019.

OH, J. et al. Evaluation of vitamin status in patients with pulmonary tuberculosis. **Journal of Infection**, v. 74, n. 3, p. 272–280, 2017.

OH, J. et al. Assessment of Vitamin Status in Patients with Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: Potential Role of Vitamin A as a Risk Factor. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2019.

OHOKA, Y. et al. Retinoic Acid-Induced CCR9 Expression Requires Transient TCR Stimulation and Cooperativity between NFATc2 and the Retinoic Acid Receptor/Retinoid X Receptor Complex. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 733–744, 15 jan. 2011.

ONG, D. E.; CHYTIL, F. Specificity of cellular retinol-binding protein for compounds with vitamin A activity. **Nature**, v. 255, p. 74–75, 1975a.

ONG, D. E.; CHYTIL, F. Retinoic acid binding protein in rat tissue. Partial purification and comparison to rat tissue retinol binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 15, p. 6113–6117, 1975b.

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

PAKASI, T. A. et al. Vitamin A deficiency and other factors associated with severe tuberculosis in timor and Rote Islands, East Nusa Tenggara Province, Indonesia. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 9, p. 1130–1135, 2009.

PAKASI, T. A. et al. Zinc and vitamin A supplementation fails to reduce sputum conversion time in severely malnourished pulmonary tuberculosis patients in Indonesia. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2010.

PALUCCI, I.; DELOGU, G. Host Directed Therapies for Tuberculosis: Futures Strategies for an Ancient Disease. **Chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 172–180, 1 ago. 2018.

PETERSEN, E. N. The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 86, n. 369 S, p. 7–13, 1992.

PISU, D. et al. Dual RNA-Seq of Mtb-Infected Macrophages In Vivo Reveals Ontologically Distinct Host-Pathogen Interactions. **Cell Rep.**, v. 30, n. 2, p. 335–350, 2020.

PISU, D. et al. Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 9, 22 jul. 2021.

POLLOCK, L. M. et al. Retinoic acid signaling is essential for maintenance of the blood-retinal barrier. **FASEB Journal**, v. 32, n. 10, p. 5674–5684, 1 out. 2018.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology** 2012 12:5, v. 12, n. 5, p. 352–366, 20 abr. 2012.

RASTINEJAD, F. et al. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. **The EMBO journal**, v. 19, n. 5, p. 1045–54, 1 mar. 2000.

REFAI, A. et al. Mycobacterium tuberculosis Virulent Factor ESAT-6 Drives Macrophage Differentiation Toward the Pro-inflammatory M1 Phenotype and Subsequently Switches It to the Anti-inflammatory M2 Phenotype. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. SEP, 18 set. 2018.

RILEY, R. L. et al. Infectiousness of air from a tuberculosis ward. Ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. **The American review of respiratory disease**, v. 85, p. 511–525, abr. 1962.

RILEY, R. L. What nobody needs to know about airborne infection. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 1, p. 7–8, 2001.

ROACH, D. R. et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 9, p. 4620–4627, 1 maio 2002.

ROCHETTE-EGLY, C.; GERMAIN, P. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). **Nuclear receptor signaling**, v. 7, n. D, 2009.

ROTHCHILD, A. C. et al. iNKT cell production of GM-CSF controls Mycobacterium tuberculosis. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 1, jan. 2014.

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 and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1214, 1 jul. 2015.

