

CAMILA DO NASCIMENTO ARAUJO

**Análise comparativa da maturação e do escape do fagossomo de diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marcia de Sá Guimarães

Versão original

São Paulo – SP  
2023

CAMILA DO NASCIMENTO ARAUJO

**Comparative analysis of phagosome maturation and escape of different species of the  
*Mycobacterium tuberculosis* complex in macrophages**

Thesis submitted to the Postgraduate Program in Microbiology of the Instituto de Ciências Biomédicas of the Universidade de São Paulo, to obtain the Doctor's degree in Sciences.

Scientific Field: Microbiology

Advisor: Prof. Ana Marcia de Sá Guimarães, Ph.D

Original version

São Paulo – SP  
2023

## RESUMO

ARAÚJO, C. N. **Análise comparativa da maturação e do escape do fagossomo de diferentes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos.** 2023. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A tuberculose (TB) é uma infecção, principalmente pulmonar, causada pelas bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *Mycobacterium canettii*. O MTBC, distribuído globalmente, evoluiu para adaptação em humanos ou animais, com a emergência de ecotipos com variados tropismos por espécies hospedeiras e distintos perfis de virulência. Ainda há lacunas no entendimento da resposta celular a cada um dos ecotipos do MTBC e *M. canettii*, por isso este estudo compara a dinâmica da infecção *in vitro* em células humanas THP-1 tipo macrófago por membros do MTBC (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* linhagens 5 e 6, *M. bovis*, *M. caprae*) e *M. canettii*, investigando a modulação da acidificação do fagossomo e a capacidade das bactérias em acessar o citosol dos macrófagos. A avaliação da maturação do fagossomo, realizada por espectrofluorímetro e por microscopia de fluorescência, mostrou que as estirpes inibiram a acidificação do fagossomo por pelo menos 3 horas pós-infecção, com exceção de *M. caprae*, que alcançou um perfil de fagossomo tardio com pH < 5,5. Apesar de incapaz de bloquear a acidificação fagossomal inicial, *M. caprae* ainda tem a replicação intracelular mais acentuada que *M. tuberculosis* após 24h de infecção, sugerindo alterações em mecanismos sensores de queda de pH, que ao não sentir o ambiente ácido, não reduz seu crescimento e seu metabolismo. Todas as estirpes de micobactérias testadas, apresentaram comportamento similar em inibir a montagem da bomba de prótons V-ATPase. No ensaio de acesso ao citosol, as micobactérias animais (*M. bovis* e *M. caprae*) apresentaram uma maior taxa de escape nas 24h iniciais de infecção. As micobactérias humanas (*M. tuberculosis* e *M. africanum* L5) se nivelaram aos ecotipos animais a partir de 96h, com as taxas de escape de *M. africanum* L5 e L6 se sobressaindo entre 120h a 168h de infecção. Células tratadas com concanamicina A (CMA), uma droga que inibe a queda de pH artificialmente, mostraram que a acidificação não é um *checkpoint* essencial para induzir as bactérias a romperem o fagossomo. Ao contrário, bactérias em células com a acidificação bloqueada superaram a taxa de escape de bactérias infectadas em células sem tratamento, sugerindo que o bloqueio da acidificação fagossomal está ligado a eficiência na permeabilização do fagossomo pelas micobactérias. Por fim, o alcance do citosol pelas micobactérias coincidiu com uma escalada na replicação

bacteriana. Os achados desse estudo sugerem que mutações genômicas e alterações em regulação gênica, algumas discutidas neste estudo, fazem com que os ecotipos do MTBC e *M. canettii* apresentem diferenças fenotípicas na maturação do fagossomo e no acesso ao citosol.

**Palavras-chave:** Tuberculose (TB). Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Maturação do fagossomo. Ruptura do fagossomo. Macrófagos THP-1.

## ABSTRACT

ARAÚJO, C. N. **Comparative analysis of phagosome maturation and escape among different species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex in macrophages.** 2023. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The tuberculosis (TB) is primarily a pulmonary infection caused by bacteria from the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and *Mycobacterium canettii*. The MTBC, globally distributed, has evolved to adapt to humans or animals, leading to the emergence of ecotypes with various host species tropisms and distinct virulence profiles. Gaps persist in understanding the cellular response to each MTBC and *M. canettii* ecotype. Therefore, this study compares the in vitro infection dynamics in human THP-1 macrophage-like cells by members of the MTBC (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* lineages 5 and 6, *M. bovis*, *M. caprae*) and *M. canettii*, investigating phagosome acidification modulation and the bacteria's ability to access the macrophages' cytosol. The evaluation of phagosome maturation, conducted using spectrofluorometry and fluorescence microscopy, revealed that the strains inhibited phagosome acidification for at least 3 hours post-infection, except for *M. caprae*, which attained a late phagosome profile with a pH < 5,5. Despite being unable to block initial phagosome acidification, *M. caprae* still has more pronounced intracellular replication than *M. tuberculosis* after 24 hours of infection, suggesting changes in pH drop sensing mechanisms, which, by not sensing the acidic environment, do not reduce its growth and metabolism. All tested mycobacterial strains exhibited similar behavior in inhibiting the assembly of the V-ATPase proton pump. In the cytosol access assay, animal mycobacteria (*M. bovis* and *M. caprae*) showed a higher escape rate in the initial 24 hours of infection. Human mycobacteria (*M. tuberculosis* and *M. africanum* L5) leveled with animal ecotypes after 96 hours, with *M. africanum* L5 and L6 outperforming between 120 to 168 hours of infection. Cells treated with concanamycin A (CMA), a drug that artificially inhibits pH drop, revealed that acidification is not an essential checkpoint to induce bacteria to rupture the phagosome. Conversely, bacteria in cells with blocked acidification surpassed the escape rate of bacteria in untreated cells, suggesting that phagosome acidification blockade is linked to the efficiency of mycobacterial phagosome permeabilization. Lastly, the cytosolic reach by mycobacteria coincided with an escalation in bacterial replication. The findings of this study suggest that genomic mutations

and changes in gene regulation, some discussed herein, cause MTBC ecotypes and *M. canettii* to present phenotypic differences in phagosome maturation and cytosol access.

**Keywords:** Tuberculosis (TB). *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Phagosome maturation. Phagosome rupture. THP-1 Macrophages.