UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Dissertação de Mestrado

ALEXANDRE IGNÁCIO DE SOUZA

**Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em camundongos
com capacidade diferente de elaborar resposta imune celular
contra *Mycobacterium tuberculosis***

Ribeirão Preto – SP

2014

ALEXANDRE IGNÁCIO DE SOUZA

Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em camundongos com capacidade diferente de elaborar resposta imune celular contra *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof^a Dr^a Vânia Luiza Deperon Bonato

Ribeirão Preto – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total o parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

de Souza, Alexandre Ignácio

Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em camundongos com capacidade diferente de elaborar resposta imune celular contra *Mycobacterium tuberculosis*; Orientadora: Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato – Ribeirão Preto, São Paulo, 2014.

67 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2014

1. Tuberculose experimental. 2. *Background* genético. 3. Macrófagos M1. Macrófagos M2.

Nome: **Alexandre Ignácio de Souza**

Título: Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em camundongos com capacidade diferente de elaborar resposta imune celular contra *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a).:

Instituição:

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a).:

Instituição:

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a).:

Instituição:

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Trabalho realizado no Laboratório de Modulação da Resposta Imune do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, com apoio financeiro do CNPq e da FAPESP.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela boa formação, pela boa educação, pelos bons exemplos e por me permitirem realizar meus sonhos de acordo com minhas vontades.

À minha família e aos meus amigos de Recife, por sempre me apoiar, por mandarem boas vibrações.

À banca avaliadora, pela participação e pela disponibilidade.

Aos colegas de laboratório, Amanda Goulart, Ana Flávia, José Seminati, Rafael Prado, Sandra Palma e Thaís Barbosa, por auxiliarem nos experimentos, por serem companhias agradáveis e serem prestativos.

Aos colegas que já fizeram parte do laboratório, Annie Piñeros, Cássia Alves e Marinaldo Neto, por suas colaborações nos experimentos e pela amizade.

Às técnicas do laboratório de Vacinas Gênicas, Ana Paula Masson, Izaíra Brandão e Wendy Rios, por todo tipo de auxílio prestado.

À técnica do aparelho de citometria, Denise Ferraz, pela aquisição das minhas amostras e por sempre estar à disposição.

À Dr. Simone Gusmão Ramos e à técnica Elaine Medeiros Floriano, pela confecção e análise das lâminas de histopatologia.

À Alexandre Cardoso, Anna Karoline Aguiar, Karoline Biffi e Cássia Alves por serem uma ótima companhia e pelos momentos de alegria.

À Alexandre Neves, Tharik Diogo e Josimar Dornelas, por propiciarem um ambiente feliz e agradável na República.

Aos amigos que adquiri durante a organização dos dois Cursos de Inverno e do projeto de extensão Imunologia nas Escolas, dos quais participei.

Aos amigos da pós-graduação e da FMRP.

Aos outros amigos que tive oportunidade de conhecer em Ribeirão Preto.

À secretária da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristina, e ao secretário do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Ronaldo, por todo auxílio prestado quando necessário.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia e à FMRP, por toda infraestrutura.

Ao Biotério Central, por fornecer os camundongos usados durante o trabalho.

Ao auxílio financeiro do CNPq e da FAPESP para a realização desse trabalho.

SOUZA, A. I. **Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em camundongos com capacidade diferente de elaborar resposta imune celular contra *Mycobacterium tuberculosis***. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Apesar de apenas 10% dos indivíduos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* desenvolverem tuberculose, essa doença causa a morte de milhares de pessoas anualmente. Sabendo que o *background* genético do hospedeiro está relacionado com suscetibilidade/resistência à infecção por *M. tuberculosis*, nosso grupo vem avaliando diferenças na resposta imunológica entre camundongos C57BL/6 resistentes e BALB/c suscetíveis. No presente estudo, nós nos propusemos a avaliar populações de macrófagos M1 e M2 em animais com capacidade diferente de elaborar resposta imune celular nessa infecção. Animais C57BL/6, que elaboram resposta imune celular de maior magnitude, e BALB/c foram infectados com *M. tuberculosis*, e avaliados aos 30 e 70 dias de infecção. Observamos maior porcentagem de células CD11b⁺Ly-6C⁺, que caracterizam monócitos inflamatórios, no pulmão de animais BALB/c com 70 dias de infecção comparada à porcentagem detectada em animais C57BL/6 com mesmo período de infecção. Houve correlação positiva significativa entre número de bacilos e expressão gênica para *iNOS* aos 30 dias de infecção comparando ambas as linhagens. Ao contrário da nossa hipótese inicial, observamos maior porcentagem de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺, que caracteriza o fenótipo de macrófagos M2, no pulmão de animais C57BL/6 com 70 dias de infecção comparada à porcentagem detectada em animais BALB/c com mesmo período de infecção, havendo correlação inversa significativa de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ e número de bacilos aos 70 dias de infecção. Não houve diferença na análise funcional de macrófagos M1 e M2 obtidos a partir de precursores da medula óssea, comparando as duas linhagens de camundongos. Dessa forma, experimentos com o propósito de estudar a função dessas células in vivo serão conduzidos para avaliar se os macrófagos M2 participam da resposta protetora que auxilia na eliminação dos bacilos ou na resposta protetora que auxilia no reparo tecidual do hospedeiro.

Palavras chave: Tuberculose experimental. *Background* genético. Macrófagos M1. Macrófagos M2.

SOUZA, A. I. **Evaluation of M1 and M2 macrophage populations in mice with different capacity to elaborate immune cellular response against *Mycobacterium tuberculosis***. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Despite only 10% of individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* develop tuberculosis, this disease causes millions of deaths annually. We know that the host genetic background is associated with susceptibility/resistance to *M. tuberculosis*-infection. Therefore, our group has studied differences in the immunologic response between resistant C57BL/6 mice and susceptible BALB/c mice. In the present study, our aim was to evaluate populations of M1 and M2 macrophages in mice that generate different magnitude of cellular immune response in this infection. C57BL/6 mice, which elaborate a higher immune cellular response, and BALB/c mice were infected with *M. tuberculosis*, and evaluated 30 and 70 days post infection. We observed higher percentage of CD11b⁺Ly-6C⁺ cells, which characterize inflammatory monocytes, in the lung of BALB/c mice with 70 days of infection compared to the percentage detected in C57BL/6 animals in the same period of infection. There was a significant positive correlation between CFU number and *iNOS* genic expression comparing both mouse strains 30 days post infection. On the contrary to our initial hypothesis, we observed higher percentage of CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ cells, which characterize M2 macrophage phenotype, in the lung of Day 70-infected C57BL/6 animals compared with the percentage detected in BALB/c mice at the same time of infection. There was a significant inverse correlation between CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ cells and bacillus number at 70 days post infection. There was no difference in the functional analysis of M1 and M2 macrophages obtained from precursors of bone marrow, comparing both mouse strains. Therefore, experimental assays with the aim to study whether M2 macrophages contribute for the protective immune response that induce bacillus clearance or contribute to the protective immune response that promote host tissue repair will be performed in an attempt to understand better the role of these cells in the *M. tuberculosis*-infection.

Keywords: Experimental tuberculosis. Genetic background. M1 macrophages. M2 macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detecção do número de bacilos no pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	35
Figura 2. Contagem de número total de células do pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	36
Figura 3. Avaliação da população de monócitos no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	38
Figura 4. Avaliação da população de macrófagos no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	40
Figura 5. Expressão gênica de marcadores de macrófagos M1 e M2 no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	42
Figura 6. Avaliação da população de macrófagos M2 no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	44
Figura 7. Correlação dos marcadores de macrófagos M1 e M2 com contagem de bacilos em animais C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	45
Figura 8. Correlação da porcentagem de macrófagos CD11b ⁺ F4/80 ⁺ CD206 ⁺ com número de bacilos em animais C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	46
Figura 9. Avaliação da produção de nitrito, IL-1, IL-6 e IL-12 em culturas de macrófagos M1 e M2 de camundongos C57BL/6 e BALB/c.....	49
Figura 10. Avaliação da capacidade de fagocitose e de controle de crescimento bacteriano em macrófagos M1 e M2 de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg1 – Arginase 1

BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*

CFU – *Colony Forming Units*

Chili3 – *Chitinase 3-like 3*

d.p.i. – *days post infection*

DCs – *Dendritic Cells*

DC-SIGN – *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

ESAT-6 – *6-kDa Early Secreated Antigenic Target*

Fizz1 – *Found in Inflammatory Zone-1*

IFN – Interferon

IL – Interleucina

iNOS – *inducible Nitric Oxide Synthase*

KO – *Knockout*

MO – Medula Óssea

MOI – *Multiplicity Of Infection*

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NLRs – *NOD-Like Receptors*

NO – *Nitric Oxide*

PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS - *Phosphate Saline Buffer*

PRR – *Pattern Recognition Receptor*

TB – Tuberculose

TGF – *Tumor Growth Factor*

Th – *T helper*

TLRs – *Toll-Like Receptors*

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

Treg – T regulador

WT – *Wild Type*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Animais	24
4.2 Preparação do inóculo de Mtb	24
4.3 Infecção	25
4.4 Coleta e processamento do pulmão e do baço	25
4.5 Ensaio de CFU	26
4.6 Citometria de fluxo	27
4.7 Extração de RNA do pulmão	28
4.8 Reação de Cadeia de Polimerase – Transcriptase reversa (RT-PCR)	28
4.9 Reação de Cadeia de Polimerase em Tempo Real (<i>Real-Time</i> PCR)	29
4.10 Diferenciação de macrófagos M1 e M2 a partir de precursores da MO	30
4.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas	30
4.12 Dosagem de NO	32
4.13 Extração de RNA de células de cultura e PCR	32
4.14 Ensaio de fagocitose e de controle de crescimento bacteriano	32
4.15 Análises estatísticas	33
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) pulmonar é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Aproximadamente um terço da população mundial encontra-se infectada por esse patógeno (World Health Organization, 2013). Pessoas doentes expõem gotículas contendo bacilos através da tosse. As gotículas suspensas no ar em forma de aerossóis são capazes de infectar indivíduos saudáveis (Ministério da Saúde, 2009). Contudo, apenas 10% das pessoas que se infectam desenvolvem a doença, o restante permanece com a bactéria de forma latente no pulmão. Apesar dessa baixa porcentagem, essa bactéria causa a morte de aproximadamente 1 milhão de pessoas por ano. Portanto, a TB continua sendo uma das doenças bacterianas mais graves do mundo (World Health Organization, 2013). No Brasil, segundo o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, o coeficiente de mortalidade é de 2,4 óbitos a cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2013).

Após a infecção, macrófagos alveolares reconhecem Mtb no pulmão (Cooper, 2009; Philips e Ernst, 2012). Essas células podem ser caracterizadas fenotipicamente como células CD11b⁺F4/80⁺ (Gonzalez-Juarrero *et al.*, 2003) e têm capacidade de reconhecer diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*). Dentre os PRRs, alguns receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-Like Receptors*; Means *et al.*, 1999; Abel *et al.*, 2002; Bafica *et al.*, 2005), receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-Like Receptors*; Mishra *et al.*, 2010), receptores de lectina do tipo-C (Jo, 2008), receptores *scavenger* (Hawkes *et al.*, 2010) e receptores de componentes do sistema complemento (Schlesinger, 1993) participam da ativação da resposta imune na TB. Um tipo de receptor de lectina do tipo-C, o receptor de manose, está associado com reconhecimento de manana, polímero de manose densamente expresso na parede bacteriana de Mtb. Cepas de *Mycobacterium* virulentas estão mais associadas com maior captação por esse receptor, ao contrário das cepas avirulentas, nas quais ocorre menor captação (Schlesinger, 1993). De modo geral, a interação de TLR2 e TLR9 com constituintes

de Mtb induz a produção de IL-12, enquanto a interação com outros receptores, como o receptor para manose e o receptor DC-SIGN (do inglês, *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias (Kaufmann e Schaible, 2003; Bafica *et al.*, 2005). Desse modo, a redundância de receptores e a densidade na expressão dos mesmos em leucócitos da imunidade inata, que geram a resposta efetora dos fagócitos na TB, tornam difícil de demonstrar a contribuição individual desses PRRs em modelos *in vivo* (Philips e Ernst, 2012).