- 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.
- SCANGA, C. A. et al. Reactivation of latent tuberculosis: Variations on the cornell murine model. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4531–4538, 1999.
- SCHORAH, C. J.; LOUW, J. A.; LABADARIOS, D. Blood vitamin concentrations during the acute-phase response. **Critical care medicine**, v. 21, n. 10, p. 1615–1616, 1993.
- SCHÜLE, R. et al. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 14, p. 6092–6, 15 jul. 1991.
- SEMBA, R. D. Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 3, p. 719–727, 1999.
- SHASTRI, M. D. et al. Role of Oxidative Stress in the Pathology and Management of Human Tuberculosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.
- 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, R. et al. **Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis.** **Journal of Applied Microbiology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31595643/>>. Acesso em: 2 jul. 2020
- SINGHAL, A. et al. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. **Science translational medicine**, v. 6, n. 263, 19 nov. 2014.
- SITNIK, K. M. et al. Mesenchymal cells regulate retinoic acid receptor-dependent cortical thymic epithelial cell homeostasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 10, p. 4801–4809, 15 maio 2012.
- SRIVASTAVA, S.; ERNST, J. D.; DESVIGNES, L. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. **Immunological reviews**, v. 262, n. 1, p. 179–192, 1 nov. 2014.
- SUCHDEV, P. S. et al. Soil-Transmitted Helminth Infection and Nutritional Status Among Urban Slum Children in Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 299, 2 fev. 2014.
- 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.
- SZYMAŃSKI, Ł. et al. Retinoic Acid and Its Derivatives in Skin. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 1–14, 2020.

TAKAHASHI, H. et al. TGF- $\beta$  and retinoic acid induce miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains helper T cell plasticity. **Nature immunology**, v. 13, n. 6, p. 587, jun. 2012.

TAN, T. et al. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1417–1429, set. 2006.

TANEJA, R. et al. Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR $\beta$ 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 6197–6202, 11 jun. 1996.

TELIAS, M. et al. Retinoic Acid Induces Hyperactivity, and Blocking Its Receptor Unmasks Light Responses and Augments Vision in Retinal Degeneration. **Neuron**, v. 102, n. 3, p. 574–586.e5, 2019.

TÉLLEZ-NAVARRETE, N. A. et al. Malnutrition and tuberculosis: the gap between basic research and clinical trials. **Journal of infection in developing countries**, v. 15, n. 3, p. 310–319, 31 mar. 2021.

THOMA-USZYNSKI, S. et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5508, p. 1544–1547, 23 fev. 2001a.

THOMA-USZYNSKI, S. et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5508, p. 1544–1547, 23 fev. 2001b.

THORNTON, K. A. et al. Vitamin A Deficiency Is Associated with Gastrointestinal and Respiratory Morbidity in School-Age Children. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 4, p. 496, 2014.

TRASINO, S. E. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Infection is Exacerbated in Mice Lacking Lecithin:Retinol Acyltransferase. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1866, n. 11, p. 165909, 11 nov. 2020.

VAN DE PAVERT, S. A. et al. Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. **Nature 2014 508:7494**, v. 508, n. 7494, p. 123–127, 19 mar. 2014.

VERWAY, M. et al. Vitamin D Induces Interleukin-1 $\beta$  Expression: Paracrine Macrophage Epithelial Signaling Controls *M. tuberculosis* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

VICENTE-SUAREZ, I. et al. Unique lamina propria stromal cells imprint the functional phenotype of mucosal dendritic cells. **Mucosal Immunology 2015 8:1**, v. 8, n. 1, p. 141–151, 18 jun. 2014.

VISSER, M. E. et al. The effect of vitamin A and zinc supplementation on treatment outcomes in pulmonary tuberculosis: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 93–100, 1 jan. 2011.

VOGT, G.; NATHAN, C. In vitro differentiation of human macrophages with enhanced antimycobacterial activity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 10, p. 3889–3901, 3 out. 2011.

WANG, B. et al. Maternal Retinoids Increase PDGFR $\alpha$ + Progenitor Population and Beige Adipogenesis in Progeny by Stimulating Vascular Development. **EBioMedicine**, v. 18, p. 288–299, 2017.

WANG, J. et al. Adjunctive vitamin A and D during pulmonary tuberculosis treatment: a randomized controlled trial with a 2  $\times$  2 factorial design. **Food & function**, v. 11, n. 5, p. 4672–4681, 1 maio 2020.