Apesar da ativação dos macrófagos, o bacilo Mtb desenvolveu mecanismos de escape que evitam a resposta imune efetiva para sua eliminação. Um mecanismo bem descrito é a produção de ESAT-6 (do inglês, *6-kDa Early Secreted Antigenic Target*), que pode atuar na inibição da sinalização de TLR-2, ao interagir diretamente com o mesmo (Pathak *et al.*, 2007), e na formação de poros na membrana do fagossomo, permitindo que a bactéria entre no citosol e escape dos mecanismos microbicidas dos macrófagos (De Jonge *et al.*, 2007). Esses mecanismos de escape permitem que a bactéria evite a completa ativação dos macrófagos, resultando em sobrevivência dentro dessas células.

Células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*) também capturam Mtb nas fases iniciais da infecção e apresentam antígenos da micobactéria aos linfócitos T específicos nos linfonodos. Um estudo feito por Chackerian e colaboradores mostrou que a disseminação da bactéria para linfonodos drenantes precede a ativação de linfócitos T específicos nesses órgãos linfáticos (Chackerian *et al.*, 2002). Esse estudo mostra que a difusão dos bacilos é importante para a indução da resposta mediada por linfócitos T, pois em animais resistentes à infecção por Mtb, a difusão de bacilos ocorre mais rapidamente comparada aos animais susceptíveis (Chackerian *et al.*, 2002). No entanto, um estudo elegante, utilizando transferência de células T específicas para antígeno de Mtb para camundongos recém-infectados, mostrou que o atraso na ativação de resposta imune adaptativa pode ser consequência de falha na migração de células dendríticas para os linfonodos (Chackerian *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2008). Esses estudos ilustram a importância das

células dendríticas como leucócitos que iniciam a ativação da resposta adaptativa e também refletem a complexidade da ativação da resposta imune na TB.

Populações heterogêneas de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ são ativados na infecção por Mtb. Junto dos macrófagos e de demais leucócitos, como neutrófilos e linfócitos B, ocorre formação de granulomas, estruturas organizadas caracterizadas, de modo geral, pela disposição central de macrófagos circundados por linfócitos (Ramakrishnan, 2012).

Granulomas bem definidos e organizados, que auxiliam no controle do patógeno, contêm uma profusão de linfócitos T CD4⁺ e expressam IFN- γ (Fenhalls *et al.*, 2002). Camundongos deficientes para a expressão de interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- γ (IL-12-KO e IFN- γ -KO) sucumbem rapidamente à infecção (Cooper *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 2005). Deficiências genéticas no receptor para IFN- γ , em humanos, também estão associadas com maior suscetibilidade a infecções micobacterianas (Jouanguy *et al.*, 1999). Além disso, animais iNOS-KO, deficientes para a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible Nitric Oxide Synthase*), também não controlam a infecção e, inevitavelmente, sucumbem (Macmicking *et al.*, 1997). A expressão de iNOS e a produção de óxido nítrico (NO, do inglês Nitric Oxide), mecanismo microbicida que auxilia na eliminação dos bacilos, são intensificadas por IFN- γ . Portanto, a ativação de linfócitos Th1 por IL-12, a produção de IFN- γ por essas células, e a consequente produção de NO, devido à ação efetora dos linfócitos em macrófagos, é essencial para o controle do crescimento bacteriano.

Na TB, além dos macrófagos, DCs e linfócitos Th1, ainda há a participação de outros tipos celulares. Já foi observada em granulomas a presença de neutrófilos (Tsai *et al.*, 2006) e sabe-se que Mtb também é capaz de se replicar nessas células (Eum *et al.*, 2010). Porém, o papel desses polimorfonucleares na TB ainda permanece controverso. Um trabalho feito por Blomgran e colaboradores relatou que os neutrófilos são capazes de promover resposta imune adaptativa por um mecanismo no qual essas células melhoram a capacidade de ativação de células T imaturas por DCs (Blomgran e Ernst, 2011). Contudo, outro trabalho do mesmo

grupo, utilizando uma bactéria mutante, menos virulenta, mostrou que *Mtb* é capaz de inibir apoptose de neutrófilos, impedindo que eles consigam favorecer essa ativação de linfócitos T (Blomgran *et al.*, 2012). Além disso, comparando-se aos macrófagos, neutrófilos não apresentam uma boa capacidade de eliminação do patógeno (Eruslanov *et al.*, 2005).

Apesar de não desempenharem papel tão significativo quanto às células Th1, também já foi descrita a participação de outros tipos de linfócitos na TB. Os linfócitos Th2 (Roy *et al.*, 2008) e T reguladores (Treg; Scott-Browne *et al.*, 2007; Paula *et al.*, 2011) estão associados com regulação negativa da resposta imune protetora. A importância dos linfócitos Th17 ainda não está totalmente elucidada. Cruz e colaboradores observaram, utilizando anticorpos bloqueadores para IL-17, que essas células agravam a patogenia da TB quando animais foram previamente vacinados com BCG (do inglês, *Bacillus Calmette-Guérin*; Cruz *et al.*, 2010). Por outro lado, Khader e colaboradores observaram que as células Th17 residentes no pulmão após vacinação proporcionam proteção à infecção por *Mtb* devido à mobilização de linfócitos Th1 para o sítio inflamatório (Khader *et al.*, 2007). Dados do nosso grupo corroboram com a ideia de que as células Th17 apresentam papel protetor na TB, uma vez que animais mais resistentes à infecção apresentaram maior produção de IL-17 quando comparados aos animais menos resistentes (Paula *et al.*, 2011). Além dos linfócitos T, outros linfócitos que participam da resposta imune na TB, mas também não apresentam função completamente definida, são os linfócitos B (Tsai *et al.*, 2006).

Não só para a TB como para diversas doenças de caráter crônico, o estabelecimento de uma resposta imune adequada é essencial para o controle do crescimento do patógeno sem que ocorra dano tecidual prejudicial ao hospedeiro. Após o estabelecimento da doença, é necessário o equilíbrio entre a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória, dessa forma, evitando que a exacerbação da inflamação, que é necessária para a destruição do microrganismo, acabe levando à lesão no tecido do hospedeiro. Contudo, esse equilíbrio pode permitir a sobrevivência do patógeno, de forma controlada ou não (Medzhitov, Schneider e Soares, 2012).

No contexto de resposta imunológica adequada contra o patógeno, vários trabalhos vêm mostrando que o *background* genético ou características genéticas do hospedeiro são fatores determinantes na suscetibilidade ou resistência à TB. Um exemplo bem documentado é a deficiência genética na expressão do receptor para IFN- γ , que confere maior suscetibilidade às infecções micobacterianas ao indivíduo portador, como mencionado previamente (Jouanguy *et al.*, 1999). Além disso, a ocorrência de prevalência diferencial de TB entre raças, etnias e famílias favorece esse conceito (Comstock, 1978; Bellamy *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2004; Mahasirimongkol *et al.*, 2009; Azad, Sadee e Schlesinger, 2012). Em particular, uma revisão evidenciou vários polimorfismos genéticos humanos em regiões de genes responsáveis pela resposta imune que podem ser usados para prever suscetibilidade e resistência à infecção por Mtb (Azad, Sadee e Schlesinger, 2012). Dentre eles, existem genes relacionados com reconhecimentos de PAMPs, como um polimorfismo na região do gene que expressa a molécula CD206, receptor de manose, avaliado em uma população de chineses (Zhang *et al.*, 2012), e alguns de genes que expressam citocinas próinflamatórias, como o encontrado no gene *IL12B*, sugerido como um fator de risco para populações com descendência africana (Morris *et al.*, 2011).

A importância do background genético na TB também pode ser evidenciada em modelos experimentais. Vários deles utilizam camundongos de linhagens distintas para avaliar os mecanismos imunológicos pelos quais o hospedeiro consegue realizar uma resposta eficaz ou não contra Mtb. O primeiro trabalho comparando linhagens diferentes de animais na TB foi realizado em 1996 por Medina e North (Medina e North, 1996). Esses autores mostraram através da quantidade de bacilos contatos em pulmão de animais infectados, que camundongos C57BL/6 e BALB/c são resistentes à infecção e animais DBA/2 são suscetíveis (Medina e North, 1998). Em seguida, outro trabalho descreveu que animais C57BL/6 infectados apresentavam maior perfil de resposta inflamatória em comparação aos animais BALB/c. Esse perfil era caracterizado por maior quantidade de células produtoras de IFN- γ nos camundongos C57BL/6. Ainda assim, esse grupo considerou ambos os animais resistentes, pelo fato de não encontrarem diferença na recuperação de

bacilos no pulmão entre as duas linhagens (Jung *et al.*, 2009). Esses resultados corroboram com dados encontrados por nosso grupo. Mostramos que na fase inicial da infecção (30 dias), animais C57BL/6 e BALB/c apresentaram magnitude de resposta imune celular distinta e sem diferença na quantidade de CFU (do inglês, *Colony Forming Units*) no pulmão. Porém, nosso grupo também observou que o maior perfil proinflamatório nos camundongos C57BL/6 reflete em maior resistência à infecção na fase crônica da doença experimental (70 dias), caracterizada por menor contagem de CFU nesses animais comparada aos camundongos BALB/c (Paula *et al.*, 2011). Assim como o nosso grupo, Arko-Mensah e colaboradores também descreveram os animais C57BL/6 resistentes e os BALB/c suscetíveis à infecção por Mtb (Arko-Mensah *et al.*, 2009).

Inseridos nesse contexto, nosso grupo vem usando a abordagem do *background* genético de diferentes linhagens de camundongos para entender melhor os mecanismos pelos quais o hospedeiro consegue controlar ou não o crescimento de Mtb. Nesse sentido, o estudo dos macrófagos é essencial. A importância dessas células pode ser facilmente descrita: 1) macrófagos são considerados os primeiros leucócitos que entram em contato com o patógeno; 2) Mtb infecta e é capaz de se replicar dentro dessas células; 3) macrófagos exercem atividade microbicida, que é importante para o controle da infecção; 4) atualmente, sabe-se que dependendo do microambiente onde se localizam, os macrófagos diferenciam-se em dois tipos distintos de células, macrófagos M1 ou classicamente ativados e macrófagos M2 ou alternativamente ativados (Martinez, Helming e Gordon, 2009).

Em infecções nas quais predominam PAMPs que ativam resposta Th1 e na presença de IFN- γ , os macrófagos diferenciam-se em células proinflamatórias (macrófagos classicamente ativados ou M1). Os macrófagos M1 produzem citocinas proinflamatórias, como IL-1, IL-12 e TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*), expressam a enzima iNOS e exibem atividade microbicida (Gordon, 2003; Martinez, Helming e Gordon, 2009; Gordon e Martinez, 2010). Já em um microambiente onde predominam PAMPs que ativam resposta Th2 ou fraca resposta Th1, e em presença de IL-4 e IL-13, os macrófagos diferenciam-se em células anti-inflamatórias (macrófagos alternativamente ativados ou M2). Essas células produzem citocinas

anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF (do inglês *Tumor Growth Factor*)- β , expressam a enzima Arg1 (Arginase 1), e as molécula Fizz1 (do inglês, *Found in inflammatory zone-1*) e Ym1 (Chi3l3, *Chitinase 3-like 3*; Gordon, 2003; Martinez, Helming e Gordon, 2009; Gordon e Martinez, 2010).

Com relação às moléculas expressas por macrófagos M2, tanto Fizz1 como Ym1 são observadas em resposta mediadas por células Th2. A expressão da molécula Fizz1, também conhecida como *Resistin-like molecule alpha*, é dependente de IL-4 e IL-13 e pode ser inibida por IFN- γ . Pesce e colaboradores mostraram que essa molécula tem um papel de regulação negativa na resposta Th2, diminuindo a exacerbação dessa resposta (Pesce, Ramalingam, Wilson, *et al.*, 2009). Já a molécula Ym1, apesar de não ter função bem elucidada, também parece exercer regulação na resposta Th2 (Nair *et al.*, 2005).

A arginina pode ter vários destinos quando se trata de processos metabólicos, tornando-a um dos aminoácidos mais versáteis no organismo (Morris, 2007). A enzima Arg1 compete com a enzima iNOS por arginina e, dessa forma, evita que haja produção de NO, uma função dos macrófagos M1 (Hey *et al.*, 1997). Além disso, a enzima Arg1 exerce importante papel no mecanismo de reparo tecidual, que pode envolver cicatrização e fibrose pelo fato de induzir produção de ornitina, que é precursora para a síntese de prolina. Esse aminoácido é essencial para a formação de colágeno (Morris, 2007). Na TB, um grupo, utilizando como ferramenta animais com macrófagos deficientes para a expressão de Arg1, mostrou que essa enzima favorece o crescimento da bactéria no pulmão de camundongos infectados (El Kasmi *et al.*, 2008). Esse mesmo grupo observou, em modelo de inflamação hepática por *Schistosoma mansoni*, que a Arg1 produzida nesses macrófagos causa a inibição na proliferação de linfócitos, destacando outra função dessa enzima (Pesce, Ramalingam, Mentink-Kane, *et al.*, 2009).

Assim como a enzima Arg1, a enzima iNOS pode atuar na modulação da resposta imunológica. O NO, produzido em decorrência da atividade da iNOS, também pode inibir a proliferação de linfócitos (Bocca *et al.*, 1998; Nabeshima *et al.*, 1999) e induzir a apoptose (Martins *et al.*, 1998). Além disso, o NO pode afetar a

formação de granulomas compactos e bem organizados (Cooper *et al.*, 2000). Essa característica já foi descrita como possível mecanismo pelo qual NO é capaz de inibir a ativação exagerada de linfócitos e evitar a formação de um granuloma desregulado em modelos de infecção por Mtb, dessa forma, diminuindo os danos causados no órgão pela reação inflamatória (Cooper *et al.*, 2002).

Além das enzimas iNOS e Arg1, existem outros marcadores que podem ser usados para diferenciar as populações de macrófagos em M1 e M2. A molécula CD16/32, que caracteriza o receptor de baixa afinidade para Fc de IgG, é mais expressa em populações de macrófagos M1 (Arkhipov *et al.*, 2013; Anower *et al.*, 2014). Já a molécula CD206 é densamente expressa em populações de macrófagos M2 (Stein *et al.*, 1992). Ambas as moléculas são expressas na membrana celular e são utilizados para auxiliar na diferenciação fenotípica das duas populações de macrófagos.

Macrófagos M1 e macrófagos M2 estão associados a diversas doenças. Macrófagos M1 exercem importante função no controle de várias infecções bacterianas (Ehrt *et al.*, 2001; Shaughnessy e Swanson, 2007; Benoit, Desnues e Mege, 2008; Quiding-Järbrink, Raghavan e Sundquist, 2010). Um referência indireta que ilustra o papel dos macrófagos M1 na TB é a maior susceptibilidade de camundongos deficientes para a expressão da enzima iNOS e infectados com cepa virulenta de Mtb, comparados aos animais WT (do inglês, *Wild Type*; Macmicking *et al.*, 1997; Beisiegel *et al.*, 2009). Já os macrófagos M2 estão bem descritos principalmente em infecções causadas por parasitas, como vermes (Sato *et al.*, 2010; Jenkins *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2014), e em tumores malignos (Kaczmarek *et al.*, 2011; Müller-Quernheim *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2014). Apesar da polarização dessas células parecer simples, esse processo é mais complexo no organismo. Já foi sugerida a participação das duas populações de macrófagos na mesma doença, como na hanseníase, que pode haver ativação de respostas tanto Th1 como Th2 (Mège, Mehraj e Capo, 2011). Além disso, a plasticidade e a capacidade reversível dos macrófagos sugere que esse processo é dinâmico e que as duas populações podem ser observadas tanto em fases de indução da inflamação como de resolução (Porcheray *et al.*, 2005).

Apesar do papel já descrito em outras doenças, a importância das duas populações de macrófagos na TB ainda não está bem elucidada. Em modelo com infecção prévia por *Nippostrongylus brasiliensis* seguida de infecção por Mtb, um grupo mostrou que macrófagos M2, diferenciados em decorrência da infecção com parasita, promoveram aumento no número de bactérias no pulmão de camundongos coinfetados comparado aos animais apenas infectados com Mtb (Potian *et al.*, 2011). Outro trabalho também ilustra, porém de forma indireta, a função não protetora dos macrófagos M2 na TB. Em experimentos com macrófagos humanos, Rajaram e colaboradores mostraram que o reconhecimento de Mtb por receptor de manose, leva a sinalização via PPAR γ , também descrito como marcador de macrófagos M2, e induz resposta anti-inflamatória e um consequente aumento da infecção nessas células (Rajaram *et al.*, 2010). Contudo, esses autores não utilizaram outros marcadores de macrófagos M2 para caracterizar tais células. Esses estudos corroboram o fato de animais tratados com anticorpo contra IL-4, importante para polarização de macrófagos M2, controlarem melhor a infecção por Mtb (Roy *et al.*, 2008). Esses trabalhos destacam um papel deletério de macrófagos M2 na TB.

Um estudo *ex vivo* que avaliou granulomas na infecção por BCG (Arkhipov *et al.*, 2013) e um estudo *in vitro* com macrófagos alveolares infectados por Mtb (Redente *et al.*, 2010) mostraram que, no decorrer da infecção, houve diminuição na expressão de marcadores relacionados com macrófagos M1 e aumento de marcadores associados com macrófagos M2. Esses dados reforçam o modelo proposto por Lugo-Villarino e colaboradores, que sugerem maior ativação de macrófagos M1 e alta capacidade microbicida em estágios preliminares de infecções causadas por patógenos intracelulares, enquanto nos estágios crônicos, haveria polarização para macrófagos M2, responsáveis por desempenhar funções de reparo tecidual e de regulação da resposta imune (Lugo-Villarino *et al.*, 2011).

Do contrário um estudo, utilizando modelo experimental de infecção com *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos de linhagens diferentes, mostrou que animais A/J têm maior resistência à infecção, conferida por ativação de macrófagos M2 e tolerância ao crescimento do patógeno. Camundongos B10.A têm maior

suscetibilidade devido ao maior número de macrófagos M1, o que acaba levando a uma maior quantidade de leveduras no pulmão desses animais (Feriotti *et al.*, 2013). Nosso grupo, utilizando modelo de coinflamação, no qual animais BALB/c foram primeiramente infectados com Mtb e após 30 dias, foram sensibilizados e desafiados para desenvolvimento de asma, mostrou que os animais coinflamados foram mais resistentes que os animais apenas infectados com Mtb. O aumento na resistência estava relacionado com aumento de macrófagos M2 em microambiente inflamatório em presença de leucotrieno B₄ (dados não publicados). Contudo, um trabalho caracterizando o fenótipo e a função dos macrófagos M1 e M2 no controle de infecções pulmonares, em particular na TB, e utilizando animais com magnitude distinta de resposta imune adaptativa ainda não foi realizado.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a existência de suscetibilidade e resistência, e magnitude de resposta imune celular distinta na infecção por Mtb em animais com *background* diferente, nosso grupo vem tentando compreender os mecanismos de modulação de resposta imune utilizando camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6. Em estudo prévio, mostramos que camundongos C57BL/6 infectados produzem concentrações mais elevadas de IFN- γ e IL-17, menores de IL-10, e apresentam função supressora de células Treg inferior quando comparados com os animais BALB/c infectados. Essa diferença no perfil de resposta reflete no melhor controle da infecção por animais C57BL/6 na fase crônica (70 dias) da infecção (Paula *et al.*, 2011). Recentemente, populações de DCs foram avaliadas nesses animais, e constatamos que a magnitude de resposta Th1 dos animais C57BL/6 infectados, mas não dos camundongos BALB/c, é dependente de DCs CD11c⁺CD103⁺ do pulmão (dados não publicados). Dessa forma, animais C57BL/6 infectados com Mtb exibem maior resposta pró-inflamatória, associada com maior proteção contra esse patógeno quando comparados ao perfil de resposta dos animais BALB/c.

Sabendo que existem duas populações de macrófagos que desempenham função distinta na TB, e que o estudo dos macrófagos nessa doença é de grande interesse, o objetivo do presente estudo foi avaliar as populações de macrófagos M1 e M2 em ambas as linhagens de camundongos infectados por Mtb. Dessa forma, esse trabalho busca compreender melhor os mecanismos de modulação de resposta imune, de resistência e suscetibilidade, além de fornecer evidências na busca de marcadores imunológicos que possam prever a progressão da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as populações de macrófagos M1 e M2 em camundongos que geram magnitude de resposta adaptativa diferente na infecção por Mtb.

3.2 Objetivos específicos

- A)** Quantificar a população de monócitos inflamatórios CD11b⁺Ly-6C⁺ no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c, infectados ou não;
- B)** Quantificar populações de macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c, infectados ou não;
- C)** Comparar a expressão relativa de mRNA (RNA mensageiro) para *iNOS*, *Arg1*, *Fizz1* e *Ym1* no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c, infectados ou não;
- D)** Quantificar a população de macrófagos M2, utilizando como marcador anticorpo contra CD206, no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c, infectados ou não;
- E)** Avaliar a capacidade funcional de macrófagos M1 e M2 diferenciados a partir de precursores da medula óssea (MO) de ambas as linhagens de camundongos através da produção das citocinas IL-1 β , IL-12 e IL-6 e da produção de nitrito.
- F)** Avaliar a capacidade funcional de macrófagos M1 e M2 diferenciados a partir de precursores da MO de ambas as linhagens de camundongos através de ensaio de fagocitose e de controle de crescimento de Mtb *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, fêmeas, 8 a 10 semanas de idade, foram obtidos do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais infectados com Mtb foram mantidos dentro de isoladores em laboratório adequado para manipulação da bactéria (nível III de biossegurança) com livre acesso a água e ração.

4.2 Preparação do inóculo de Mtb

A preparação do inóculo de Mtb H37Rv (ATCC 27294) para a infecção foi realizada a partir de uma alíquota de bactérias congelada à -70°C (com viabilidade superior a 85%). Foi adicionado 1 mL dessa alíquota em 2,25 mL de meio Difco Middlebrook 7H9 Broth (BD Biosciences, Sparks, MD, USA) acrescido de 250 µL de Middlebrook OADC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) e incubado por 10 dias em estufa a 37°C. Decorrido esse tempo, a suspensão de bactérias foi centrifugada a 3200 x g por 20 minutos. O *pellet* formado foi ressuspenso em 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e agitado vigorosamente por 2 a 3 minutos em tubos contendo pérolas de vidro estéreis, até a solução ficar homogênea. Para verificação de viabilidade dos bacilos, foi realizado a adição de 100 µL de brometo de etídio (10 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e de 100 µL de diacetato de fluoresceína (2 µg/mL; Acros Organics, New Jersey, USA) à 100 µL da suspensão de bactérias e incubados por 10 minutos, a 4°C. A viabilidade foi determinada com auxílio de microscópio de fluorescência, modelo Aristoplan (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). As bactérias viáveis coraram-se em verde e as mortas em vermelho, devido à coloração do diacetato e do brometo, respectivamente. Em seguida, as bactérias foram diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,9% para obter a concentração de 1×10^6 bacilos/mL. Todos os procedimentos onde houve

manipulação dessa bactéria foram realizados dentro do laboratório nível III de biossegurança.

4.3 Infecção

Cada camundongo foi infectado com 100 µL de suspensão contendo 1×10^5 bacilos por via intra-traqueal. Os camundongos foram anestesiados com 100 µL de anestésico, contendo 10% de Xylasina (Dopaser, Barcelona, Espanha) e 20% de Ketamina Agener (AGENER UNIÃO, Embu-Gaçu, SP, Brasil) diluídos em solução de cloreto de sódio a 0,9% (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil), por via intraperitoneal. A infecção foi realizada através de procedimento cirúrgico com exposição da traqueia. Como controle da infecção, uma alíquota do inóculo experimental foi separada para ensaio de CFU.

4.4 Coleta e processamento do pulmão e do baço

Aos trinta e setenta dias de infecção, pulmões e baços foram coletados assepticamente e colocados em placas de Petri de 22 mm de diâmetro (Corning, NY, USA) estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640 incompleto (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os pulmões foram pesados para posterior cálculo do número de bacilos por órgão. Após a pesagem, os lóbulos foram separados para diversos procedimentos experimentais.

Os lóbulos médio e inferior direito do pulmão foram cortados em pequenos fragmentos com o auxílio de tesoura e pinça estéreis, e foram transferidos para tubos FALCON de 50 mL (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Os lóbulos de cada animal foram digeridos com 13 mL de RPMI-1640 incompleto acrescido de 2,5 µg/mL de liberase (Liberase Blendzyme-Roche, Indianópolis, IN, USA). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação constante (250 rpm) por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram dispersas 20 vezes com auxílio de seringa de 10 mL (BD Ind. Cirúr., Curitiba, PR, Brasil) e foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco – Invitrogen, Grand

Island, NY, USA), para interromper a atividade da enzima liberase. Uma alíquota de 100 µL foi reservada para o ensaio de CFU (descrito no próximo tópico). As amostras foram filtradas em Cell Strainer (100 µm Nylon; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). O Cell Strainer foi lavado com mais 5 mL de RPMI incompleto. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 1500 rpm por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram tratadas por 2 minutos com 2 mL de tampão de lise para hemácias: 0,15 M de cloreto de amônio, 10 nM de bicarbonato de potássio e 0,1 mM de EDTA diluídos em água Milli-Q qsp. A reação foi interrompida com adição de 10 mL de tampão PBS (do inglês, *Phosphate Saline Buffer*) 1X estéril. As amostras foram novamente centrifugadas a 1500 rpm por 10 min, a 4°C e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de RPMI-1640 incompleto.

Os baços coletados foram macerados com auxílio do êmbolo de seringa (BD Ind. Cirúr., Curitiba, PR, Brasil) e uma alíquota de 100 µL foi reservada para o ensaio de CFU.

4.5 Ensaio de CFU

Após digestão dos lóbulos médio e inferior esquerdos do pulmão e processamento do baço, uma alíquota da suspensão celular de cada órgão foi reservada, diluída em série em tampão PBS estéril. Um volume de 100 µL das diluições de 100, 1.000, 10.000 e 100.000 vezes das amostras de pulmão; e 100 µL das diluições de 10, 100, 1.000 e 10.000 das amostras de baço foram distribuídos em placas de 48 poços (BD Company, Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA) contendo meio 7H11: Difco Middlebrook 7H9 Broth (BD Biosciences, Sparks, MD, USA) acrescido de Agar powder (HIMEDIA, Mumbai, Índia). As placas foram vedadas e incubadas a 37°C, 5% de CO₂, por 30 dias. Após o tempo de incubação, as colônias de bactérias foram contadas com o auxílio de lupa ZOOM 2000 (Leica Microsystems). O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e foi expresso em Log₁₀ do número de CFU por pulmão.

4.6 Citometria de fluxo

A suspensão de células obtida por meio da digestão dos lóbulos médio e inferior esquerdos do pulmão foi contada no aparelho Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As concentrações foram ajustadas e 1×10^6 células foram transferidas para tubos FACS previamente identificados. Para bloquear ligações inespecíficas, foi utilizado *Fc block* - anticorpo contra CD16/CD32 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) diluído em RPMI-1640, na concentração de 1:1. As amostras foram incubadas por 40 minutos, a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos monoclonais de interesse, adicionados aos respectivos tubos identificados previamente: F4/80-PerCP-Cy5.5 (Clone BM8; eBioscience, San Diego, CA, USA); CD11b-APC-Cy7 (Clone M1/70), Ly-6C-PerCP-Cy5.5 (Clone AL-21), CD206-PE (Clone C068C2), todos da BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Os tubos foram incubados por 30 minutos, a 4°C, na ausência de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas com 2 mL de PBS contendo 2% de SFB e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi descartado cuidadosamente e o *pellet* formado foi suspenso em 50 µL de PBS contendo 1% de Formaldeído. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Um total de 100 mil eventos foram coletados, e posteriormente, analisados empregando-se o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Primeiramente, foi feita a exclusão de células agrupadas (*doublets*) utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. Posteriormente, utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A, foi selecionada a população com características de monócitos e macrófagos. Para caracterizar os monócitos inflamatórios, consideramos as células duplo positivas para CD11b e Ly-6C. Para caracterizar os macrófagos, consideramos as células duplo positivas para CD11b e F4/80. Para caracterizar os macrófagos M2, foi feita a delimitação por histograma de células positivas para CD206 a partir das células CD11b⁺F4/80⁺. Para a quantificação do número absoluto de células positivas, foi realizado o cálculo de correção a partir da porcentagem de células positivas para os marcadores avaliados com o número total de células de pulmão de cada animal, obtido a partir da contagem no aparelho Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

4.7 Extração de RNA do pulmão

Os lóbulos direitos do pulmão foram colocados em tubos *ependorfs* contendo 1 mL de solução RA1 do *kit ilustra RNAspin Mini* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). O tecido foi triturado com o auxílio de homegenizador, modelo *IKA T10 basic homogeneizer center* (IKA, Staufen, Alemanha). Os procedimentos posteriores foram realizados de acordo com o protocolo do kit previamente citado. Após terminar os procedimentos de extração do RNA, as amostras foram quantificadas pelo aparelho *NanoDrop 1000 spectrophotometer* (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA).

4.8 Reação de Cadeia de Polimerase – Transcriptase reversa (RT-PCR)

Alíquotas contendo 1 µg de RNA foram tratadas com 1 µL de DNase (1 U/ µl) e 1 µL de tampão da DNase 10x (Deoxyribonuclease I, Amplification grade- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O volume dessa solução foi completado para 10 µL com água ultrapura. Com o auxílio de termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Inc., St. Bruno, Quebec, Canada), foi realizada incubação de 15 minutos, a 25°C para ativar a enzima. Para inativar a DNase, 1 µL de EDTA 25 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi adicionado, seguida de incubação por 15 minutos, a 65°C. Após essa etapa, 1 µL de Oligo dT (0,5 µg/µL- Oligo (dT) 12-18 Prime- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1 µL de dNTP (Desoxiribonucleotídeos trifosfatados-100 mM dNTPSet, PCR Grade -Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foram adicionados à amostra. As amostras foram incubadas por 5 minutos, a 65°C. Foram acrescentados 2,5 µL de 5x First Strand Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 µL de 0,1 M DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,25 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 2,25 µL de água ultrapura, seguindo-se incubação por 2 minutos, a 42°C. Por último, 1 µL de *Super Script™ II reverse transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi adicionado, procedendo-se incubação a 42°C, por 50 minutos. Para interromper a reação da enzima, foi realizada incubação de 15 minutos, a 70°C. As amostras foram armazenadas à -70 °C.

4.9 Reação de Cadeia de Polimerase em Tempo Real (*Real-Time PCR*)

Na ausência da luz, as amostras de cDNA foram adicionadas em duplicata em placas de 96 poços (MicroAmp® fast 96-Well Reaction Plate, 0,1ml-Applied Biosystems, Victoria, Australia), contendo 6,25 µL de *Maxima Syber Green/ROX qPCR Master Mix*, 10 mM do primer *foward* e 10 mM do primer *reverse* dos genes controle e de interesse (**Tabela 1**) e 2,75 µL de água livre de nucleases. As placas foram vedadas com filme adesivo *Micro Amp Optical Adhesive Film PCR Compatible* (Applied Biosystems, Victoria, Australia). A reação foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Victoria, Australia) com o auxílio do programa *StepOne Software v2.2.2* (Applied Biosystems, Victoria, Australia). As reações foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C (Pré-tratamento); 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (Desnaturação inicial); e 40 ciclos (Ct) de três etapas: 15 segundos a 95°C (Desnaturação), 30 segundos a 58°C (Anelamento) e 30 segundos a 72°C (Extensão). Os dados da quantificação e a curva de *Melting* foram adquiridos na etapa de extensão. Os dados foram analisados utilizando o próprio software. Para normalizar o nível de expressão do gene alvo, foi utilizado o $\Delta\Delta C_t$, que é representado pelo seguinte cálculo: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (C_{t_{\text{gene de interesse}}} - C_{t_{\text{gene controle}}}) - \text{média do } \Delta C_t \text{ calibrador}$. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabela 1. Sequência dos *primers* controle e de interesse

Gene	Sequências 5'→3'	
	Foward	Reverse
<i>β-Actina</i>	CCC TAG CGA CCA GGG TGT GA	GCC ATG TTC AAT GGG GTA CTT C
<i>Arg1</i>	CAA AAG GAC AGC CTC GAG GAG	CCC GTG GTC TCT CAC GTC AT
<i>Fizz1</i>	CCT GAG ATT CTG CCC CAG GAT	TTC ACT GGG ACC ATC AGC TGG
<i>Ym1</i>	TCA CAG GTC TGG CAA TTC TTC TG	ACT CCC TTC TAT TGG CCT GTC C
<i>iNOS</i>	TGC TGT TCT CAG CCC AAC AAT A	GTC CAG GGA TTC TGG AAC ATT CT

4.10 Diferenciação de macrófagos M1 e M2 a partir de precursores da MO

Os fêmures dos camundongos foram coletados assepticamente. A MO desses fêmures foi retirada com o auxílio de uma seringa de 10 mL (BD Ind. Cirúr., Curitiba, PR, Brasil) acoplada a uma agulha de 26 G½ (BD Ind. Cirúr., Curitiba, PR, Brasil) contendo meio RPMI-1640 incompleto. As suspensões de cada fêmur foram divididas em duas placas de petri específicas para cultivo de macrófagos (REF 351029, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo 8 mL de RPMI-1640, com 1% de Penicilina/Streptomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0,1% de Gentamicina (Gibco, Grand Island, NY, USA), 10% de SFB e 30% de LCCM (do inglês, *L929 Cell Conditioned Medium*) cedido pelo Prof. Dr. Dario Zamboni (FMRP-USP). A cultura permaneceu a 37°C, 5% de CO₂, por 7 dias. No quarto dia de incubação, foram adicionados mais 8 mL desse mesmo meio de cultura. No último dia de cultura, a coleta dos macrófagos foi realizada utilizando-se PBS 1X gelado. As células foram contadas e 1×10^7 células foram cultivadas durante 48 horas em placas de petri com meio RPMI completo (1% de Penicilina/Streptomicina, 0,1% de Gentamicina, 10% de SFB) com 5% de LCCM. Para a diferenciação de macrófagos M1 foram utilizados LPS (1 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA) e IFN-γ recombinante (200 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Para a diferenciação de macrófagos M2 foram utilizadas as citocinas recombinantes IL-4 (30 ng/mL), IL-13 (30 ng/mL) e IL-33 (30 ng/mL), todos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Após a diferenciação, os macrófagos M1 e M2 foram coletados utilizando PBS 1X gelado.

4.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas

Para detecção de citocinas em sobrenadantes de culturas de macrófagos M1 e M2, obtidos a partir de precursores da MO, 2×10^6 macrófagos foram distribuídos por poço, geralmente em triplicatas, em placas de 24 poços (Corning Incorporated, COSTAR, Corning, NY, USA), e estimulados ou não com LPS e INF-γ, ou IL-4, IL-13 e IL-33. Decorridas 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C. A detecção das citocinas IL-1β (R&D Systems, Minneapolis,

MN, USA) e IL-12p70 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) foi realizada de acordo com instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio para IL-1 β foi entre 1,9 a 1.000 pg/mL e para IL-12p70 foi entre 125 a 8.000 pg/mL.

Para dosagem de IL-6, placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunca-Immuno Plares, Rochester, NY, USA) foram recobertas com 50 μ L/poço de solução contendo anticorpo monoclonal contra IL-6 (Clone MP5-20F3; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) diluído em tampão de ligação (Na_2HPO_4 0,1 M pH 9,0) numa concentração de 1 μ g/mL. As placas foram incubadas por uma noite, a 4°C, e, posteriormente, foram lavadas com tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, seguindo-se a etapa de bloqueio por meio da incubação com 200 μ L de tampão PBS contendo 10% de SFB. Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas, sendo adicionados 50 μ L de amostra em cada poço. A curva padrão da IL-6 recombinante, diluída na base 2 em tampão PBS contendo 10% de SFB e 0,05% de Tween 20, também foi adicionada. As amostras e curva foram incubadas por uma noite, a 4°C. As placas foram lavadas novamente, procedendo-se incubação com anticorpo monoclonal contra IL-6 conjugado com biotina (Clone MP5-32C11; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), diluído em PBS com 10% de SFB e 0,05% de Tween 20, numa concentração de 0,5 μ g/mL, 50 μ L/poço, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram novamente lavadas, seguindo-se a adição de Streptavidin-HRP (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), diluído a 1:20.000, por 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente (50 μ L/poço). As amostras foram reveladas com 50 μ L de solução 1:1 de TMB (do inglês, *Tetramethylbenzidine*) e H_2O_2 (BD Opteia, San Diego, CA, USA), por 30 minutos, a temperatura ambiente. A reação foi finalizada com a adição de 25 μ L de H_2SO_4 a 16%. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placa (VERSA max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) em 540 nm, utilizando o software SoftMax Pro 5.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). O limite de detecção do ensaio foi de 19,5 e 5.000 pg/mL.

4.12 Dosagem de NO

Para a dosagem indireta de NO nas culturas, foi realizado o protocolo de reação de Griess (Green *et al.*, 1981). As amostras (100 µL) foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (BD Company, Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA). A curva padrão foi realizada com solução de NO₂ (200 µM) em diluições seriadas de 1:2. Foram adicionados 100 µL da solução de Griess (v/v de 0,1% NEED e 1% SULFANAMIDA), seguindo-se incubação por 5 minutos, a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa, em 540 nm, utilizando o software SoftMax Pro 5.4.

4.13 Extração de RNA de células de cultura e PCR

A extração de RNA de macrófagos M1 e M2 foi realizada a partir de 1×10^6 células em cultura. O procedimento de extração de RNA foi realizado conforme as instruções contidas no *kit ilustra RNAspin Mini*, como citado no item 4.7. Após a purificação do RNA, os procedimentos de PCR foram realizados conforme descrito anteriormente nos itens 4.8 e 4.9.

4.14 Ensaio de fagocitose e de controle de crescimento bacteriano

Macrófagos M1 e M2 ($2,5 \times 10^5$) foram distribuídos em duplicata em placas de 24 poços e incubados em meio RPMI contendo 0,1% de Gentamicina por 4 horas para aderência. Após a incubação, os poços foram cuidadosamente lavados para retirada de qualquer resquício de antibiótico. As células foram infectadas com MOI 5 (do inglês, *Multiplicity Of Infection*: 5 bactérias por célula), seguindo-se incubação em meio RPMI-1640 com 10% de SFB, por 3 horas, a 37°C, 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com RPMI-1640 contendo 10% SFB para retirada das bactérias que não foram fagocitadas. Para a avaliação indireta da fagocitose, as células foram lisadas com 200 µL H₂O Milli-Q qsp contendo 0,05% de saponina (Saponin from Quillaja Bark, Sigma-Aldrich, Saint, Louis, MO, USA). Uma alíquota de 100 µL foi utilizada para fazer diluições seriadas em 10, 100, 1.000 e 10.000 vezes. As alíquotas foram distribuídas em placas de petri (Fisher Scientific,

Suwanee, GA, USA) contendo meio 7H11. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C, 5% de CO₂, por 30 dias. Após o tempo de incubação, as colônias de bactérias foram contadas com o auxílio de lupa ZOOM 2000. O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e foi expresso em CFU/mL. Para avaliação do controle de crescimento bacteriano, após a lavagem dos poços, as células foram deixadas em cultura por mais 24 horas, seguindo-se o mesmo procedimento acima descrito. Para a expressão do percentual de crescimento bacteriano, foi realizado o seguinte cálculo: $CFU_{24h} \times 100 / CFU_{3h}$.

4.15 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram feitas pelo programa STATISTICA 7.0 (StatSoft). Todos os dados foram testados para avaliar seu perfil de normalidade através do *Levene's test* e do *Shapiro-Wilk's W test*. Para os dados que apresentaram mais de um grupo e distribuição normal, foi aplicada a análise de variância *One-Way ANOVA*, seguida do teste *Tukey*. Para aqueles que não apresentam distribuição normal, foi feito o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Para dados normais que apresentaram apenas dois grupos a serem comparados, foi aplicado o *T-test*. Para aqueles que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o *Mann-Whitney U test*. Para as análises de correlação, foi utilizada a correlação de *Pearson*, quando a distribuição de dados era normal, e a correlação de *Spearman*, quando a distribuição de dados não era normal. Todos os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Para a coleta de dados ex vivo, camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados com Mtb e avaliados aos 30 e 70 dias, que correspondem às fases inicial e crônica da infecção (**Figura 1A**).

Inicialmente, confirmamos que aos 30 dias de infecção, a recuperação de bacilos no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c foi semelhante. Entretanto, aos 70 dias de infecção, o número de bacilos no pulmão de animais C57BL/6 foi significativamente menor comparado ao grupo BALB/c com mesmo período de infecção (**Figura 1B**), como já descrito por nosso grupo (Paula *et al.*, 2011).

Avaliamos também o número de bacilos no baço. Observamos que além do aumento significativo no número de CFU no baço de ambas as linhagens, C57BL/6 e BALB/c, de 30 para 70 dias de infecção, também houve maior recuperação de bacilos nos baços de animais BALB/c com 70 dias de infecção comparados aos baços de camundongos C57BL/6 com o mesmo período de infecção (**Figura 1C**).

Figura 1. Detecção do número de bacilos no pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados com 1×10^5 bacilos por via intra-traqueal. Aos 30 e 70 dias de infecção, pulmões e baços foram coletados para realização do ensaio de CFU (A), a partir de suspensões de células de pulmão, obtidas após digestão, e suspensão de células do baço. Trinta dias após a incubação, o número de CFU foi avaliado no pulmão (B) e do baço (C) desses animais. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n = 12-18$ animais por grupo). As barras horizontais representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais.

Em seguida, avaliamos o número total de células do pulmão de cada grupo experimental, a partir da contagem realizada pelo aparelho Countess, após digestão dos lóbulos. Ambas as linhagens tiveram aumento significativo no número total de células de pulmão após infecção comparado aos respectivos grupos não infectados (grupo PBS). Não houve diferença no influxo de células comparando-se os períodos de 30 e 70 dias de infecção para cada linhagem separadamente. Além disso, também não houve diferença ao se comparar os períodos de 30 ou 70 dias de infecção entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c (Figura 2).

Figura 2. Contagem de número total de células do pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados, como ilustrado na Legenda da Figura 1. Após digestão dos lóbulos pulmonares, as suspensões de células obtidas foram contadas individualmente em cada grupo experimental. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes ($n = 12-18$ animais por grupo). * $P < 0,05$ comparando-se ao respectivo grupo de animais não infectados (PBS).

Apesar de não haver diferença no número total de células no pulmão quando camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados foram comparados, nosso grupo vem mostrando diferenças entre populações celulares, tanto no que diz respeito ao número ou frequência de células ou na capacidade funcional (Paula *et al.*, 2011; dados não publicados). Nesse contexto, caracterizamos por citometria de fluxo, primeiramente, células CD11b⁺Ly-6C⁺ no pulmão, que correspondem aos marcadores de monócitos inflamatórios. Para analisar a população de células CD11b⁺Ly-6C⁺, inicialmente, fizemos a exclusão dos *doublets*, que são as células que estão agrupadas, através dos parâmetros FSC-H por FSC-A. Utilizando os parâmetros SSC-A por FSC-A, selecionamos uma população com características de monócitos e macrófagos. Por último, realizamos a análise da população duplo positiva para os marcadores CD11b e Ly-6C (**Figura 3A**).

Apesar da diminuição na porcentagem de células CD11b⁺Ly-6C⁺ tanto em 30 como em 70 d.p.i. comparados aos respectivos grupos controles (**Figura 3B**), o número total de células CD11b⁺Ly-6C⁺ aumentou aos 30 d.p.i., voltando aproximadamente ao valor basal em 70 d.p.i., tanto no pulmão de animais C57BL/6 como BALB/c infectados (**Figura 3C**). Comparando as duas linhagens de camundongos, animais BALB/c tiveram maior percentual significativo dessas células em 70 d.p.i. em relação aos animais C57BL/6 (**Figura 3B**).

Figura 3. Avaliação da população de monócitos no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados, como ilustrado na Legenda da Figura 1. Após digestão dos lóbulos pulmonares, as suspensões celulares foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD11b e contra Ly-6C e avaliadas por citometria de fluxo. Inicialmente, foi realizada a exclusão de *doublets* pelos parâmetros FSC-A x FSC-H, seguindo-se a seleção de células com características de monócitos/macrófagos, delimitadas pelos parâmetros FSC-A x SSC-A, e analisadas quanto à marcação duplo positiva para CD11b e Ly-6C (A). A frequência (B) e o número total (C) de células CD11b⁺Ly-6C⁺ foram avaliados no pulmão de camundongos C56BL/6 e BALB/c com 30 e 70 dias de infecção, e no grupo controle (PBS). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três a quatro experimentos independentes (n = 14-20 animais por grupo). * P < 0,05 comparando-se ao respectivo grupo não infectado (PBS). # P < 0,05 comparando-se ao grupo da respectiva linhagem com 30 dias de infecção. A barra horizontal mostra diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c.

Em seguida, avaliamos a população de macrófagos no pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c com 30 e 70 de infecção. A **Figura 4A** ilustra a análise representativa usada para avaliar macrófagos na suspensão de células do pulmão após digestão. Após exclusão de *doublets* e seleção por parâmetros de tamanho e granularidade, os macrófagos foram analisados por meio da marcação duplo positiva para CD11b e F4/80.

Ambas as linhagens de camundongos tiveram diminuição na porcentagem de macrófagos em 30 e 70 d.p.i., quando comparadas aos respectivos grupos controle (**Figura 4B**). Apenas os animais C57BL/6 apresentaram aumento significativo no número total de macrófagos aos 30 d.p.i. em relação ao respectivo grupo não infectado (**Figura 4C**). Contudo, não houve diferença na frequência e no número total dessas células entre C57BL/6 e BALB/c com 30 ou 70 dias de infecção (**Figura 4B, C**).

Figura 4. Avaliação da população de macrófagos no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados, como ilustrado na Legenda da Figura 1. Após digestão dos lóbulos pulmonares, as suspensões celulares foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD11b e contra F4/80 e avaliadas por citometria de fluxo. Inicialmente, foi realizada a exclusão de *doublets* pelos parâmetros FSC-A x FSC-H, seguindo-se a seleção de células com características de monócitos/macrófagos, delimitadas pelos parâmetros FSC-A x SSC-A, e analisadas quanto à marcação duplo positiva para CD11b e F4/80 (A). A frequência (B) e o número total (C) de células CD11b⁺F4/80⁺ foram avaliados no pulmão de camundongos C56BL/6 e BALB/c com 30 e 70 dias de infecção, e no grupo controle (PBS). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três a quatro experimentos independentes (n = 14-20 animais por grupo). * P < 0,05 comparando-se ao respectivo grupo não infectado (PBS).

Com o propósito de avaliar as populações de macrófagos M1 e M2, inicialmente, analisamos a expressão gênica para *iNOS*, que caracteriza macrófagos M1, e a expressão gênica para *Arg1*, *Fizz1* e *Ym1*, que caracterizam macrófagos M2.

Como a enzima iNOS não é constitutivamente expressa, nós a avaliamos somente os grupos de animais infectados. Observamos aumento significativo na expressão gênica para *iNOS* de 30 para 70 dias de infecção no pulmão de camundongos BALB/c, sendo a expressão no pulmão de animais C57BL/6 infectados (30 e 70 dias) similar. Também não verificamos diferença ao comparar as duas linhagens C57BL/6 e BALB/c (**Figura 5A**).

A análise da expressão gênica relacionada aos macrófagos M2 mostra que houve tendência à redução na expressão de *Arg1*, *Fizz1* e *Ym1* no pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c infectados, com 30 ou 70 dias de infecção, quando comparada à expressão dos respectivos grupos não infectados (**Figuras 5B-D**). Houve redução significativa na expressão de *Arg1* no pulmão de animais C57BL/6 com 70 dias de infecção em relação ao grupo não infectado (**Figura 5B**). Em adição, a expressão de *Fizz1* no pulmão de camundongos C57BL/6 com 30 dias de infecção foi significativamente maior comparada à expressão no pulmão de animais BALB/c com o mesmo período de infecção (**Figura 5C**). Não houve diferença na expressão de *Ym1* ao se comparar animais C57BL/6 e BALB/c (**Figura 5D**).

Figura 5. Expressão gênica de marcadores de macrófagos M1 e M2 no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados, como ilustrado na Legenda da Figura 1. O mRNA do pulmão dos camundongos com 30 e 70 dias de infecção, e dos animais não infectados (PBS) foi purificado a partir do homogenato dos pulmões. A expressão gênica para *iNOS* (A), *Arg1* (B), *Fizz1* (C) e *Ym1* (D) foram avaliadas. A expressão relativa do gene de interesse foi determinada pelo valor do ΔC_t , relativo ao gene constitutivo β -Actina. A diferença na quantidade relativa entre os grupos foi determinada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando como calibrador o grupo C57BL/6 com 30 dias de infecção para análise da expressão de *iNOS* e o grupo C57BL/6 não infectado para análise de *Arg1*, *Fizz1* e *Ym1*. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de duplicatas de três experimentos independentes (n = 9-14 animais por grupo). * $P < 0,05$ comparando-se ao respectivo grupo não infectado (PBS). A barra horizontal mostra diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c.

Além de avaliar a expressão gênica para *Arg1*, *Fizz1* e *Ym1* no pulmão com o propósito de definir marcadores relacionados com macrófagos M2 no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Mtb*, buscamos caracterizar melhor a população de macrófagos M2. Nesse sentido, avaliamos, por citometria de fluxo, as populações de macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ que expressavam o receptor para manose (CD206) no pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c com 30 e 70 dias de infecção. A **Figura 6A** ilustra a análise representativa usada para analisar a população de macrófagos de fenótipo M2. Não observamos diferenças nas frequências das populações de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ analisadas no pulmão de animais C57BL/6 ou BALB/c com 30 dias de infecção em relação aos respectivos grupos não infectados (**Figura 6B**). Porém, houve aumento significativo na porcentagem de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ no pulmão de animais C57BL/6 ou BALB/c com 70 dias de infecção comparada à porcentagem dessa população detectada no pulmão dos respectivos grupos de animais não infectados (**Figura 6B**). Além disso, a porcentagem de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ analisada no pulmão de animais C57BL/6 com 70 dias de infecção foi significativamente maior que a mesma população avaliada no pulmão de animais BALB/c com 70 dias de infecção (**Figura 6B**). Quando determinamos o número total de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺, observamos aumento significativo no pulmão de animais C57BL/6, aos 30 e 70 dias de infecção, quando comparado ao número detectado em animais C57BL/6 não infectados (**Figura 6C**). Não houve diferença no número total de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ ao se comparar os grupo de camundongos BALB/c. Também não houve diferença no número total de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ ao se comparar as linhagens C57BL/6 e BALB/c (**Figura 6C**).

Figura 6. Avaliação da população de macrófagos M2 no pulmão de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados, como ilustrado na Legenda da Figura 1. Após digestão dos lóbulos pulmonares, as suspensões celulares foram marcadas com anticorpos contra CD11b, F4/80 e CD206, e avaliadas por citometria de fluxo. Inicialmente, foi realizada a exclusão de *doublets* pelos parâmetros FSC-A x FSC-H, seguindo-se a seleção de células com características de monócitos/macrófagos, delimitadas pelos parâmetros FSC-A x SSC-A, e analisadas quanto à marcação duplo positiva para CD11b e F4/80. Em seguida, a expressão de CD206 foi analisada por histograma nas populações CD11b⁺F4/80⁺ de cada grupo experimental (A). A frequência (B) e o número total (C) de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ foram avaliados no pulmão de camundongos C56BL/6 e BALB/c com 30 e 70 dias de infecção, e no grupo controle (PBS). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três a quatro experimentos independentes (n = 13-18 animais por grupo). * P < 0,05 comparando-se ao respectivo grupo não infectado (PBS). # P < 0,05 comparando-se ao grupo da respectiva linhagem com 30 dias de infecção. A barra horizontal mostra diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c.

Com o objetivo de relacionar a progressão da infecção com marcadores de macrófagos M1 e M2, estabelecemos correlação dos dados de contagem de CFU e expressão gênica para *iNOS*, ou contagem de CFU e expressão gênica para *Arg1*. Observamos correlação positiva entre número de CFU e expressão gênica para *iNOS* aos 30 dias de infecção ($P = 0,037$; $r = 0,24$; **Figura 7A**), mas não aos 70 dias de infecção ($P > 0,05$; $r = 0,02$; **Figura 7B**). Não houve correlação entre número de CFU e expressão gênica para *Arg1* aos 30 ($P > 0,05$; $r = 0,05$) ou 70 dias ($P > 0,05$; $r = 0,01$) de infecção (**Figura 7C, D**).

Figura 7. Correlação dos marcadores de macrófagos M1 e M2 com contagem de bacilos em animais C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Os dados de expressão de *iNOS* (A, B) e *Arg1* (C, D) foram pareados com os valores obtidos na contagem de CFU de cada animal, em 30 e 70 dias de infecção, procedendo-se ao teste de correlação de *Spearman*.

Estabelecemos também correlação entre contagem de CFU e porcentagem de células $CD11b^+F4/80^+CD206^+$, que caracteriza o fenótipo de macrófagos M2. A **Figura 8A** mostra correlação positiva entre número de CFU e população de células $CD11b^+F4/80^+CD206^+$ aos 30 dias de infecção, porém o número de bacilos e porcentagem dessas células foram similares entre animais C57BL/6 e BALB/c. Entretanto, aos 70 dias de infecção, observamos correlação inversa ($r = 0,491$) entre número de bacilos e células $CD11b^+F4/80^+CD206^+$, ou seja, quanto menor o número de CFU no pulmão de animais C57BL/6, maior o número de células $CD11b^+F4/80^+CD206^+$ (**Figura 8B**).

Figura 8. Correlação da porcentagem de macrófagos $CD11b^+F4/80^+CD206^+$ com número de bacilos em animais C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. As porcentagens de células $CD11b^+F4/80^+CD206^+$ foram pareadas individualmente com valores obtidos nas respectivas contagem de CFU, aos 30 (A) e 70 de infecção, procedendo-se ao teste de correlação de *Spearman*.

As diferenças significativas encontradas até o momento entre camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados mostram: 1) maior porcentagem de células CD11b⁺Ly-6C⁺ no pulmão de animais BALB/c com 70 dias de infecção comparada à porcentagem detectada em animais C57BL/6 com mesmo período de infecção; 2) correlação positiva ($r = 0,240$) significativa ($P = 0,03$) entre número de CFU e expressão de *iNOS* aos 30 dias de infecção; 3) maior porcentagem de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺, que caracteriza o fenótipo de macrófagos M2, no pulmão de animais C57BL/6 com 70 dias de infecção comparada à porcentagem detectada em animais BALB/c com mesmo período de infecção ($P < 0,05$); sendo tal população também significativamente maior quando comparada àquelas detectadas em animais C57BL/6 com 30 dias de infecção e animais C57BL/6 não infectados; 4) correlação inversa ($r = 0.491$) significativa ($P = 0.0007$) entre células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ e número de bacilos aos 70 dias de infecção.

Diante das diferenças encontradas nos fenótipos, partimos para a avaliação funcional das populações de macrófagos M1 e M2 de animais C57BL/6 e BALB/c infectados. Utilizamos células precursoras da MO para diferenciação de macrófagos, e posteriormente, para diferenciação de macrófagos M1 e M2. Em princípio, confirmamos a diferenciação por meio da análise da expressão gênica para *iNOS* e *Arg1*. Macrófagos M1 tiveram expressão significativa de *iNOS* comparados aos macrófagos M2, que tiveram baixa expressão de *iNOS* (**Figura 9A**). Macrófagos M2 tiveram expressão significativa de *Arg1*, comparados aos macrófagos M1, que tiveram baixa expressão desse gene (**Figura 9B**). Não houve diferença na expressão de *iNOS* ou de *Arg1* entre macrófagos M1 ou M2, respectivamente, de animais C57BL/6 e BALB/c.

Para avaliar a capacidade funcional, macrófagos M1 foram avaliados quanto à produção de nitrito, IL-1 β , IL-6 e IL-12. Nossa hipótese era de que macrófagos M1 de animais C57BL/6 iriam secretar maiores concentrações de nitrito e de citocinas próinflamatórias do que macrófagos M1 de animais BALB/c. No entanto, não encontramos diferenças na capacidade funcional dessas células derivadas de precursores da MO de animais C57BL/6 ou BALB/c. Os macrófagos M1 de ambas as linhagens produziram maiores concentrações de nitrito e de IL-1 β , IL-6 e IL-12p70

comparados aos macrófagos M2 e aos macrófagos M0 (que não sofreram diferenciação em M1 ou M2; **Figura 9C-F**). Porém, verificamos que macrófagos M2 de camundongos BALB/c produziram concentrações significativas de IL-6 comparadas às concentrações produzidas por macrófagos M2 de animais C57BL/6 (**Figura 9E**).

Figura 9. Avaliação da produção de nitrito, IL-1, IL-6 e IL-12 em culturas de macrófagos M1 e M2 de camundongos C57BL/6 e BALB/c. Macrófagos M1 e M2 foram diferenciados a partir de precursores da medula óssea de animais C57BL/6 e BALB/c. Para confirmar a diferenciação em células M1 e M2, o mRNA foi purificado e avaliado quanto à expressão gênica para *iNOS* (A) e *Arg1* (B). Os valores foram expressos pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando como calibrador macrófagos M1 de animais C57BL/6 para análise de *iNOS* e macrófagos M2 de animais C57BL/6 para análise de *Arg1*. Os sobrenadantes das culturas de macrófagos M0 (não diferenciados), M1, M2 foram coletados para dosagem de Nitrito (C), IL-1β (D), IL-6 (E) e IL-12p70 (F), realizada em triplicata. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de um experimento representativo reproduzido três vezes (n = 3 por grupo). * P < 0,05 comparando-se aos macrófagos não diferenciados (M0) de mesma linhagem de camundongo. # P < 0,05 comparando-se M1 e M2 de mesma linhagem de camundongo. A barra horizontal mostra diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c.

Além da produção de citocinas, avaliamos a capacidade funcional dos macrófagos M1 e M2 de animais C57BL/6 e BALB/c por meio da análise da capacidade fagocítica e de controle de crescimento de Mtb. Ao avaliar a quantidade de bactérias fagocitadas, não observamos diferenças estatísticas entre macrófagos M1 e M2 de camundongos C57BL/6. Contudo, observamos maior número bactérias capturadas ($P < 0,05$) na cultura de macrófagos M2 de animais BALB/c comparado ao número de CFU detectado na cultura de macrófagos M1 da mesma linhagem. Não houve diferença significativa na capacidade fagocítica comparando as culturas de macrófagos M1 e M2 entre as duas linhagens de camundongos (**Figura 10A**). Para avaliação de controle do crescimento de Mtb, foi realizado o cálculo percentual utilizando como controle a quantidade de bactérias fagocitadas (100%) pelo respectivo grupo. Observamos menor capacidade de contenção do crescimento da bactéria na cultura de macrófagos M2 em comparação ao grupo de macrófagos M1 ($P < 0,05$), em ambas as linhagens de camundongos. Porém, não houve diferença na contenção do crescimento bacteriano ao se comparar as populações M1 ou M2 de animais C57BL/6 e BALB/c (**Figura 10B**).

Figura 10. Avaliação da capacidade de fagocitose e de controle de crescimento bacteriano em macrófagos M1 e M2 de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com Mtb. Macrófagos M1 e M2 foram diferenciados a partir de precursores da medula óssea de animais C57BL/6 e BALB/c, as células ($2,5 \times 10^5$) foram infectados com MOI 5. Após 3 (A) e 24 (B) horas de infecção, as células foram lisadas com solução contendo saponina, e uma alíquota de cada amostra foi utilizada para fazer ensaio de CFU, para avaliar a capacidade de fagocitose e controle de crescimento bacteriano, respectivamente. Trinta dias após a incubação, o número de CFU foi avaliado. A expressão da porcentagem de crescimento bacteriano foi realizada através do cálculo: $CFU_{24h} \times 100 / CFU_{3h}$ (B). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de duplicata de dois experimentos independentes (n = 10 por grupo). * P < 0,05 comparando-se ao grupo M1 da mesma linhagem de camundongo.

6. DISCUSSÃO

Estudos de polimorfismos genéticos (Comstock, 1978; Bellamy *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2004; Mahasirimongkol *et al.*, 2009; Azad, Sadee e Schlesinger, 2012) e ferramentas utilizando camundongos com background genético diferente (Medina e North, 1996; 1998; Arko-Mensah *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2011) mostram que fatores intrínsecos do hospedeiro podem ser importantes para determinar suscetibilidade ou resistência ao bacilo que causa a TB. Baseando-se nisso, nosso grupo tem estudando a modulação da resposta imunológica na TB, utilizando linhagens de camundongos geneticamente diferentes. Dados do nosso grupo e de Arko-Mensah e colaboradores mostram que animais C57BL/6 são resistentes à infecção experimental com Mtb e camundongos BALB/c são suscetíveis (Arko-Mensah *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2011). Essa diferença, provavelmente, reflete a magnitude da resposta proinflamatória e a melhor capacidade de montar resposta imune de perfil Th1 dos camundongos C57BL/6 (Jung *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2011). Além disso, outra característica que parece favorecer a resposta dos camundongos C57BL/6 é o fato das DCs CD11c⁺CD103⁺ obtidas do pulmão desses animais serem mais eficientes em ativar células CD4⁺ produtoras de IFN- γ quando comparadas às DCs CD11c⁺CD103⁺ do pulmão de camundongos BALB/c (dados não publicados).

Apesar de nosso grupo ter avaliado populações heterogêneas de células CD4⁺ e a capacidade de DCs atuarem na ativação da imunidade adaptativa, ainda não realizamos estudo que avaliasse as populações de macrófagos M1 e M2 de animais infectados que elaboram resposta imune celular de magnitude diferente na infecção por Mtb.

Nossa hipótese inicial era de que camundongos C57BL/6 apresentariam maior número de macrófagos M1 no pulmão, com maior capacidade microbicida, e camundongos BALB/c teriam mais macrófagos M2, com maior atividade anti-inflamatória. Nós esperávamos que essa hipótese justificasse a resposta Th1 mais intensa e maior resistência na fase crônica da infecção nos animais C57BL/6 comparados aos animais BALB/c.

Antes de partirmos para a caracterização das duas populações de macrófagos, M1 e M2, no pulmão de animais C57BL/6 e BALB/c, avaliamos, inicialmente, a população de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly-6C⁺), pois essas células são recrutadas para tecidos inflamados (Geissmann, Jung e Littman, 2003; Sunderkötter *et al.*, 2004) e são capazes de se diferenciar em macrófagos (Kennedy e Abkowitz, 1998). De acordo com os resultados obtidos, sugerimos que a restrição ao crescimento dos bacilos no pulmão de camundongos C57BL/6 também pode estar levando à redução da intensidade da resposta imune, fazendo com que esses animais recrutem menos monócitos inflamatórios para o tecido na fase crônica da doença. Do contrário, camundongos BALB/c, que apresentaram maior recuperação de bacilos no pulmão na fase crônica, também tiveram maior porcentagem de monócitos inflamatórios aos 70 dias de infecção, o que sugere que esses animais ainda necessitem recrutar mais monócitos para esse tecido com o intuito de auxiliar a resolução da infecção.

O importante papel da enzima iNOS na TB é facilmente ilustrado pelo fato de que camundongos deficientes para a expressão dessa molécula, infectados com *Mtb*, morreram precocemente em relação aos animais WT (Macmicking *et al.*, 1997). Contudo, diferente da nossa hipótese inicial, quando esperávamos encontrar maior expressão gênica para iNOS, observamos que não houve diferença ao comparar animais C57BL/6 e BALB/c, independente do período de infecção. Apesar disso, aos 30 dias de infecção houve tendência na maior expressão gênica de iNOS nos animais C57BL/6 em relação aos camundongos BALB/c. Além disso, animais BALB/c apresentaram aumento significativo na expressão de iNOS entre 30 e 70 dias de infecção. Esse resultado confirma resultados já publicados pelo nosso grupo, revelando que animais BALB/c produziram maiores concentrações de nitrito na fase crônica da doença (Paula *et al.*, 2011). É importante destacar a necessidade e dificuldade em isolar apenas macrófagos do pulmão de animais infectados. Esse tipo de abordagem ajudaria na avaliação da expressão dessa enzima em populações celulares específicas, uma vez que a forma pela qual avaliamos pode apresentar interferência de outros tipos celulares, por exemplo, neutrófilos, que também podem expressar iNOS (Ratajczak-Wrona *et al.*, 2013).

Além disso, um aspecto interessante que pode justificar a recuperação de número maior de bacilos no pulmão de camundongos BALB/c com 70 dias de infecção é que o aumento de expressão de *iNOS*, observado no presente estudo, e a consequente produção de NO (Paula *et al.*, 2011), podem estar modulando a resposta imunológica nesses animais. Dois grupos mostraram que NO é capaz de atuar impedindo a proliferação de linfócitos (Bocca *et al.*, 1998; Nabeshima *et al.*, 1999). Essa ideia confirma a correlação positiva observada quando avaliamos a expressão de *iNOS* e número de CFU em ambas as linhagens de camundongos com 30 dias de infecção. Portanto, os resultados mostram que no decorrer da infecção, camundongos BALB/c tiveram aumento na expressão gênica de *iNOS*, e nós sugerimos que tal aumento tem intuito de resolver a infecção. Porém, o NO pode apresentar papel de modulador negativo, impedindo que camundongos BALB/c controlem o crescimento bacteriano. Apesar disso, quando avaliada a correlação desses parâmetros (*iNOS* e CFU) aos 70 dias de infecção, não foi observado correlação significativa, independente da linhagem de animal estudada. Dessa forma, permanece para ser avaliado o papel funcional da enzima *iNOS* e do NO comparando as linhagens C57BL/6 e BALB/c com a finalidade de responder essa questão.

Diferente do que esperávamos, quando as populações de macrófagos M2 foram avaliadas, nós observamos que os camundongos C57BL/6 não só apresentaram maior expressão gênica de marcadores de macrófagos M2 de forma constitutiva, como também tiveram maior porcentagem de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ no pulmão aos 70 dias de infecção ao comparar com o respectivo grupo de animais BALB/c. Há um consenso de que macrófagos M2 pelas características funcionais e também diante de dois estudos na TB experimental, promovem a progressão da infecção (El Kasmi *et al.*, 2008; Rajaram *et al.*, 2010; Potian *et al.*, 2011). No entanto, trabalho recente de nosso grupo empregando modelo descrito como coinflamação, no qual camundongos foram infectados com *Mtb*, seguindo-se o desenvolvimento de alergia das vias aéreas, mostra o aumento da resistência dos animais infectados e alérgicos comparados aos animais apenas infectados, sendo o aumento da resistência dependente de macrófagos M2 (dados

não publicados). Além disso, em modelo de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, Feriotti e colaboradores mostraram que a resistência de camundongos A/J à infecção é conferida por macrófagos M2, que toleram o crescimento do fungo, enquanto camundongos B.10A, suscetíveis, apresentaram maior ativação de macrófagos M1. Esses macrófagos apresentam maior número de leveduras dentro da célula, porém o mecanismo que interfere nessa resposta ainda não foi totalmente determinado (Feriotti *et al.*, 2013).

Diante desses resultados ao avaliar a correlação da porcentagem de macrófagos M2 e o número de CFU nas duas linhagens de camundongos aos 70 dias de infecção, observamos correlação inversa significativa. Contudo, experimentos de transferência celular serão realizados com o propósito de responder se a maior porcentagem de macrófagos M2 está de fato associada com diminuição no número de bacilos no pulmão. Levando-se em consideração os resultados obtidos nesse estudo e os resultados já publicados, previamente discutidos, nós sugerimos três ações distintas que podem ou não estar atuando em conjunto na resposta desses camundongos: 1) o maior perfil de expressão gênica e maior percentual de macrófagos M2 nos camundongos C57BL/6 pode estar favorecendo o controle bacteriano nesses animais; 2) a maior porcentagem de macrófagos M2 na fase crônica da infecção em animais C57BL/6 comparados aos macrófagos de camundongos BALB/c, pode estar relacionada com resolução de resposta imunológica contra *Mtb*, dessa forma, convertendo a resposta proinflamatória, característica desses animais, em um perfil anti-inflamatório e de reparo tecidual; 3) e por último, o *background* genético dos camundongos C57BL/6 pode estar favorecendo um perfil de resposta misto de macrófagos M1 e M2 que conseguem controlar melhor a replicação bacteriana em comparação aos animais BALB/c.

Contudo, uma questão que deve ser lembrada é que a avaliação da expressão de marcadores gênicos foi realizada a partir de mRNA total do pulmão dos animais. Portanto, assim como discutido para a expressão de *iNOS*, também pode existir algum tipo de expressão dos genes de macrófagos M2 em outras células presentes

nesse órgão. A avaliação dos macrófagos do pulmão isoladamente pode ajudar a responder as questões pendentes.

É importante salientar que na resposta imune contra infecções crônicas, como é o caso da TB, é necessário um equilíbrio de resposta inflamatória e reguladora, para que haja controle da multiplicação do patógeno sem causar dano tecidual ao hospedeiro (Medzhitov, Schneider e Soares, 2012). Nesse contexto, observamos dois resultados encontrados nos animais C57BL/6 que reforçam esse conceito. O primeiro é a menor porcentagem de monócitos encontrada nesses animais com 70 dias de infecção, e o segundo é o aumento na porcentagem de macrófagos M2 no mesmo período. Ambos os resultados sugerem uma mudança para um perfil anti-inflamatório, com intuito de diminuir recrutamento celular e aumentar reparo tecidual.

Resumindo, os dados mostrados até o momento sugerem alguns possíveis mecanismos de ação. Dentre eles citamos: 1) NO produzido durante a infecção pode atuar modulando a resposta imune e favorecendo o crescimento da bactéria; 2) macrófagos M2 podem exercer algum tipo de mecanismo microbicida que acaba levando a um melhor controle da replicação da bactéria; 3) macrófagos M2 aparecem em fases de resolução da resposta imune com intuito de diminuir a inflamação e realizar as funções de reparo no tecido; como consequência, ocorre a diminuição no influxo de monócitos; 4) a proporção mista e adequada das duas populações de macrófagos pode favorecer a melhor resolução da infecção.

Para dar continuidade ao estudo, propusemo-nos a avaliar a capacidade funcional de macrófagos M1 e M2 nas duas linhagens de camundongos. Devido à dificuldade em obter a quantidade necessária de macrófagos do pulmão para poder avaliar os parâmetros desejados, nós utilizamos macrófagos diferenciados a partir de precursores da medula óssea. Como já demonstrado previamente por Sans-Fons et al., nós também não encontramos diferença na expressão de *iNOS* e *Arg1* na culturas de macrófagos M1 e M2, respectivamente, de camundongos C57BL/6 e BALB/c (Sans-Fons et al., 2013). Porém, consideramos que macrófagos M1 ou M2 diferenciados a partir de precursores da medula óssea de animais C57BL/6 ou BALB/c apresentariam diferença na produção de citocinas próinflamatórias.

Contudo, as concentrações de IL-1, IL-6 e IL-12 foram semelhantes nos sobrenadantes de culturas de macrófagos M1 de camundongos C57BL/6 e BALB/c.

Apesar de não serem considerados como células potencialmente microbidas, macrófagos M2 são caracterizados por maior capacidade fagocítica em comparação aos macrófagos M1 (Mulder, Banete e Basta, 2014). Observamos que os macrófagos M2 de animais BALB/c tiveram maior capacidade fagocítica que os macrófagos M1, provavelmente, uma consequência da maior densidade de receptor para manose, marcador de macrófagos M2. Além da capacidade fagocítica, não encontramos diferença na capacidade de contenção de crescimento de Mtb nas culturas de macrófagos M1 ou M2, comparando as duas linhagens de camundongos. No entanto, macrófagos M2 de ambas as linhagens de camundongos controlaram menos o crescimento bacteriano quando comparados com as respectivas culturas de macrófagos M1. Supúnhamos que os macrófagos M1 de camundongos C57BL/6 seriam mais eficientes em controlar a multiplicação de bacilos *in vitro* em relação aos macrófagos M1 de animais BALB/c.

Em síntese, o conjunto de resultados coletados mostra que na fase crônica da infecção, animais C57BL/6 apresentaram maior porcentagem de macrófagos com fenótipo de população M2 e menor porcentagem de monócitos inflamatórios no pulmão. Experimentos serão conduzidos com a finalidade de avaliar se as células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ participam da resposta imune que promove restrição aos crescimento dos bacilos e maior resistência de animais C57BL/6, ou se a presença dessas células seria consequência da resposta imune protetora que resultou em melhor controle da infecção na fase crônica por camundongos C57BL/6 comparados aos camundongos BALB/c.

7. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo mostram maior porcentagem de células CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ e menor porcentagem de células CD11b⁺Ly-6C⁺ no pulmão de camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção por Mtb comparadas às respectivas populações celulares detectadas no pulmão de animais BALB/c com mesmo período de infecção. Esses resultados divergem de nossa hipótese inicial, na qual supúnhamos encontrar aumento na população e na capacidade funcional de macrófagos M1 em animais C57BL/6 infectados. Dessa forma, somente com a realização de experimentos para avaliar a função dessas células *in vivo* poderemos avaliar se os macrófagos M2 participam da resposta protetora que auxilia na eliminação dos bacilos ou na resposta protetora que auxilia no reparo tecidual do hospedeiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, B. et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3155-62, Sep 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218133> >.

ANOWER, A. K. et al. The role of classical and alternative macrophages in the immunopathogenesis of herpes simplex virus-induced inflammation in a mouse model. **J Dermatol Sci**, v. 73, n. 3, p. 198-208, Mar 2014. ISSN 1873-569X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280370> >.

ARKHIPOV, S. A. et al. In vitro study of phenotypical characteristics of BCG granuloma macrophages over the course of granuloma development. **Bull Exp Biol Med**, v. 155, n. 5, p. 655-8, Sep 2013. ISSN 1573-8221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288732> >.

ARKO-MENSAH, J. et al. Resistance to mycobacterial infection: a pattern of early immune responses leads to a better control of pulmonary infection in C57BL/6 compared with BALB/c mice. **Vaccine**, v. 27, n. 52, p. 7418-27, Dec 2009. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19735756> >.

AZAD, A. K.; SADEE, W.; SCHLESINGER, L. S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. **Infect Immun**, v. 80, n. 10, p. 3343-59, Oct 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825450> >.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1715-24, Dec 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365150> >.

BEISIEGEL, M. et al. Combination of host susceptibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* determines dual role of nitric oxide in the protection and control of inflammation. **J Infect Dis**, v. 199, n. 8, p. 1222-32, Apr 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302011> >.

BELLAMY, R. et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 14, p. 8005-9, Jul 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10859364> >.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. **J Immunol**, v. 181, n. 6, p. 3733-9, Sep 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768823> >.

BLOMGRAN, R. et al. Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 1, p. 81-90, Jan 2012. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264515> >.

BLOMGRAN, R.; ERNST, J. D. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. **J Immunol**, v. 186, n. 12, p. 7110-9, Jun 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555529> >.

BOCCA, A. L. et al. Treatment of Paracoccidioides brasiliensis-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 3056-63, Sep 1998. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743371> >.

CHACKERIAN, A. A. et al. Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4501-9, Aug 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117962> >.

COMSTOCK, G. W. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. **Am Rev Respir Dis**, v. 117, n. 4, p. 621-4, Apr 1978. ISSN 0003-0805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/565607> >.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 393-422, 2009. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302046> >.

COOPER, A. M. et al. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 5, p. 221-6, May 2002. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973155> >.

_____. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J Exp Med**, v. 178, n. 6, p. 2243-7, Dec 1993. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245795> >.

_____. Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of Mycobacterium tuberculosis in the murine lung. **Infect Immun**, v. 68, n. 12, p. 6879-82, Dec 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083808> >.

CRUZ, A. et al. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, v. 207, n. 8, p. 1609-16, Aug 2010. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624887> >.

DE JONGE, M. I. et al. ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. **J Bacteriol**, v. 189, n. 16, p. 6028-34, Aug 2007. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17557817> >.

EHRT, S. et al. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. **J Exp Med**, v. 194, n. 8, p. 1123-40, Oct 2001. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602641> >.

EL KASMI, K. C. et al. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. **Nat Immunol**, v. 9, n. 12, p. 1399-406, Dec 2008. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978793> >.

ERUSLANOV, E. B. et al. Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. **Infect Immun**, v. 73, n. 3, p. 1744-53, Mar 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731075> >.

EUM, S. Y. et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. **Chest**, v. 137, n. 1, p. 122-8, Jan 2010. ISSN 1931-3543. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749004> >.

FENG, C. G. et al. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 4185-92, Apr 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778379> >.

FENHALLS, G. et al. Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. **Immunology**, v. 105, n. 3, p. 325-35, Mar 2002. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11918694> >.

FERIOTTI, C. et al. Mannosyl-recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54845, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382985> >.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, Jul 2003. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871640> >.

GONZALEZ-JUARRERO, M. et al. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 3128-35, Sep 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960339> >.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511873> >.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510870> >.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7764-8, Dec 1981. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950416> >.

HAWKES, M. et al. CD36 deficiency attenuates experimental mycobacterial infection. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 299, 2010. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950462> >.

HEY, C. et al. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol**, v. 121, n. 3, p. 395-400, Jun 1997. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9179379> >.

JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284-8, Jun 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566158> >.

JO, E. K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 279-86, Jun 2008. ISSN 0951-7375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448973> >.

JOUANGUY, E. et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. **Nat Genet**, v. 21, n. 4, p. 370-8, Apr 1999. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10192386> >.

JUNG, Y. J. et al. Differences in the ability to generate type 1 T helper cells need not determine differences in the ability to resist Mycobacterium tuberculosis infection among mouse strains. **J Infect Dis**, v. 199, n. 12, p. 1790-6, Jun 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426112> >.

KACZMAREK, M. et al. Evaluation of the phenotype pattern of macrophages isolated from malignant and non-malignant pleural effusions. **Tumour Biol**, v. 32, n. 6, p. 1123-32, Dec 2011. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21809139> >.

KAUFMANN, S. H.; SCHAIBLE, U. E. A dangerous liaison between two major killers: Mycobacterium tuberculosis and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. **J Exp Med**, v. 197, n. 1, p. 1-5, Jan 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12515808> >.

KENNEDY, D. W.; ABKOWITZ, J. L. Mature monocytic cells enter tissues and engraft. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14944-9, Dec 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843995> >.

KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nat Immunol**, v. 8, n. 4, p. 369-77, Apr 2007. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17351619> >.

LUGO-VILLARINO, G. et al. Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV. **Front Immunol**, v. 2, p. 43, 2011. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566833> >.

MACMICKING, J. D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 10, p. 5243-8, May 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144222> >.

MAHASIRIMONGKOL, S. et al. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. **Genes Immun**, v. 10, n. 1, p. 77-83, Jan 2009. ISSN 1476-5470. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843276> >.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105661> >.

MARTINS, G. A. et al. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Immunol Lett**, v. 63, n. 2, p. 113-20, Sep 1998. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761373> >.

MEANS, T. K. et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 163, n. 7, p. 3920-7, Oct 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490993> >.

MEDINA, E.; NORTH, R. J. Evidence inconsistent with a role for the Bcg gene (Nramp1) in resistance of mice to infection with virulent Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, v. 183, n. 3, p. 1045-51, Mar 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642246> >.

_____. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to Mycobacterium tuberculosis and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. **Immunology**, v. 93, n. 2, p. 270-4, Feb 1998. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616378> >.

MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D. S.; SOARES, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 936-41, Feb 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363001> >.

MILLER, E. N. et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. **Genes Immun**, v. 5, n. 1, p. 63-7, Jan 2004. ISSN 1466-4879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735151> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. D. **Guia de vigilância epidemiológica**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, Brasil. 2009

_____. **Boletim Epidemiológico. Tuberculose: alinhada com o social, afinada com a tecnologia**. Ministério da Saúde. Brasília, Brasil. 2013

MISHRA, B. B. et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 1046-63, Aug 2010. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20148899> >.

MORRIS, G. A. et al. Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16656, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339808> >.

MORRIS, S. M. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. **J Nutr**, v. 137, n. 6 Suppl 2, p. 1602S-1609S, Jun 2007. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513435> >.

MULDER, R.; BANETE, A.; BASTA, S. Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states. **Immunobiology**, Jun 2014. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954891> >.

MÈGE, J. L.; MEHRAJ, V.; CAPO, C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, n. 3, p. 230-4, Jun 2011. ISSN 1473-6527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311324> >.

MÜLLER-QUERNHEIM, U. C. et al. Tumor-cell co-culture induced alternative activation of macrophages is modulated by interferons in vitro. **J Interferon Cytokine Res**, v. 32, n. 4, p. 169-77, Apr 2012. ISSN 1557-7465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22280057> >.

NABESHIMA, S. et al. T-Cell hyporesponsiveness induced by activated macrophages through nitric oxide production in mice infected with Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun**, v. 67, n. 7, p. 3221-6, Jul 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377094> >.

NAIR, M. G. et al. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 385-94, Jan 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618176> >.

PATHAK, S. K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nat Immunol**, v. 8, n. 6, p. 610-8, Jun 2007. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486091> >.

PAULA, M. O. et al. Host genetic background affects regulatory T-cell activity that influences the magnitude of cellular immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 4, p. 526-34, May 2011. ISSN 1440-1711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20956987> >.

PESCE, J. T. et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, p. e1000371, Apr 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360123> >.

_____. Retnla (relmalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, p. e1000393, Apr 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381262> >.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annu Rev Pathol**, v. 7, p. 353-84, 2012. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054143> >.

PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clin Exp Immunol**, v. 142, n. 3, p. 481-9, Dec 2005. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16297160> >.

POTIAN, J. A. et al. Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. **J Exp Med**, v. 208, n. 9, p. 1863-74, Aug 2011. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21825018> >.

QUIDING-JÄRBRINK, M.; RAGHAVAN, S.; SUNDQUIST, M. Enhanced M1 macrophage polarization in human helicobacter pylori-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15018, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124899> >.

RAJARAM, M. V. et al. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 929-42, Jul 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554962> >.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 352-66, May 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517424> >.

RATAJCZAK-WRONA, W. et al. Role of ERK1/2 kinase in the expression of iNOS by NDMA in human neutrophils. **Indian J Exp Biol**, v. 51, n. 1, p. 73-80, Jan 2013. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441482> >.

REDENTE, E. F. et al. Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 1, p. 159-68, Jul 2010. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360403> >.

ROY, E. et al. Beneficial effect of anti-interleukin-4 antibody when administered in a murine model of tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 88, n. 3, p. 197-202, May 2008. ISSN 1472-9792. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096435> >.

SANS-FONS, M. G. et al. Arginine transport is impaired in C57Bl/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of Slc7a2 (CAT2), and susceptibility to Leishmania infection is reduced. **J Infect Dis**, v. 207, n. 11, p. 1684-93, Jun 2013. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460752> >.

SATOH, T. et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 936-44, Oct 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729857> >.

SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J Immunol**, v. 150, n. 7, p. 2920-30, Apr 1993. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8454864> >.

SCOTT-BROWNE, J. P. et al. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **J Exp Med**, v. 204, n. 9, p. 2159-69, Sep 2007. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709423> >.

SHAUGHNESSY, L. M.; SWANSON, J. A. The role of the activated macrophage in clearing Listeria monocytogenes infection. **Front Biosci**, v. 12, p. 2683-92, 2007. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127272> >.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med**, v. 176, n. 1, p. 287-92, Jul 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613462> >.

SUNDERKÖTTER, C. et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4410-7, Apr 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034056> >.

TSAI, M. C. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 218-32, Feb 2006. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441433> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2013**. World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2013

WOLF, A. J. et al. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. **J Exp Med**, v. 205, n. 1, p. 105-15, Jan 2008. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158321> >.

XIAO, Q. et al. Inhibition of macrophage polarization prohibits growth of human osteosarcoma. **Tumour Biol**, May 2014. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798973> >.

ZHANG, X. et al. Polymorphic allele of human MRC1 confer protection against tuberculosis in a Chinese population. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 3, p. 375-82, 2012. ISSN 1449-2288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393309> >.

ZHU, J. et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during Schistosoma japonicum infection in mice. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 122, 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666892> >.