WANG, X.; ALLEN, C.; BALLOW, M. Retinoic acid enhances the production of IL-10 while reducing the synthesis of IL-12 and TNF-alpha from LPS-stimulated monocytes/macrophages. **Journal of clinical immunology**, v. 27, n. 2, p. 193–200, mar. 2007.

WATSON, P. J.; FAIRALL, L.; SCHWABE, J. W. R. Nuclear hormone receptor co-repressors: Structure and function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 2, p. 440–449, 2012.

WEINER, J. et al. Metabolite changes in blood predict the onset of tuberculosis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.

WELIN, A. et al. Importance of Phagosomal Functionality for Growth Restriction of Mycobacterium tuberculosis in Primary Human Macrophages. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 5, p. 508, ago. 2011.

WELLS, W. F.; RATCLIFFE, H. L.; CRUMB, C. On the mechanics of droplet nuclei infection; quantitative experimental air-borne tuberculosis in rabbits. **American journal of hygiene**, v. 47, n. 1, p. 11–28, 1948.

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.

WHO. Treatment of tuberculosis: guidelines. 2010.

WHO. **Global tuberculosis report 2021. Geneva.**

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

WOO, V. et al. Commensal segmented filamentous bacteria-derived retinoic acid primes host defense to intestinal infection. **Cell Host and Microbe**, v. 29, n. 12, p. 1744- 1756.e5, 2021.

XU, Q. et al. The cytoplasmic nuclear receptor RAR $\gamma$  controls RIP1 initiated cell death when cIAP activity is inhibited. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.



YOUNG, C.; WALZL, G.; DU PLESSIS, N. **Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis.** *Mucosal Immunology* Springer Nature, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41385-019-0226-5>>. Acesso em: 2 jul. 2020

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *The Journal of clinical investigation*, v. 107, n. 1, p. 13–19, 2001.

ZOU, C. P.; HONG, W. K.; LOTAN, R. Expression of retinoic acid receptor  $\beta$  is associated with inhibition of keratinization in human head and neck squamous carcinoma cells. *Differentiation*, v. 64, n. 2, p. 123–132, 1999.

## 6 ANEXOS

Artigos em coautoria desenvolvidos durante o doutorado.

Delgobo, M., Mendes, D. A., Kozlova, E., Rocha, E. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Mascarin, L., ... & Báfica, A. (2019). An evolutionary recent IFN/IL-6/CEBP axis is linked to monocyte expansion and tuberculosis severity in humans. *Elife*, 8.



RESEARCH ARTICLE



### An evolutionary recent IFN/IL-6/CEBP axis is linked to monocyte expansion and tuberculosis severity in humans

**Murilo Delgobo<sup>1</sup>, Daniel AGB Mendes<sup>1</sup>, Edgar Kozlova<sup>1</sup>, Edroaldo Lummertz Rocha<sup>1,2</sup>, Gabriela F Rodrigues-Luiz<sup>1</sup>, Lucas Mascarin<sup>1</sup>, Greicy Dias<sup>1</sup>, Daniel O Patrício<sup>1</sup>, Tim Dierckx<sup>3</sup>, Maíra A Bicca<sup>1</sup>, Gaëlle Bretton<sup>4</sup>, Yonne Karoline Tenório de Menezes<sup>1</sup>, Márick R Starick<sup>1</sup>, Darcita Rovaris<sup>5</sup>, Joanita Del Moral<sup>6</sup>, Daniel S Mansur<sup>1</sup>, Johan Van Weyenbergh<sup>3\*</sup>, André Báfica<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunobiologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>2</sup>Boston Children's Hospital, Boston, United States; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute for Medical Research, Laboratory for Clinical and Epidemiological Virology, KU Leuven, Leuven, Belgium; <sup>4</sup>Laboratory of Molecular Immunology, The Rockefeller University, New York, United States; <sup>5</sup>Laboratório Central do Estado de Santa Catarina/LACEN, Florianópolis, Brazil; <sup>6</sup>Serviço de Hematologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil