Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

TAMARA SILVA RODRIGUES

**Interação de células epiteliais alveolares do tipo II e células dendríticas na
infecção com *Mycobacterium tuberculosis*: o papel do HIF-1 α**

Ribeirão Preto - SP

2018

TAMARA SILVA RODRIGUES

Interação de células epiteliais alveolares do tipo II e células dendríticas na infecção com *Mycobacterium tuberculosis*: o papel do HIF-1 α

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato

Ribeirão Preto - SP
2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Tamara Silva

Interação de células epiteliais alveolares do tipo II e células dendríticas na infecção com *Mycobacterium tuberculosis*: o papel do HIF-1 α

Ribeirão Preto, São Paulo, 2018, 108 p.; 1l; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
Orientadora: Bonato, Vânia Luiza Deperon.

Nome: Rodrigues, Tamara Silva

Título: Interação de células epiteliais alveolares do tipo II e células dendríticas na infecção com *Mycobacterium tuberculosis*: o papel do HIF-1 α

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre.

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dra. Denise de Moraes da Fonseca

Instituição: ICB - USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. André Luis Barbosa Báfica

Instituição: UFSC

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós que são inspiração na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

Aos animais utilizados nesse trabalho, pela contribuição dada à construção da ciência.

À minha orientadora, professora Vânia Luiza Deperon Bonato, pelas orientações e ensinamentos durante esse período, que foram além de conhecimentos compartilhados, mas serviram de inspiração para a vida. Obrigada por fazer uma pesquisa genuína, preocupando-se sempre com o retorno dado à sociedade e com o bem-estar do paciente. Obrigada também por dar o seu melhor na formação dos seus alunos. Acredito que esses fatores e outros mais tornam você um referencial para mim de mulher, mãe, pesquisadora e professora diferenciada.

À doutora Annie Piñeiros por ter sido um anjo durante essa caminhada. Obrigada por todos os conhecimentos compartilhados e pela amizade. Agradeço imensamente por cada ensinamento e por ter acreditado em mim. Mesmo de longe, você permaneceu disponível para ajudar sempre que necessário e esteve torcendo para meu crescimento profissional. Você é um exemplo de ser humano e profissional para mim.

À Ana Flávia, pela grande paciência com a nossa imaturidade, por nos ensinar sempre e por todo suporte técnico, o qual você faz com maestria. Obrigada também por ter se tornado uma amiga, uma pessoa que eu quero que permaneça fazendo parte da minha vida. Obrigada por pensar muitas vezes à frente de nós, alunos. Obrigada por nos salvar sempre dos apertos nos experimentos, por toda força e compreensão. Você foi indispensável para o andamento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Sandra Palma, Rômulo de Oliveira, Thaís Bertolini, Douglas Santos e Fernanda Mesquita por toda a ajuda, convivência diária, conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração.

Aos meus colaboradores, Bruno Marcel, Carlos Hiroki e João Paulo Mesquita pelo importante suporte e por contribuírem para esse trabalho fosse realizado.

Às técnicas, Izaíra e Wendy que são seres humanos e profissionais incríveis. Sempre dispostas a ajudar em qualquer momento. Não tenho palavras para agradecê-las.

Ao professor João Santana da Silva por todo suporte fornecido durante esse período, além de também ser uma referência de pesquisador na minha vida.

À secretária Ana Cristine, que se dedica diariamente aos alunos do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, se preocupa com o nosso crescimento e está sempre disposta a nos ajudar. Muito obrigada!

À técnica Denise, que foi extremamente solícita, gentil e excelente profissional durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais, que são referência de bondade, honestidade e educação na minha vida. Obrigada por todo apoio incondicional em todas as vezes que decidi voar mais alto, mesmo que para longe de vocês. Obrigada por acreditarem em mim e por terem contribuído para que eu me tornasse uma pessoa corajosa a ponto de seguir, sem hesitar, os caminhos mais difíceis em busca dos meus sonhos. Vocês são a base de todas as minhas conquistas.

Aos meus avós, que são exemplo na minha vida de luta, humildade, simplicidade, bondade e amor ao próximo.

Ao meu noivo e porto-seguro, Ítalo Bonfim, que muitas vezes me fez confiar no meu potencial quando eu não acreditava. Obrigada por me apoiar incondicionalmente, por torcer sempre para o meu crescimento e para que meus sonhos se realizem. Obrigada por todos os conselhos, por cada palavra de conforto, pela paciência e cumplicidade diante da distância, pelo carinho e por tornar real o significado de amor.

A minha melhor amiga Isabel Guerra, pela amizade, cumplicidade e irmandade construída durante esses dois anos. Obrigada por ter se tornado uma irmã que eu nunca tive e por me trazer, diariamente, um pedacinho do Nordeste aqui em Ribeirão Preto.

Aos meus amigos Jefferson Antonio Leite, Ricardo Castro, Robson Loterio, Murillo Duarte, Ricardo Souza, Nathália Quadros e Alynne Karen pela amizade e companheirismo. Vocês tornaram essa caminhada mais leve.

Aos meus amigos farmacêuticos Luri Sasahara, Yugo Martins, Talysson Almeida e Francisco Maxwell pela amizade e por toda a caminhada que seguimos juntos durante muito tempo. Obrigada por continuarem fazendo parte da minha vida mesmo diante da distância.

Às minhas amigas, Bruna Macedo, Rephany Fonseca e Juliana Rocha, que foram presentes de Deus durante essa jornada e que, mesmo de longe, foram as melhores amigas e exemplo de boas pessoas que eu poderia ter.

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao laboratório de Imunologia e Inflamação pulmonar, pela estrutura física necessária para a realização desse trabalho.

“Uma mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein

Rodrigues, Tamara Silva. Interação de células epiteliais alveolares do tipo II e células dendríticas na infecção com *Mycobacterium tuberculosis*: o papel do HIF-1 α . 2018, 108 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

RESUMO

A tuberculose (Tb) é uma doença infecciosa crônica ocasionada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). No espaço alveolar, o bacilo entra em contato com células do sistema imune inato como as células dendríticas (DCs), assim como células epiteliais (AEC). Na Tb, o fator de transcrição HIF-1 α (Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa) se encontra elevado em macrófagos infectados e células epiteliais alveolares adjacentes. Por isso, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel de HIF-1 α na resposta pró-inflamatória de AEC do tipo II (AEC-II) e na modulação da função de DCs em contato com AEC-II durante a infecção por Mtb. Células MLE-15 foram infectadas com Mtb H37Rv (MOI10) para avaliação da permissividade à infecção (microscopia eletrônica), crescimento dos bacilos (CFU) e ativação através da análise de citocinas (ELISA), nitrito (ensaio de Griess), TLR2, TLR9 e HIF-1 α (qPCR e/ou Western blotting). A modulação DCs derivadas da medula óssea (BMDCs) por AEC-II, foi analisada de forma direta (contato) ou indireta (meio condicionado – CM) de MLE-15 não infectadas (CM - NIC) ou infectadas (CM – IC). Foram determinadas citocinas (ELISA), nitrito (Ensaio de Griess), expressão de HIF-1 α , enzimas glicolíticas, moléculas co-estimuladoras e CCR7 (citometria de fluxo). Ensaio de migração foi realizado em câmara de boyden. A proliferação de células T CD4⁺ naive em co-cultura com BMDCs e a manutenção da Th17 foram avaliadas por citometria de fluxo. Eventualmente, BMDCs foram previamente infectadas com Mtb (MOI2) e, em seguida, estimuladas com CM-NIC ou CM-IC. Células MLE-15 mostraram-se permissivas à infecção, não conseguindo controlar o crescimento dos bacilos. A infecção induziu aumento da produção de IL-6, NO₂, CCL5, S100A9 e IFN- γ . Apesar do acúmulo inicial de HIF-1 α , a expressão gênica caiu com o passar do tempo. A expressão gênica de TLR2 e TLR9 também estava aumentada. A regulação positiva

de HIF-1 α em células epiteliais induziu uma redução de IL-6 e NO, sem, no entanto, interferir significativamente no número de CFU. BMDCs estimuladas com CM – IC mostraram maior produção de IL-1 β , IL-12, IL-6 e IL-10, maior expressão gênica de GLUT1 e HK2, além do acúmulo inicial de HIF-1 α , que foi degradado em 24 horas, acompanhado de baixa expressão de iNOS. A expressão MHC-II, CD80, CD86 e CCR7 estava aumentada em BMDCs submetidas ao CM – IC, enquanto a indução do acúmulo de HIF-1 α através do seu estabilizador, DMOG, foi capaz de reverter negativamente essa resposta. A maior maturação de BMDCs ocasionou maior proliferação de células TCD4+ naive, desfavorecendo a indução de células T CD4+ IFN γ +. Entretanto, as citocinas produzidas favorecerem a manutenção de células TCD4+ produtoras de IL-17. No entanto, o fenótipo de maior maturação foi perdido em BMDCs infectadas estimuladas com CM - IC, aliado à baixa produção de TNF e alta produção de IL-10. Em conclusão, HIF-1 α mostrou uma função anti-inflamatória, reduzindo a produção de moléculas pró-inflamatórias por AEC-II e regulando negativamente a maturação e a migração de DCs. Além disso, apesar de AEC-II infectadas por Mtb favorecerem a maturação e migração de DCs, o Mtb é capaz de subverter essa resposta.

Palavras-chave: AEC-II; Mtb; HIF-1 α ; BMDCs

Rodrigues, Tamara Silva. Interaction of type II alveolar epithelial cells and dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection: the role of HIF-1 α . 2018, 108 p. Master dissertation (Graduate Program in Basic and Applied Immunology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

ABSTRACT

Tuberculosis (Tb) is a chronic infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). In the alveolar space, the bacillus contacts cells from the immune system, such as dendritic cells (DCs), as well as alveolar epithelial cells (AEC). In Tb, the transcription factor HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1- alpha) is accumulated in infected macrophages and adjacent alveolar epithelial cells. Therefore, the aim of this work was to investigate the role of HIF-1 α in the proinflammatory response of type II AEC (AEC-II) and modulation of DCs function upon contact with AEC-II during Mtb infection. MLE-15 cells were infected with Mtb H37Rv (MOI10) to evaluate the permissiveness to infection (electron microscopy), killing ability (CFU) and cell activation through cytokine analysis (ELISA), nitrite (Griess assay), TLR2, TLR9 and HIF-1 α (qPCR and / or Western blotting). Bone marrow derived DCs (BMDCs) modulation by AEC-II, were analyzed directly (contact) or indirectly (conditioned medium - CM) of uninfected (CM-NIC) or infected (CM-IC) MLE-15. We determined cytokines (ELISA), nitrite (Griess Assay), HIF-1 α expression, glycolytic enzymes, co-stimulatory molecules and CCR7 (flow cytometry). Chemotaxis assay was performed on Boyden camera. Proliferation of naive CD4 + T cells in co-culture with BMDCs and maintenance of Th17 were assessed by flow cytometry. Eventually, BMDCs were previously infected with Mtb (MOI2) and then stimulated with CM-NIC or CM-IC. MLE-15 cells were permissive to infection, failing to control the bacilli growth. Infection induced increased production of IL-6, NO₂⁻, CCL5, S100A9 and IFN- γ . Despite the initial accumulation of HIF-1 α , gene expression dropped over time. The gene expression of TLR2 and TLR9 was also increased. Positive regulation of HIF-1 α in epithelial cells induced a reduction of IL-6 and NO, but did not significantly interfere with the number of CFU. BMDCs stimulated with CM-IC showed higher production of IL-1 β , IL-12, IL-6, and IL-10, greater GLUT1 and HK2 gene expression, in addition to the initial

accumulation of HIF-1 α , which was degraded within 24 hours, accompanied by low iNOS expression. The expression of MHC-II, CD80, CD86 and CCR7 was increased in BMDCs undergoing CM-IC, while the induction of HIF-1 α accumulation through its stabilizer, DMOG, was able to negatively revert this response. The higher maturation of BMDCs resulted in a greater proliferation of naive CD4 + T cells, but hampered induction of CD4 + IFN γ + T cells. However, cytokines produced favor the maintenance of IL-17 producing CD4 + cells. The phenotype of higher maturation was lost in Mtb-infected BMDC, accompanied by low TNF production and high IL-10 production. In conclusion, HIF-1 α showed an anti-inflammatory function, reducing the production of proinflammatory molecules by AEC-II and negatively regulating the maturation and migration of DCs. In addition, although Mtb-infected AEC-II favor maturation and migration of DCs, Mtb-infection of DCs is capable of subverting this response.

Keywords: AEC-II; Mtb; HIF-1 α ; BMDCs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental da infecção de células MLE-15 por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	35
Figura 2. Delineamento experimental da infecção de células MLE-15 por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv e posterior modulação de HIF-1 α	36
Figura 3. Delineamento experimental da co-cultura de células MLE-15 infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv e BMDCs.	38
Figura 4. Delineamento experimental da cultura indireta de BMDCs e células MLE-15 infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
Figura 5. Delineamento experimental da modulação de HIF-1 α na cultura indireta de BMDCs e células MLE-15 infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
Figura 6. Delineamento experimental do contato indireto de BMDCs infectadas e células MLE-15 infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
Figura 7. Delineamento experimental da co-cultura de células T CD4+ naive e BMDCs.	40
Figura 8. Delineamento experimental do ensaio de manutenção de células T CD4+ produtoras de IL-17.	41
Figura 9. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> é capaz de infectar e se replicar no interior de células epiteliais alveolares.	47
Figura 10. Células epiteliais alveolares são ativadas e produzem moléculas pró-inflamatórias mediante a infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	48
Figura 11. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> é capaz de induzir a morte de células epiteliais alveolares.	49
Figura 12. Células epiteliais alveolares alteram a expressão de HIF-1 α após a infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , porém não entram em glicólise aeróbica.	50
Figura 13. O inibidor de HIF-1 α é tóxico para células MLE-15 enquanto o DMOG não afeta a viabilidade celular independente da concentração.	51
Figura 14. HIF-1 α não participa da modulação da glicólise em células MLE-15 infectadas com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e está associado a um perfil anti-inflamatório de resposta.	53

Figura 15. HIF-1 α não afeta o crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> no interior de células epiteliais alveolares.	53
Figura 16. Célula epitelial infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> modulam a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas por células dendríticas.....	55
Figura 17. Produtos da célula epitelial infectada por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> modulam a produção de citocinas por células dendríticas.	56
Figura 18. Produtos da célula epitelial infectada por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> modulam a expressão de CCR7 e a migração de células dendríticas..	57
Figura 19. Produtos da célula epitelial infectada por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> modulam a expressão de moléculas co-estimuladoras por células dendríticas, facilitando a expansão de células TCD4+.	59
Figura 20. As células epiteliais alveolares modulam a função de DCs, inibindo o perfil de resposta Th1.	61
Figura 21. Produtos da bactéria modulam negativamente a expressão de MHC-II, CD86, CCR7 e iNOS por células dendríticas.	62
Figura 22. As células epiteliais alveolares modulam a função de DCs, favorecendo a manutenção de células CD4+ IL-17+.	63
Figura 23. Produtos da célula epitelial infectada por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> modulam o metabolismo e a expressão de HIF-1 α por células dendríticas.	65
Figura 24. HIF-1 α regula negativamente a expressão de moléculas co-estimuladoras por BMDCs.....	68
Figura 25. HIF-1 α contribui parcialmente para a produção de IL-6 por BMDCs moduladas por células epiteliais infectadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	69
Figura 26. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> consegue se sobrepor aos efeitos das células epiteliais sobre a função de células dendríticas	72
Figura 27. Resumo dos resultados.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers.....	42
--------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

A

AEC – Células epiteliais alveolares

ATP – Adenosina trifosfato

B

BMDC – *Bone Marrow derived Dendritic Cells*

BCG- *Bacillus Calmette-Guérin*

C

cDNA- DNA complementar

CM - Meio condicionado

CR- Receptors do complemento

D

DC – Células dendríticas

DMOG – *Dimethyloxalylglycine*

G

GLUT1 – Transportador de glicose 1

H

HIF-1 – Fator induzido por hipóxia -1

HK – hexoquinase

I

IC – Células infectadas

IFN- γ – Interferon gama

IL - Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase

L

LDH – Lactato desidrogenase

LPS – Lipopolissacarídeo

LX – Lipoxina

M

MCP-1- Proteína quimioatraente de monócitos

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

mTOR – *Mammalian Target of Rapamycin*

MR - Receptores de manose (MR)

N

NF-κB – Fator nuclear κB

NIC – Células não infectadas

NK – *Natural killers*

NO – Óxido nítrico

NO2- Nitrito

O

OMS – Organização Mundial da Saúde

OXPHOS – Fosforilação oxidativa

P

PAMPs - Padrões moleculares associados ao patógeno

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFK - Fosfofrutoquinase

PG - Prostaglandina

PHD - Prolilhidroxilases

PKM2 - Isoenzimas Piruvato quinase M1/M2

PPAR γ - Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões

R

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RNA – Ácido ribonucleico

RT- PCR – PCR em tempo real

S

SP – Proteína surfactante

T

Tb – Tuberculose

TCA - Ciclo do ácido cítrico

Th – Células T helper

TLR- Toll like receptors

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TR – Trato Respiratório

W

WT – Wild type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Geração da resposta imunológica contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
1.2 Células epiteliais alveolares na Tb	25
1.3 Resposta de células dendríticas na Tb	26
1.4 Metabolismo celular e HIF-1 α na Tb	28
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Linhagem de células	34
3.2 Cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
3.3 Infecção das células MLE-15	34
3.4 Preparação do inóculo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
3.5 Ensaio de Fagocitose e <i>Killing</i>	35
3.6 Modulação de HIF-1 α em células MLE-15	36
3.7 Animais	36
3.8 Obtenção de células dendríticas	37
3.9 Ensaio de contato direto ou indireto de MLE-15 e células dendríticas não infectadas	37
3.10 Modulação de HIF-1 α em BMDCs	38
3.11 Ensaio de contato indireto de MLE-15 e células dendríticas infectadas	39
3.12 Obtenção de células T CD4 ⁺ naive	39
3.13 Ensaio de co-cultura de células TCD4 ⁺ e células dendríticas	40
3.14 Ensaio de manutenção de células Th17	40
3.15 Detecção de citocinas	41
3.16 Produção de NO ₂	41
3.17 Extração de RNA	41
3.18 Síntese do DNA complementar (cDNA)	42
3.19 RT- PCR	42
3.20 Citometria de fluxo	42

3.20.1	<i>Marcação de células dendríticas</i>	43
3.20.2	<i>Marcação de células T CD4+</i>	43
3.20.3	<i>Detecção extracelular de citocinas</i>	43
3.20.4	<i>Detecção intracelular de citocinas</i>	44
3.21	Western Blotting	44
3.22	MTT	45
3.23	Lactato e glicose livre	45
3.24	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	47
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	APÊNDICE I – ESTRATÉGIAS DE GATE, CONTROLES E REPRESENTATIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	105
	APÊNDICE II ESTRATÉGIAS DE GATE, CONTROLES E REPRESENTATIVOS DA CO-CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E CÉLULAS T NAIVE	107
	APÊNDICE III ESTRATÉGIAS DE GATE, CONTROLES E REPRESENTATIVOS DA CULTURA DE CÉLULAS TH17	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Geração da resposta imunológica contra *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose (Tb) é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), de foco primariamente pulmonar (PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017). A transmissão ocorre através da inalação de gotículas de saliva ou aerossóis contendo a micobactéria (TORRELLES; SCHLESINGER, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), houve cerca de 10,4 milhões de novos casos de Tb em 2015. A doença foi responsável por 1,4 milhões de mortes no mesmo ano, permanecendo como uma das 10 principais causas de morte no mundo (WHO, 2016). Embora existam aproximadamente 2 bilhões de pessoas infectadas com Mtb atualmente, somente 5 a 10% irão desenvolver a forma ativa da doença, ou seja, na maioria dos casos, o sistema imune é capaz de controlar a infecção, que permanece latente (SMITH et al., 2017).

A apresentação clínica da Tb é heterogênea, uma vez que depende da resposta imune de cada hospedeiro (SCRIBA; COUSSENS; FLETCHER, 2017). A Tb ativa, que é transmissível, apresenta sintomas como febre, fadiga, falta de apetite e perda de peso, além de tosse persistente e hemoptise (tosse com sangue) (PAI et al., 2016).

A primeira linha de defesa contra Mtb é o epitélio do trato respiratório (TR). Para estabelecer a infecção, Mtb deve ultrapassar as barreiras físicas e químicas do TR, tais como cílios, muco e peptídeos antimicrobianos produzidos pelas células epiteliais desde a cavidade nasal até a cavidade alveolar (TORRELLES; SCHLESINGER, 2017). As *tight junctions* das células epiteliais do TR formam uma barreira física que bloqueia a entrada de substâncias externas no organismo. No entanto, muitas vezes, o epitélio não é capaz de conter o agente invasor, que consegue adentrar o tecido (HANSSON; JOHANSSON, 2010; JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013).

As primeiras células do sistema imune a entrarem em contato com Mtb são os macrófagos alveolares residentes e as células dendríticas (DCs) (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; WEISS; SCHAIBLE, 2015). Vários receptores estão envolvidos na fagocitose de Mtb por essas células. Os receptores do sistema

complemento (CR1, CR3 e CR4) são os principais facilitadores da fagocitose de Mtb opsonizada por proteínas do complemento. Já os receptores *scavenger*, como SR-A e MARCO, e lectinas do tipo C, especificamente receptores de manose (MR), DC-SIGN e dectina-1 colaboram na captura de Mtb não opsonizada (SCHÄFER et al., 2009; CANTON; NECULAI; GRINSTEIN, 2013).

Além dos receptores já descritos, outros PRRs reconhecem constituintes de Mtb e são ativados, especialmente os receptores do tipo Toll (TLR), tais como TLR2, TLR4 e TLR9. O TLR2 reconhece glicolipídeos da parede celular de Mtb levando a produção de citocinas como TNF- α , IL-12 e IL-10 por macrófagos e DCs (GOPALAKRISHNAN; SALGAME, 2016; KONOWICH et al., 2017). O TLR4 é ativado por proteínas de choque térmico (HSPs) 60/65 kDa e atua por meio da indução de autofagia e/ou apoptose para controlar o crescimento da micobactéria (KLEINNIJENHUIS et al., 2011). A cooperação entre TLR2 e TLR4 exerce papel crítico na indução de apoptose em macrófagos infectados com Mtb (SÁNCHEZ et al., 2010). Bafica e colaboradores evidenciaram a importância do reconhecimento via TLR9 para produção de IL-12 e IFN- γ , colaborando para a indução de resposta imune celular que contribui para a resistência do hospedeiro à infecção (BAFICA et al., 2005). Além dos TLR, receptores NOD, especificamente NOD2, desempenha uma função importante na resposta do hospedeiro para controle da infecção. Books e colaboradores demonstraram que o crescimento de Mtb em macrófagos NOD2^{-/-} foi significativamente maior comparado a macrófagos WT (*Wild Type*) (BROOKS et al., 2011). A ativação desses PRRs induz vias bioquímicas que culminam na expressão do fator de transcrição NF- κ B e indução de resposta inflamatória com recrutamento de neutrófilos, monócitos, DCs, células NK, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B, promovendo a formação dos granulomas.

Granulomas são estruturas histológicas que consistem em macrófagos e neutrófilos intercalados ao redor do sítio da infecção circundados por linfócitos T e B. Funcionam como uma barreira física, mantendo a micobactéria no seu interior e impedindo a sua disseminação (SCRIBA; COUSSENS; FLETCHER, 2017). No entanto, o granuloma não possui apenas papel protetor durante a Tb. Na infecção persistente, ele pode ser maior em decorrência do recrutamento contínuo de leucócitos, o que dificulta o

contato entre fagócitos e linfócitos T, contribuindo para o crescimento dos bacilos (SEGOVIA-JUAREZ; GANGULI; KIRSCHNER, 2004).

No interior dos fagócitos, a destruição de Mtb depende da capacidade microbicida intrínseca da célula e de fatores de virulência da bactéria (HELDWEIN; FENTON, 2002; VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). Na Tb progressiva, a micobactéria é capaz de evadir dos mecanismos de destruição clássicos da célula, como enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio (ROS), por meio do controle da maturação do fagossomo em um estágio em que não há interação com o lisossomo, prevenindo a acidificação de vesículas e, conseqüentemente, o processamento e morte da mesma (CLEMENS; HORWITZ, 1996). Conseguindo escapar dos mecanismos de destruição intracelulares, Mtb multiplica-se e a infecção adquire caráter crônico (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002).

Os macrófagos infectados por Mtb morrem por necrose ou apoptose. A necrose é caracterizada pela ruptura da célula infectada, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular, que induz a inflamação local e facilita a disseminação da micobactéria (CHACKERIAN; PERERA; BEHAR, 2001; PARANDHAMAN; NARAYANAN, 2014). Por outro lado, a apoptose é um mecanismo de morte celular silenciosa que mantém a integridade da membrana plasmática. A apoptose de macrófagos infectados ocorre por mecanismo extrínseco (via ligantes de superfície) ou intrínseco (mitocondrial), ambos culminando com a ativação de caspase 3 (PARANDHAMAN; NARAYANAN, 2014). A apoptose é essencial para o controle da infecção, uma vez que permite a formação de corpos apoptóticos que impedem a disseminação de Mtb. Corpos apoptóticos contendo bacilos/agentes infecciosos são englobados por DCs e macrófagos, um processo denominado eferocitose (LAM et al., 2017). Mtb virulenta é capaz de impedir o mecanismo de apoptose, favorecendo a necrose através da inibição na síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual é pró-apoptótica, e indução da produção de lipoxina A₄ (LXA₄), pró-necrótica. Sob tais condições, o dano da membrana interna mitocondrial leva à necrose dos macrófagos (CHEN; GAN; REMOLD, 2006; CHEN et al., 2008).

Durante o desenvolvimento da doença, os macrófagos podem ser encontrados em dois fenótipos, M1 ou M2. Macrófagos M1 possuem fenótipo pró-inflamatório e, uma vez ativados por LPS ou IFN- γ , liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6, IL-

12 e IL-18, as quais induzem o perfil Th1 de resposta, essencial para o controle da infecção (CHACKERIAN; PERERA; BEHAR, 2001). A resposta Th1 implica na produção de IFN- γ , que age na polarização de macrófagos M1, regulando positivamente a produção de NO (RICH et al., 1997) e, conseqüentemente, aumentando a capacidade microbicida do fagócito (FLYNN et al., 1993; SCHAIBLE et al., 1998a; CHAN; CHAN; SCHLUGER, 2001). Já os macrófagos M2 estão relacionados com reparo tecidual e induzem um perfil anti-inflamatório em resposta à citocinas Th2, como IL-4 e IL-13. Enquanto macrófagos M1 têm papel importante na restrição dos bacilos no interior do granuloma, macrófagos M2 estão associados à disseminação dos mesmos (HUANG et al., 2015; SHI; EUGENIN; SUBBIAN, 2016). Entretanto, o papel unicamente protetor de Th1 é controverso, já que uma resposta exacerbada de IFN- γ e macrófagos M1 pode ocasionar dano tecidual, o que é ruim para o hospedeiro (SASINDRAN; TORRELLES, 2011). Um estudo recente do nosso grupo mostrou a importância de macrófagos M2 no controle da magnitude da inflamação pulmonar na Tb e, em um microambiente pró-inflamatório, os macrófagos M2 podem controlar o crescimento da micobactéria (PIÑEROS et al., 2017).

Como previamente exposto, DCs também são infectadas por Mtb (HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997). DCs convencionais CD103⁺ intraepiteliais são capazes de alongar suas extensões celulares em direção ao lúmen alveolar, ultrapassando a barreira de células epiteliais (JAHNSEN et al., 2006; SUNG et al., 2006). As DCs reconhecem Mtb via PRRs, como TLR4, TLR9, NOD2, DC-SIGN, e regulam positivamente a expressão de MHC-I, MHC-II, CD40, CD80, entre outras moléculas que caracterizam a ativação dessas células e, geralmente, secretam citocinas pró-inflamatórias como, IL-12, IL-1, IL-6 e TNF- α (MIHRET, 2012; KHAN et al., 2016). Após o processamento da micobactéria, as DCs ativadas migram para os linfonodos regionais a fim de apresentar antígenos de Mtb para células T, contribuindo para um passo crucial na indução da resposta imune adaptativa contra os bacilos (MIHRET, 2012). Um estudo do nosso grupo mostrou que DCs CD103⁺ induzem células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17, evidenciando a necessidade dessas células para uma resposta adaptativa protetora contra Mtb (SÉRGIO et al., 2015).

A resposta mediada por DCs e macrófagos é influenciada pelo microambiente. As células epiteliais alveolares (AEC - *Alveolar Epithelial Cells*), especialmente AEC do tipo

II, são células capazes de reconhecer Mtb através de PRRs, produzindo citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos que podem desempenhar papel importante sobre células do sistema imune durante a Tb (LI; WANG; LIU, 2012).

1.2 Células epiteliais alveolares na Tb

O espaço alveolar é composto primordialmente por dois tipos celulares, células epiteliais alveolares tipo I (AEC-I) e células epiteliais alveolares tipo II (AEC-II). As AEC-I consistem em aproximadamente 95% do espaço alveolar e funcionam essencialmente para a troca de gases. Já as AEC-II consistem em apenas 5% do espaço alveolar e são necessárias para a síntese de surfactantes que protegem o pulmão de colapso, atuam no reparo epitelial após dano, além de contribuírem para a defesa do espaço alveolar por meio da secreção de proteínas surfactantes (SPETH et al., 2016). As proteínas surfactantes produzidas pelas AEC-II, como a proteína surfactante A (SP-A), induzem maior adesão de Mtb tanto às próprias AEC-II como aos macrófagos alveolares e neutrófilos, aumentando o risco de infecção (PASULA et al., 1999). Por outro lado, proteínas surfactantes do tipo D (SP-D) reduzem a capacidade de adesão de Mtb, demonstrando que o tipo de proteína surfactante secretada por células epiteliais pode influenciar no risco de infecção (FERGUSON et al., 1999).

As células epiteliais do TR expressam TLR de superfície, como TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 e TLR endossomais, como TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 (LI; WANG; LIU, 2012). No contexto da Tb, TLR2 e TLR4 estão entre os principais TLR envolvidos no reconhecimento de constituintes de Mtb por células epiteliais (ARMSTRONG et al., 2004; LI; WANG; LIU, 2012). Apesar da importância de TLR2 no reconhecimento de Mtb, em células não hematopoiéticas, esse processo está associado a uma resposta pró-patogênica levando a uma maior inflamação e disseminação do bacilo (KONOWICH et al., 2017).

Uma das formas de captura de Mtb por AEC-II é via glicoproteínas denominadas sindecanos (ZIMMERMANN et al., 2016). Após o reconhecimento de constituintes de Mtb, as AEC-II podem secretar TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1, CXCL-8, CXCL-5, além de β -

defensinas, catelicidinas (LL-37), ROS e óxido nítrico (NO) (SHARMA et al., 2007; RIVAS-SANTIAGO et al., 2008c; LI; WANG; LIU, 2012; BOGGARAM et al., 2013; NOUAILLES et al., 2014). Ademais, um estudo *in vitro* mostrou que as AEC-II também são capazes de produzir IFN- γ *de novo*, além de regularem positivamente a expressão de receptores para IFN- γ , aumentando a produção de NO (SHARMA et al., 2007).

As AEC-II participam não somente na indução de uma resposta inflamatória, mas também possuem propriedades anti-inflamatórias. Um estudo mostrou que as AEC-II, quando em contato com *Bacillo Calmette Guerin* (BCG), são capazes de induzir a produção de IL-10 e IL-22 (LUTAY et al., 2014). Dessa forma, essas células conseguem modular a resposta inata local, seja para um perfil pró ou anti-inflamatório.

1.3 Resposta de células dendríticas na Tb

Quatro populações de DCs são encontradas no pulmão: DCs plasmocitóides (pDCs), DC derivadas de monócitos (moDCs) e dois subgrupos DC migratórias, a DC CD103+ e a DC CD11b+, cuja expressão CD11c é maior, sendo então denominadas de convencionais (cDCs) (DESCH; HENSON; JAKUBZICK, 2013). As DCs são essencialmente importantes para orquestrar a resposta imune adaptativa, uma vez que são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T (PALUCKA; BANCHEREAU, 1999; STEINMAN; HEMMI, 2006). Desse modo, as DCs migratórias presentes no espaço alveolar ou na lâmina própria, encontram o antígeno, que vem pelas vias aéreas, o processa, sofre maturação e vai até os linfonodos para desencadear a ativação e proliferação de linfócitos (GEURTSVANKESSEL; LAMBRECHT, 2008).

Sabe-se que há um atraso na maturação e migração das DCs na infecção por Mtb. Um estudo demonstrou que as DCs CD11c+ CD86+ só migraram significativamente aos 21 dias após a infecção nas DCs dos linfonodos (GARCIA-ROMO et al., 2004). Outro estudo mais recente demonstrou que tanto a cDCs CD11b+ como a cDCs CD103+ somente migram significativamente para os linfonodos no 14º dia após a infecção (LAI et al., 2018). Ambos os estudos demonstram maior replicação do bacilo durante o atraso da migração, que se correlaciona também que o atraso da chegada de células Th1 para o local da infecção (LAI et al., 2018).

Nosso grupo mostrou que as DCs CD103+ são importantes para a magnitude da resposta das células T CD4+ IFN γ em animais C57BL/6 infectados por Mtb (SÉRGIO et al., 2015). No entanto, recentemente, demonstrou-se que as CD11b+cDCs são as principais responsáveis pelo *priming* de células T CD4+, enquanto que a CD103+ cDC regula a função da CD11b+cDC através da produção de IL-10 (LAI et al., 2018). Dessa forma, não está tão clara a divisão de funções entre essas células.

O Mtb é capturado por DCs principalmente através de um receptor chamado DC-SIGN, que consiste em uma lectina dependente de cálcio (tipo C) que reconhece domínios ricos em manose e é conhecida como exclusiva de DCs (TAILLEUX et al., 2003). Entretanto, as DCs também podem reconhecer micobactérias através de receptores de manose (MR) e TLRs, incluindo TLR2 e TLR4. Após a ligação do Mtb ao TLR2 e ao TLR4, as DC secretam TNF, que está envolvido com a maturação das DCs (TSUJI et al., 2000). Além disso, o TLR2 foi descrito como importante para a produção de IL-6 e IL-10 por DC infectadas por Mtb (JANG et al., 2004).

Após a infecção, o bacilo reduz a capacidade de fagocitose das DCs, enquanto induz ativação e maturação dessas células, com expressão aumentada de moléculas co-estimuladoras, por exemplo, CD80, CD83, CD86, MHC-I, MHC-II, ICAM-1 (CD54) e CD(BODNAR; SERBINA; FLYNN, 2001; GIACOMINI et al., 2001; BEHARKA et al., 2002; LATCHUMANAN et al., 2002; JANG et al., 2004). Este fato indica que as DCs são APCs eficazes no *priming* das células T. No entanto, outro estudo relatou que DCs infectadas com H37Rv têm sua maturação dificultada, com menor expressão das moléculas citadas acima, levando a uma ativação não efetiva das células T (HANEKOM et al., 2003).

A infecção por Mtb pode culminar com a produção de IL-1 β , IL-12, IL-6, IL-10 e TNF- α pelas DCs (BODNAR; SERBINA; FLYNN, 2001). A baixa produção de IL-12, uma citocina crítica para desencadear uma resposta de IFN- γ , foi associada ao aumento de IL-10 que pode regular negativamente essa citocina (HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997; DEMANGEL; BRITTON, 2000; TASCONE et al., 2000; BODNAR; SERBINA; FLYNN, 2001).

As DCs infectadas com Mtb são capazes de induzir não apenas uma resposta de células T CD4+, mas também uma ativação de células T CD8+. Um estudo anterior elucidou que DCs infectadas por Mtb sofrem apoptose e, durante este processo, liberam

vesículas extracelulares contendo antígenos de Mtb, que são capturados por DCs não infectadas. Além disso, as vesículas apoptóticas também são críticas para a iniciação cruzada de células T CD8⁺ (WINAU et al., 2006). Após a captura dessas vesículas, as DCs não infectadas ativam as células T CD8⁺ pela apresentação de MHC-I e CD1, resultando na produção de IFN- γ (SCHAIBLE et al., 2003; WINAU et al., 2006), que irá aumentar a atividade antimicrobiana de macrófagos, permitindo a morte dos bacilos (SCHAIBLE et al., 1998b).

1.4 Metabolismo celular e HIF-1 α na Tb

O estado metabólico das células do sistema imune influencia diretamente no exercício da sua função (SHI; EUGENIN; SUBBIAN, 2016). Por esse motivo, cada uma delas possui uma assinatura metabólica. A reprogramação metabólica para a glicólise aeróbica e a síntese de ácidos graxos ocorre na maioria das células em seu estado pró-inflamatório, como macrófagos M1, DCs maduras, linfócitos Th17 (O'NEILL; PEARCE, 2016). Por outro lado, macrófagos M2, células T reguladoras e T de memória têm uma preferência metabólica para a fosforilação oxidativa (OXPHOS) e oxidação de ácidos graxos (PEARCE; PEARCE, 2013; CORCORAN; O'NEILL, 2016).

O processo de diferenciação de DCs é dependente de mecanismos metabólicos que integram a função mitocondrial intacta e a síntese de ácidos graxos, com envolvimento de PPAR γ , mTOR e MYC. Uma vez diferenciadas, as DCs imaturas utilizam a oxidação de ácidos graxos como principal forma de obtenção de energia. No entanto, quando ativadas via TLRs, por exemplo, as DCs aumentam a taxa glicolítica e da via das pentoses, acompanhadas pela redução da OXPHOS e da oxidação de ácidos graxos. Após a ativação dessas células, elas permanecem realizando a glicólise graças aos fatores de transcrição mTOR e HIF-1 α (PEARCE; EVERTS, 2015).

Enquanto o metabolismo de células imunes segue um padrão de acordo com o tipo de célula e estado de ativação, estudar o metabolismo de células epiteliais é um desafio. Em condições de normóxia essas células usam preferencialmente a OXPHOS para a obtenção de ATP. No entanto, essas células AEC-II possuem uma adaptação para

manutenção da sua homeostase energética mesmo em condições de hipóxia, em que geralmente as células imunes entram em glicólise. Portanto, essas células se mostraram capazes de manter níveis de ATP sem aumentar a sua taxa glicolítica (LOTTE et al., 2014).

Um estudo recente demonstrou que Mtb induz o efeito Warburg em macrófagos infectados, promovendo a polarização para macrófagos M1 que ativam a resposta Th1 protetora (SHI et al., 2015). Entretanto, um dos mecanismos que a micobactéria induz para escapar da resposta imune é o bloqueio da glicólise aeróbica e preferência pela fosforilação oxidativa, levando à diferenciação de macrófagos M2 no lugar de M1, facilitando a progressão da infecção (SHI; EUGENIN; SUBBIAN, 2016).

Para a indução do Efeito Warburg, o HIF-1 exerce um papel chave (GABER; STREHL; BUTTGEREIT, 2017). HIF-1 ou fator induzido por hipóxia, é um dos fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória. É um heterodímero formado pela subunidade constitutiva HIF1- β e pela subunidade induzida HIF1- α , expressa em condições de privação de oxigênio (NIZET; JOHNSON, 2009). Em condições de normóxia, a proteína prolin-4-hidroxilase (PHD) é a enzima responsável por hidroxilar HIF-1 α , permitindo o reconhecimento pela proteína von Hippel-Lindau que marca HIF-1 α , levando à ubiquitinação e sua degradação no proteassoma (HUANG et al., 1998; GORRES; RAINES, 2010). No entanto, na ausência ou redução de oxigênio, a atividade de PHD é reduzida, levando ao acúmulo de HIF-1 α na célula. Dessa forma, o complexo HIF-1 é formado e liga-se na região promotora de genes induzidos por hipóxia, regulando-os positivamente (CORCORAN; O'NEILL, 2016). Os genes regulados positivamente pelo complexo HIF-1 estão envolvidos em mecanismos de sobrevivência celular, angiogênese, apoptose, eritropoiese, metabolismo de glicose e regulação do pH (SEMENZA, 2000).

Vários genes da via glicolítica são regulados pelo mesmo, tais como: hexoquinase II, que catalisa a primeira etapa da glicólise; fosfofrutoquinase, enzima que limita a velocidade da glicólise; glicose-6-fosfato desidrogenase, que catalisa o primeiro passo na via pentose fosfato; lactato desidrogenase, que catalisa a produção de lactato; piruvato desidrogenase quinase, que inibe a produção de acetil-coA catalisada por piruvato desidrogenase (PDH); lactato desidrogenase (LDH), que catalisa a conversão

de piruvato a lactato; os transportadores de glicose-1 e 3 (GLUT-1 e GLUT-3), responsáveis pela captura de glicose, entre outros. A mudança no metabolismo celular também leva ao acúmulo de succinato, que inibe as enzimas PHD, permitindo o acúmulo de HIF-1 α e, conseqüentemente, regulando positivamente a expressão de genes envolvidos na glicólise (CORCORAN; O'NEILL, 2016).

Lesões pulmonares decorrentes do desenvolvimento de Tb são caracterizadas por hipóxia, sugerindo uma relação sinérgica entre HIF-1 α e resposta imune na Tb. Um estudo recente demonstrou um papel dual de HIF-1 α na tuberculose, o qual demonstra ser importante no início da infecção, enquanto é ruim na infecção tardia, uma vez que contribui para a inibição da apoptose, o que favorece o crescimento de Mtb (Baay Gusman et al 2018). Além disso, evidenciou-se que HIF-1 α regula positivamente a secreção de metaloproteinases de matriz 1 (MMP-1), que são as principais responsáveis pela destruição do tecido pulmonar durante a Tb (ONG; ELKINGTON; FRIEDLAND, 2014), indicando que Mtb desencadeia uma cascata pró-inflamatória no tecido pulmonar que está associada ao HIF-1 α (BELTON et al., 2016).

A estabilização de HIF-1 α ocorre não somente devido à condição de redução nos níveis de oxigênio, mas também é decorrente do acúmulo de intermediários do ciclo de Krebs, como o succinato, que inibe as enzimas que degradam HIF-1 α (TANNAHILL et al., 2013). Observou-se que, mesmo em condições de normóxia, Mtb consegue estabilizar HIF-1 α em quantidades elevadas em macrófagos e células epiteliais brônquicas (BELTON et al., 2016). Nesse contexto, é provável que o succinato esteja relacionado com a estabilização na expressão de HIF-1, e conseqüentemente, no acúmulo da molécula, que induz a produção de IL-1 β e NO (ELKS et al., 2013; TANNAHILL et al., 2013). IL-1 β é um mediador chave da inflamação e NO é uma substância microbicida essencial, sendo ambas importantes para resistência do hospedeiro durante a infecção por Mtb (KRISHNAN; ROBERTSON; THWAITES, 2013)..

Portanto, HIF-1 α , através da indução de reprogramação metabólica, exerce papel fundamental na resposta imune pró-inflamatória na Tb, a qual é importante para o controle da infecção (CORCORAN; O'NEILL, 2016). Entretanto, quando em excesso, HIF-1 pode contribuir indiretamente para o dano tecidual (BELTON et al., 2016). Nesse contexto, o papel de HIF-1 α em AEC-II infectadas e na função de DCs ainda precisa ser

investigado afundo, para que se possa determinar se no início da infecção esse fator de transcrição seria de fato benéfico ou não na interação entre essas células.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel de HIF-1 α na resposta pró-inflamatória de células epiteliais alveolares do tipo II (AEC-II) e na modulação da função de células dendríticas (DCs) em contato com AEC-II durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Determinar a permissividade de AEC-II à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.
- 2.2.2 Investigar a expressão gênica e o acúmulo de HIF-1 α em AEC-II após a infecção com *Mycobacterium tuberculosis*.
- 2.2.3 Investigar a função de HIF-1 α na ativação de AEC-II infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*.
- 2.2.4 Avaliar a maturação e produção de citocinas por DCs em contato direto e indireto (meio condicionado) com AEC-II infectada.
- 2.2.5 Investigar a expressão de CCR7 e a migração de DCs após contato indireto com AEC-II infectada.
- 2.2.6 Caracterizar o HIF-1 α e o perfil metabólico de DCs após contato indireto com AEC-II infectada.
- 2.2.7 Avaliar a maturação e produção de citocinas por DCs em contato indireto com AEC-II infectada na interdependência de HIF-1 α .
- 2.2.8 Investigar a expressão de CCR7 e a migração de DCs após contato indireto com AEC-II infectada na interdependência de HIF-1 α .
- 2.2.9 Avaliar a ativação e perfil de células TCD4⁺ favorecido por DCs após modulação por AEC-II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2.10 Avaliar a reativação e manutenção de células TCD4+ efectoras por DCs após modulação por AEC-II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem de células

Foram utilizadas células epiteliais imortalizadas de pulmão murino (MLE-15). As células MLE-15 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), 5 mg/L de insulina, 10 µg/ml de transferrina, 3 ng/ml de selenito de sódio, 10 nM de hidrocortisona, 10 nM de β-estradiol e 1% de penicilina/estreptomicina (RPMI completo). Atmosfera: 95% ar; 5% CO₂. Temperatura: 37° C.

3.2 Cepa de *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb cepa H37Rv (American Type Culture Collection 27294, Rockville, MD) foram cultivados em meio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) a 37° C durante 10-11 dias e preparada como descrito previamente (SÉRGIO et al., 2015).

3.3 Infecção das células MLE-15

Foram plaqueadas 1×10^6 células/poço em volume total de 900 µL em placas de 24 poços em meio RPMI completo, sem antibióticos. As células ficarão *overnight* para aderirem aos poços. No dia seguinte, a infecção será realizada em MOI10. Preparamos o inóculo de acordo com o que está descrito no item 3.4. Após ajuste final da escala de 1×10^7 bactérias/ml, centrifugamos a 3500 RPM por 20 min e diluímos em volume suficiente de RPMI incompleto para adicionamos 10×10^6 bactérias por poço, em volume de 100µL. Adicionamos então 100 µL da solução de bactérias, conferindo MOI10 em cada poço. Após 4 horas de infecção, lavamos os poços duas vezes com PBS 1x. Para o ensaio de fagocitose, lisamos as células após as lavagens com saponina 0,05% e em seguida, fazemos 6 diluições seriadas seguidas e plaqueamos as 4 últimas em placas de 7H11. Os poços direcionamos para outros ensaios são adicionados um novo meio RMPI

completo sem antibiótico e as células permaneceram em cultura por mais 24 ou 48 horas (**Figura 01**).

Figura 1. Delineamento experimental da infecção de células MLE-15 por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

3.4 Preparação do inóculo de *Mycobacterium tuberculosis*

A preparação do inóculo de Mtb H37Rv (ATCC 27294) para infecção foi realizada a partir de uma alíquota de micobactérias (1000 μ L) à -70°C (com viabilidade superior a 85%), de acordo com metodologia descrita por Fonseca et al. (da Fonseca, Silva et al. 2009). Essa alíquota de micobactérias foi distribuída em 2,5 mL de meio Middlebrook 7H9 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) enriquecido com 10% de OADC™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), seguindo-se incubação por 10 dias a 37°C. Após incubação a suspensão foi diluída para determinar sua concentração utilizando como padrão a Escala de McFarland, que representa 1×10^7 bacilos/mL, como descrito previamente (da Fonseca et al., 2007). Para quantificação do inóculo experimental (controle da infecção) uma alíquota de 100 μ L do mesmo inóculo foi diluído em 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000. Em seguida um volume de 100 μ L de cada uma das diluições foi plaqueado em meio 7H11 (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) e incubadas por 28 dias a 37°C. Após o período de incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC) e corrigidas pelo fator de diluição.

3.5 Ensaio de Fagocitose e *Killing*

A fagocitose foi avaliada no tempo de 4 horas, enquanto o *killing* foi avaliado nos tempos 24, 48 e 72 horas após a infecção. Após a incubação durante 4 horas com Mtb, células

MLE-15 foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Em seguida, para os dois ensaios, lisamos as células após as lavagens com saponina 0,05% e em seguida, fazemos 6 diluições seriadas seguidas e plaqueamos as 4 últimas em placas de 7H11. Ambos foram quantificados pela contagem de CFU (*Colony Forming Units*) em placas com 7H11 após 30 dias em estufa à 37°C e 5% CO₂.

3.6 Modulação de HIF-1α em células MLE-15

As células MLE-15 serão tratadas com inibidor de HIF-1α (100 μM) e com inibidor de PHDs, dimetiloxalilglicina (DMOG 300 μM) 4 horas depois da infecção para avaliação da fagocitose, *killing* e moléculas secretadas, respectivamente, como demonstrado da **Figura 02**.

Figura 2. Delineamento experimental da infecção de células MLE-15 por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e posterior modulação de HIF-1α.

3.7 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 SPF (*Specific Pathogen Free*) selvagens (WT - *Wild Type*) de 6-8 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos em microisoladores em laboratório nível II com livre acesso à água e ração. Os procedimentos de manutenção de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 198/2017) de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os camundongos foram eutanasiados por dose excessiva de anestésicos via intra-orbital (quetamina 90 mg/kg e

xilazina 10 mg/kg), e, em seguida, foi realizado o procedimento para retirada da medula óssea em condições estéreis seguindo protocolo já descrito (MATHEU et al., 2008).

3.8 Obtenção de células dendríticas

Retiramos a medula óssea de camundongos previamente eutanasiados. Fizemos o *flush* para retirada dos precursores da medula óssea. Centrifugamos essas células a 1500RPM por 10 min e ressuspendemos em meio RPMI 10% FBS 1% penicilina, 0,1% β mercaptoetanol, 0,1% gentamicina (RMPI completo DCs) acrescentando GMSCF 20ng/mL em volume total de 10 mL e readicionando mais 10 mL de meio RPMI e 400ng de GM-CSF para manter a concentração de 20ng/mL no 3º dia. No 7º dia, coletamos as células não aderidas que correspondem às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs).

3.9 Ensaio de contato direto ou indireto de MLE-15 e células dendríticas não infectadas

Células MLE-15 (1×10^6 células/mL) foram plaqueadas em placas de 24 poços e deixadas *overnight* para adesão.

- a) **Contato direto:** 1×10^6 células MLE-15 foram incubadas por 4 horas com H37Rv (MOI 1:10). Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS1x e adicionamos gentamicina 200 μ g/mL para garantir a ausência de bacilos extracelulares de Mtb. Depois, $0,5 \times 10^6$ BMDCs predominantemente CD11c⁺CD11b⁺ imaturas foram adicionadas em co-cultura com essas células durante 48 horas com células MLE-15 infectadas (IC) ou não infectadas (NIC) e depois analisadas quanto a expressão de marcadores de ativação de superfície em DCs (MHC-II, CD80, CD86) e citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 (**Figura 03**).

Figura 3. Delineamento experimental da co-cultura de células MLE-15 infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e BMDcs.

b) Contato indireto: Células MLE-15 foram incubadas por 4 horas com H37Rv (MOI 1:10). O meio condicionado (CM) dessas células foi coletado após 48 horas. Em seguida, foram filtrados com filtro 0.22 μ M para garantir a ausência de bacilos de Mtb. Concomitantemente, BMDcs predominantemente CD11c⁺CD11b⁺ imaturas serão incubadas durante 24 horas com o CM de células MLE-15 infectadas (CM – IC) ou não infectadas (CM – NIC) e depois analisadas quanto a expressão de marcadores de ativação de superfície em DCs (MHC-II, CD80, CD86, CCR7) e citocinas intracelulares (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10 e IL-12). O delineamento está descrito na **Figura 04**.

Figura 4. Delineamento experimental da cultura indireta de BMDcs e células MLE-15 infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

3.10 Modulação de HIF-1 α em BMDcs

As células BMDcs submetidas ao CM-IC foram tratadas concomitantemente com inibidor de PHDs, dimetiloxaloilglicina (DMOG 200 μ M) por 24 horas para avaliarmos a influência de HIF-1 α na expressão de marcadores de ativação de superfície em DCs (MHC-II, CD80, CD86, CCR7) e citocinas intracelulares (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10 e IL-12) (**Figura 05**).

Figura 5. Delineamento experimental da modulação de HIF-1 α na cultura indireta de BMDCs e células MLE-15 infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

3.11 Ensaio de contato indireto de MLE-15 e células dendríticas infectadas

Foram plaqueadas 2×10^6 células/poço em placas de 24 poços em meio RPMI contendo 10% SFB, sem antibióticos. As células ficarão *overnight*. No dia seguinte, a infecção foi realizada em MOI 2. Após 4 horas em contato com Mtb H37Rv, lavamos as células duas vezes com PBS1x e em seguida adicionamos o CM de células MLE-15 infectadas (CM – IC) ou não (CM -NIC). Após 24 horas de contato foram analisadas por citometria de fluxo as moléculas (MHC-II, CD80, CD86, CCR7) e citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF e IL-10) por ELISA (**Figura 06**).

Figura 6. Delineamento experimental do contato indireto de BMDCs infectadas e células MLE-15 infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

3.12 Obtenção de células T CD4+ naive

Para a obtenção de células T CD4+ naive, retiramos o baço e os linfonodos de animais WT eutanasiados. Em seguida, fizemos duas separações por beads em colunas, uma primeira separação negativa, obtendo células CD4+ e outra separação positiva de células

CD4⁺ CD62L⁺, que foram consideradas T naive. O procedimento foi realizado seguindo as instruções do kit CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation kit, mouse (Miltenyi Biotec)

3.13 Ensaio de co-cultura de células TCD4⁺ e células dendríticas

Plaqueamos $0,5 \times 10^5$ DCs em placa de 96 poços de fundo U. Essas células foram incubadas em CM- NIC ou CM- IC durante 24 horas. No dia seguinte, adicionamos células 1×10^5 células T naive por poço juntamente com anti-CD3 (1 µg/mL). Após 4 dias de co-cultura coletamos o sobrenadante para ELISA e as células para análise por citometria de fluxo (**Figura 07**).

Figura 7. Delineamento experimental da co-cultura de células T CD4⁺ naive e BMDCs.

3.14 Ensaio de manutenção de células Th17

Células T naive foram plaqueadas em placa de 24 poços de fundo reto previamente sensibilizadas com anti-CD3 (2 µg/mL). Adicionamos em seguida: anti-CD28 (1 µg/mL), TNFβ (50 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), IL-23 (5 ng/mL), IL-1β (20 ng/mL), anti-INFγ (2,5 µg/mL), anti-IL-4 (2,5 µg/mL) e anti-IL-2 (2,5 µg/mL). No 3º dia, adicionamos 100 µL do CM de DCs estimuladas conforme o item **3.9 b**. e incubamos por mais 2 dias. Após esse período, coletamos o sobrenadante para análise de citocinas por ELISA e as células para análise por citometria de fluxo (**Figura 08**).

Figura 8. Delineamento experimental do ensaio de manutenção de células T CD4+ produtoras de IL-17.

3.15 Detecção de citocinas

As citocinas IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-10 foram determinadas nos sobrenadantes das culturas de células MLE-15 nos tempos de 24 e/ou 48 horas por ensaio imunoenzimático utilizando *kits Opteia* (BD PharMingen) ou *DuoSet* (R&D Systems), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.16 Produção de NO₂-

A produção de NO foi mensurada indiretamente através da concentração de NO₂- (nitrito) produzido pelas células MLE-15 infectadas ou BMDCs, determinado utilizando o ensaio colorimétrico de Griess com posterior leitura por espectrofotômetro, conforme previamente descrito em outros trabalhos (ROY et al., 2004; DING et al., 2005).

3.17 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção de MLE-15 ou nos tempos de 6, 12, e 24 horas para DCs estimuladas com CM de MLE-15. A extração foi feita através do kit RNeasy Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado através do NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific).

3.18 Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA será sintetizado utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*, seguindo as instruções do fabricante.

3.19 RT- PCR

A reação de RT-PCR foi realizada de acordo com o protocolo padronizado no laboratório e previamente descrito (PIÑEROS et al., 2017). Foi avaliada a expressão gênica de HIF-1 α , TLR2, TLR9 em células MLE-15 infectadas, e HIF-1 α e enzimas da via glicolítica (GLUT1, HK2, PKM2) em DCs em contato indireto com MLE-15 infectadas. Os primers utilizados estão descritos na **Tabela 01**.

Tabela 1 - Primers

Gene	Primers	
<i>hifa</i>	F	ACC TTC ATC GGA AAC TCC AAA G
	R	CTG TTA GGC TGG GAA AAG TTA GG
<i>tlr2</i>	F	AAG TCT CCG GAA TTA TCA GTC C
	R	TGA TGG ATG TCG CGG AT
	R	GCC AGG TTT TGA AGG CAA GT
<i>tlr9</i>	F	GGA CCT ACA GCA GAA TAG CTC A
	R	AAC TCG GGA ACC AGA CAT G
<i>glut1</i>	F	ATG GAT CCC AGC AGC AAG
	R	CCA GTG TTA TAG CCG AAC TGC
<i>hk2</i>	F	CGG AAT GGG GAG CCT TTG G
	R	GCC TTC CTT ATC CGT TTC AAT GG
<i>pkm2</i>	F	TCG CAT GCA GCA CCT GAT T
	R	CCT CGA ATA GCT GCA AGT GGT A

3.20 Citometria de fluxo

3.20.1 Marcação de células dendríticas

Marcações extracelulares: As DCs foram caracterizadas como F4/80-/CD11c+/CD11b+/MHC-II+ utilizando os anticorpos F4/80 Percp, CD11c PECY7, CD11b BV711, MHC-II FITC. Para a marcação de moléculas extracelulares características de maturação de DCs utilizamos os anticorpos CD11c PECY7, MHC-II FITC, CD86 PE e CCR7 PE.

Marcação intracelular: A única marcação intracelular realizada em BMDCs foi iNOS, através do anticorpo iNOS-APC. Todos os anticorpos foram obtidos da BD bioscience e titulados previamente.

3.20.2 Marcação de células T CD4+

Nos experimentos de co-cultura com células T CD4+, marcamos CD4 PECY7, IFN γ APC, IL-17 PE ou KI67 FITC.

A maioria dos experimentos contaram com controles FMO, que podem ser verificados no **Apêndice III**.

3.20.3 Detecção extracelular de citocinas

1 x 10⁶ DCs coletadas por poço foram incubadas a 4°C por 20 minutos com sobrenadante de cultura de células 2.4G2 (contendo anticorpos anti-Fc γ RII/III), diluído 1:1. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais descritos acima, durante 20 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas com 2 mL de tampão PBS contendo 2% SBF, seguindo-se fixação com solução tamponada contendo 1% de formol. As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCantoTMII (BD, San José, CA, USA), no qual foram coletados, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. Inicialmente, foi selecionada uma região para exclusão das células aderidas entre si, processo conhecido como exclusão de *doublers*. Em seguida, as células foram avaliadas

por tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade de fluorescência. Para isso, as células foram selecionadas pelos parâmetros de FSC-A (área) e FSC-H (altura). Após excluídos os *doublers*, foram utilizados os parâmetros de FSC-A e SSC-A, para selecionar região correspondente às DCs ou aos linfócitos. Em seguida realizamos as gates para células dendríticas (F4/80-/CD11c+/CD11b+/MHC-II+) e para marcadores de ativação MHC-II, CD80, CD86 e de migração, CCR7.

3.20.4 Detecção intracelular de citocinas

Após a realização de cultura de células de pulmão as células foram coletadas e fixadas com 4% de formaldeído (Synth – Diadema, SP, Brasil) diluído em PBS, para volume final de 120 µL. As células foram agitadas vigorosamente e incubadas por 11 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS e a suspensão celular foi incubada por até 3 dias a 4°C. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1500 RPM, por 10 minutos a 4°C e lavada com 1 mL de PBS. Para a permeabilização, a suspensão celular foi ressuspendida em tampão de permeabilização contendo 1% de SBF e 0,2% de saponina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluídos em PBS para volume final de 1 mL por tubo. A suspensão celular foi agitada vigorosamente e centrifugada a 453 x g, por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 50 µL de tampão de permeabilização contendo sobrenadante de cultura de células 2.4G2, diluído 1:1 e incubadas por 20 minutos, a 4°C. Após o bloqueio, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais para iNOS APC, no caso das DCs ou IFN- γ APC e IL-17 PE para marcações de células T, durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de tampão de permeabilização e lavadas novamente com 1 mL de PBS. Por fim, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS1x. As amostras foram adquiridas em FACSCantoTMII e analisadas utilizando-se o software FlowJoTM 7.6.1, como descrito no anteriormente.

3.21 Western Blotting

O Acúmulo de HIF-1 α em células MLE-15 infectadas e em DCs foi avaliado por western blotting. Utilizamos gel de 8% para a corrida das amostras. O anticorpo primário utilizado para HIF-1 α (Sigma aldrich) diluição 1:1000 foi adicionado *overnight* após a transferência úmida das amostras e bloqueio com leite 5%. No dia seguinte, após lavagens sucessivas (15 min) adicionamos o anticorpo anti-rabbit (1:5000) durante 2 horas. Utilizamos como endógeno para MLE-15 a β actina e para a DC usamos o GAPDH. Revelamos a membrana com ECL e fotografamos.

3.22 MTT

O ensaio colorimétrico MTT foi realizado em células MLE-15 infectadas ou não, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2×10^5 cel/ poço). No dia seguinte, fizemos a infecção como previamente descrito. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas, retiramos o meio e adicionamos o MTT por 4 horas. Paramos a reação com SDS. No dia seguinte, fizemos a leitura da viabilidade celular através da formação do sal de formazan de coloração roxa, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

3.23 Lactato e glicólise livre

Os ensaios de lactato e glicose livres foram realizados utilizando os kits colorimétricos da Sigma Aldrich, seguindo as instruções do fabricante.

3.24 Análise estatística

Utilizaremos o programa Graphpad Prism 6.0. Inicialmente, será realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk, seguido do teste de Levene's para avaliar homogeneidade de variâncias. Os experimentos com dois grupos cujos dados sejam positivos para ambos os testes serão analisados aplicando teste t não pareado (*two tailed*) e os que não

passaram no teste serão analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para mais de dois grupos, aqueles cujos dados passarem nos dois testes serão analisados utilizando análise de variância de uma via (ANOVA), aplicando o teste Newman Keuls. Os dados que não passarem em nenhum dos testes anteriores serão analisados pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis com análise de médias. Os valores com $p < 0.05$ serão considerados estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Inicialmente, precisávamos avaliar se as células epiteliais alveolares do tipo II (AEC-II) de linhagem MLE-15 seriam susceptíveis à infecção por Mtb (**Figura 9 a**). Observamos que Mtb foi capaz de infectar essas células durante 4 horas de exposição (**Figura 09 b, c**), replicando-se no interior das mesmas após 24, 48 e 72 horas da infecção (**Figura 09 d**). Dessa forma, AEC-II foram permissivas à entrada do patógeno, além de incapazes de conter o crescimento do mesmo.

Figura 9. *Mycobacterium tuberculosis* é capaz de infectar e se replicar no interior de células epiteliais alveolares. Células MLE-15 foram distribuídas em placas de 24 poços (1×10^6 células/poço) e foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10) (**a**). Após 4 horas de contato com a micobactéria, foi avaliada por microscopia eletrônica a permissividade da célula à infecção por microscopia eletrônica (**b,c**). Nos tempos de 4, 24, 48 e 72 horas após a infecção foram avaliados, respectivamente, a capacidade de internalização e controle do crescimento do bacilo pela célula MLE-15 através da contagem de CFU (Unidades Formadoras de Colônias) (**d**). Os resultados (**d**) são representativos de 5 experimentos independentes ($n=4$ /grupo) e foram analisados através do teste one-way ANOVA com pós teste Newman-Keuls. Foram considerados significantes comparações com * $P < 0,05$.

Sabendo da capacidade de Mtb adentrar células epiteliais alveolares, nosso próximo questionamento foi se a infecção induziria a ativação e, conseqüentemente, a produção de moléculas pró-inflamatórias por essas células. Utilizando o delineamento descrito (**Figura 10 a**), observamos um aumento significativo da produção de IL-6, nitrito (NO_2^-), S100A9 e IFN- γ (**Figura 10 d-h**) por essas células, além de maior expressão gênica de TLR2 e TLR9 (**Figura 10 b-c**).

Figura 10. Células epiteliais alveolares são ativadas e produzem moléculas pró-inflamatórias mediante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Células MLE-15 foram distribuídas em placas de 24 poços (1×10^6 células/poço) e infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv (MOI10). 24 horas após a infecção, foi coletado o RNA para posterior avaliação da expressão gênica de TLR9 (**b**) TLR2 (**c**) por RT-PCR. 48 horas após a infecção, foram avaliadas a produção de moléculas pró-inflamatórias (**e-h**) por ELISA e nitrito (**d**) por ensaio de Griess. Os resultados foram analisados separadamente em cada tempo pelo teste t bicaudal para dados normais ou Mann-Whitney para os não normais ($n=3-4$) e foram considerados significantes aqueles com * $P < 0,05$.

Devido à grande permissividade à infecção, tornou-se necessário avaliar se o bacilo induziria a morte da célula (**Figura 11 a**). Como demonstrado na **Figura 11 b**, Mtb afetou consideravelmente a viabilidade celular em todos os tempos de infecção.

Figura 11. *Mycobacterium tuberculosis* é capaz de induzir a morte de células epiteliais alveolares. Células MLE-15 foram distribuídas em placas de 24 poços (1×10^6 células/poço) e foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10) (**a**). Nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção foi avaliada a morte celular através do ensaio colorimétrico de citotoxicidade MTT (n=5/grupo) (**b**), analisados através do teste t bi-caudal em cada tempo. Foram considerados significantes comparações com * P<0,05.

Tendo observado um perfil pró-inflamatório de células MLE-15 infectadas, em seguida, nos perguntamos que mecanismos estariam por trás dessa resposta. Por isso, avaliamos o fator de transcrição HIF-1 α . Já está descrito na literatura que, em células mieloides, o HIF-1 α tem um papel pró-inflamatório, induzindo um perfil de macrófagos M1 e a produção de NO e IL-1 β (NIZET; JOHNSON, 2009; TAKEDA et al., 2010). No contexto da Tb, a expressão de HIF-1 α via INF- γ em macrófagos infectados é importante para aumentar a expressão de iNOS e a capacidade de *killing* dessas células (BRAVERMAN et al., 2016). A ativação de HIF-1 α pode ocorrer não somente em condições de hipóxia, mas também de normóxia via TLR2 (SPIRIG et al., 2010). Dessa forma, nossa hipótese é que HIF-1 α estaria envolvido nessa atividade inflamatória das células MLE-15. Vimos que existe uma maior expressão gênica de HIF-1 α no início da infecção, que cai gradativamente com o passar do tempo (**Figura 12 b**). Essa regulação positiva pode ocorrer devido à sinalização via TLR2, cuja expressão gênica está aumentada nessas células após a infecção. Também foi observada uma maior expressão relativa de HIF-1 α

por *western blotting* 6 horas após a infecção, comparada às células não infectadas (**Figura 112 c-d**).

Curiosamente, apesar da maior expressão da proteína HIF-1 α , que é classicamente associada à reprogramação metabólica para a glicólise, não encontramos o aumento de lactato por essas células infectadas com Mtb (**Figura 12 f**). Da mesma forma, não houve alteração no consumo de glicose por AEC-II (**Figura 12 e**). Sabe-se que o lactato é o produto final da glicólise aeróbica. Logo, a não alteração na produção de lactato associada à glicose livre inalterada sugere que as AEC-II possuem uma adaptação metabólica após a infecção e não preferem a glicólise como fonte de energia.

Figura 12. Células epiteliais alveolares alteram a expressão de HIF-1 α após a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, porém não entram em glicólise aeróbica. Células MLE-15 foram distribuídas em placas de 24 poços (1×10^6 células/poço) e infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). Nos tempos de 4, 12, 24 e 48 horas (**b**) foi coletado o RNA para posterior avaliação da expressão gênica de HIF-1 α por RT-PCR. No tempo de 6 horas após a infecção, as células foram coletadas

para avaliação da expressão da proteína HIF-1 α por Western blotting **(c,d)**, utilizando o estabilizador de HIF-1 α , DMOG 200 μ M, (dimetiloxalilglicina) como controle positivo. A glicose livre e o lactato foram mensurados **(e,f)** utilizando o kit colorimérico da Sigma, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados separadamente em cada tempo pelo teste one-way ANOVA com pós teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

Esses dados nos fizeram acreditar que o HIF-1 α , que estava elevado no início da infecção, poderia ter um papel totalmente novo nessas células, uma vez que o mesmo não se correlacionou com a alteração metabólica para a glicólise anaeróbica classicamente descrita na literatura. Afim de avaliarmos o envolvimento de HIF-1 α na atividade inflamatória dessas células, utilizamos como ferramenta um estabilizador de HIF-1 α , DMOG (dimetiloxalilglicina), que bloqueia as PHDs (prolilhidroxilases), inibindo a degradação de HIF-1 α e, conseqüentemente, induzindo o seu acúmulo. Além deste, utilizamos um inibidor de HIF-1 α , que age induzindo o acúmulo de von Hippel-Lindau (VHL), que interage com o HIF-1 α hidroxilado para a degradação no proteassoma. Vimos através do teste de viabilidade celular (MTT) que o DMOG não é tóxico para as células, ao contrário do inibidor HIF-1 α , que induziu morte celular significativa **(Figura 13)**.

Figura 13. O inibidor de HIF-1 α é tóxico para células MLE-15 enquanto o DMOG não afeta a viabilidade celular independente da concentração. Células MLE-15 foram distribuídas em placas de 96 poços (2x10⁵ células/poço) e, em seguida, foram expostas ao inibidor de HIF-1 α ou ao estabilizador de HIF-1 α (DMOG) em diferentes concentrações durante 24 horas. Após esse período, foi realizado o ensaio colorimétrico do MTT para a avaliação da viabilidade celular. Os resultados foram analisados por one way ANOVA com pós teste Newman Keuls (n=3/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

As células MLE-15 infectadas tiveram então uma modulação de HIF-1 α utilizando as ferramentas citadas acima. Uma vez que HIF-1 α é um importante fator de

transcrição envolvido na reprogramação metabólica para a glicólise anaeróbica em macrófagos infectados por Mtb (SHI et al., 2015), decidimos avaliar indiretamente a função de HIF-1 α na glicólise anaeróbica em células MLE-15 infectadas, através da mensuração dos níveis de lactato, que é o produto final desse processo. Observamos que a modulação positiva de HIF-1 α , apesar de aumentar a captação de glicose (**Figura 14 b**), não altera a taxa de glicólise, uma vez que a produção de lactato, seu produto final, permaneceu inalterada (**Figura 14 c**), o que nos leva a sugerir que o HIF-1 α não participa da modulação positiva da glicólise aeróbica nessas células durante a infecção por Mtb.

Além disso, decidimos investigar a relação entre HIF-1 α e a produção de IL-6 e NO por AEC-II infectadas. Diferente do esperado, o HIF-1 α mostrou um papel anti-inflamatório nessas células, uma vez que a sua estabilização levou à redução da produção de óxido nítrico (NO) e IL-6, respectivamente (**Figura 14 d e 14 e**) em células epiteliais infectadas e tratadas com DMOG após a infecção. Esses dados sugerem que a medida que a expressão de HIF-1 α com o decorrer da infecção, como observado no PCR (**Figura 12 b**), a produção de moléculas inflamatórias como a IL-6 e o NO aumenta.

Figura 14. HIF-1 α não participa da modulação da glicólise em células MLE-15 infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* e está associado a um perfil anti-inflamatório de resposta. As células MLE-15 foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10) por 4 horas. O estabilizador de HIF-1 α (DMOG) foi adicionado após a infecção. 24 depois, a glicose livre (b) e a produção de lactato (c) foram mensurados pelo kit da Sigma Aldrich, seguindo as instruções do fabricante. A produção de IL-6 (e) e nitrito (d) foi avaliada por ELISA e reagente de Griess, respectivamente, 48 horas após a infecção. Os resultados foram analisados por one way ANOVA com pós teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

Em seguida, avaliamos a participação de HIF-1 α no controle do crescimento de Mtb. Mantivemos o inibidor de HIF-1 α e o DMOG após a infecção, a fim de não interferir no processo de fagocitose (Figura 15 a). Como demonstrado na Figura 15 b e c, a inibição ou acúmulo de HIF-1 α não interferem significativamente na capacidade de controle do crescimento de Mtb no interior de células epiteliais alveolares.

Figura 15. HIF-1 α não afeta o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* no interior de células epiteliais alveolares. Células MLE-15 foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). O inibidor de HIF-1 α (100 μ M) ou o seu estabilizador (DMOG-200 μ M) foram adicionados após a infecção (a). 24 (b) e 48 horas (c) depois, o crescimento do bacilo foi avaliado através da contagem de CFU (Colony Forming Units). Os resultados foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

Em resumo, até agora vimos que as AEC-II são permissivas à infecção por Mtb e tornam-se pró-inflamatórias. Além disso, vimos que HIF-1 α encontra-se aumentado no início da infecção, mas a sua função parece ser anti-inflamatória no contexto de células epiteliais infectadas por Mtb. Dessa forma, acreditamos que a expressão de HIF-1 α deve cair à medida que a infecção avança nessas células, e, de maneira inversamente proporcional, a produção de mediadores pró-inflamatórios aumenta, como vemos na Figura 10. Tendo como base essa resposta de mediadores inflamatórios produzidos por

AEC-II, hipotetizamos que essas células poderiam modular a função de células imunes presentes no espaço alveolar, como as células dendríticas (DCs).

Na asma já está definido o papel da célula epitelial alveolar sobre a função de DCs durante o desenvolvimento de uma resposta de perfil Th2 (HAMMAD et al., 2009; LAMBRECHT; HAMMAD, 2014a). Sabendo que a célula epitelial alveolar infectada é capaz de produzir uma série de moléculas pró-inflamatórias no decorrer da infecção por Mtb (LI; WANG; LIU, 2012), acreditamos que essas células serão responsáveis pela modulação do metabolismo e da função de DCs no contexto da tuberculose. Para confirmarmos essa hipótese, DCs derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 foram postas em co-cultura com células epiteliais alveolares previamente infectadas com Mtb (**Figura 16 a**). Após 48 horas de contato, observamos que a interação dessas células induziu aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 pelas DCs, que foram definidas como F4/80-/CD11c+/CD11b+/MHC-II+ (**Figura 16 b**), além de aumentar a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10 (**Figura 16 e, f, g**), caracterizando um perfil misto de resposta das DCs em contato direto com AEC-II infectadas.

Figura 16. Célula epitelial infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* modulam a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas por células dendríticas. 1×10^6 células MLE-15 foram plaqueadas e, em seguida, foram infectadas com Mtb H37Rv (MOI10). Após 4 horas, os poços foram lavados para retirada dos bacilos extracelulares. Foi adicionada gentamicina 200ng/ml durante 2 horas e, em seguida, $0,5 \times 10^6$ células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas foram adicionadas à co-cultura (a). Após 48 horas de contato, o sobrenadante da co-cultura foi coletado para avaliação de IL-6, IL-10 e IL-1 β (e-g) por ELISA e as células para análise da expressão de CD80 e CD86 (c,d) por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados por teste Mann-Whitney ($n=4$ /grupo) e foram considerados significantes aqueles com * $P < 0,05$. O tracejado representa a produção basal pelas células epiteliais (MLE-15) infectadas.

Em seguida, afim de avaliarmos se essa resposta obtida seria restrita ao contato direto entre AEC-II e DCs, avaliamos os mesmos parâmetros de forma indireta. Para isso, DCs foram expostas ao meio condicionado de células MLE-15 infectadas ou não por Mtb. Para eliminarmos a contribuição do patógeno, o meio condicionado foi previamente filtrado.

Podemos observar que as BMDCs tratadas com o meio condicionado da MLE-15 infectada (CM - IC) aumentaram significativamente a expressão gênica e a produção de

IL-10 (Figura 17 c, g), IL-6 (Figura 17 d, h), IL-1 β (Figura 17 b, f) e a expressão gênica de IL-12 (Figura 17 e) quando comparadas à produção pelas DCs expostas ao meio de células AEC-II não infectadas (CM - NIC), sugerindo que a resposta mista de citocinas por DCs não é dependente de contato com as AEC-II infectadas.

Figura 17. Produtos da célula epitelial infectada por *Mycobacterium tuberculosis* modulam a produção de citocinas por células dendríticas. Células MLE-15 foram infectadas com Mtb H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado, filtrado e adicionado às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas. Após 12 horas de contato com o meio condicionado (CM), as BMDCs foram coletadas para análise da expressão gênica de IL-1 β (b), IL-10 (c), IL-6 (d) e IL-12 (e). Após 24 horas de exposição ao sobrenadante das células epiteliais, o meio das BMDCs foi coletado para avaliação de IL-1 β (f), IL-10 (g) e IL-6 (h) por ELISA. Os resultados não representativos de pelo menos 3 experimentos independentes analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls ou teste Mann-Whitney (n=6-10/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05. (*) isolados indicam significância em relação ao grupo controle (-).

Dado que a migração de DCs para os linfonodos locais é crucial para a indução de uma resposta de células T eficaz, avaliamos em seguida como as células epiteliais influenciariam na capacidade de migração dessas células seguindo o protocolo descrito (**Figura 18 a**). Logo, mantivemos o mesmo protocolo de modulação indireta de DCs através de CM-NIC ou CM-IC e observamos por citometria de fluxo a expressão de receptores de quimiocinas, como o CCR7, que se liga ao CCL19 e CCL21, facilitando a migração dessas células para os linfonodos. Observamos que houve maior expressão de CCR7 pelas DCs em contato com CM-IC comparadas às DCs em contato com CM - NIC (**Figura 18 b-d**). Além disso, houve uma migração significativa dessas células após 2 horas em contato com a quimiocina CCL19 (**Figura 18 e**).

Figura 18. Produtos da célula epitelial infectada por *Mycobacterium tuberculosis* modulam a expressão de CCR7 e a migração de células dendríticas. Células MLE-15 foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado, filtrado e adicionado às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas. Após 24 horas de exposição ao sobrenadante das células epiteliais, BMDCs foram coletadas para

avaliação de CCR7 por citometria de fluxo, ou foram adicionadas durante duas horas à câmara de boyden para ensaio de quimiotaxia utilizando ou não (-) a quimiocina CCL19 200ng/ml **(d)**. Os resultados **(a-c)** consistem em 2 experimentos independentes. Todos foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

Além da produção de citocinas e expressão de CCR7, avaliamos se o meio condicionado da célula epitelial infectada (CM - IC) ou não (CM - NIC) seria suficiente para a modulação da expressão de MHC-II e moléculas co-estimuladoras de acordo com o delineamento experimental descrito **(Figura 19 a)**. Como esperado, o CM-IC foi capaz de induzir o aumento da frequência de MHC-II **(Figura 19 b)** e moléculas co-estimuladoras **(Figura 19 b-c)** comparado ao CM - NIC. Tendo observado que as DCs se tornaram mais ativadas quando em contato com o CM - IC, a pergunta seguinte seria se essas células estariam mais aptas a ativarem e induzirem a proliferação de células T CD4+ naive. Logo, a nossa hipótese seria de que as células dendríticas mais ativadas via interação indireta com os produtos das células epiteliais infectadas, iriam migrar para os linfonodos locais, induzindo a ativação e proliferação de células T. Para responder essa pergunta, plaqueamos as DCs derivadas da medula óssea de camundongos C57Bl/6 juntamente com o CM - NIC ou CM - IC para mimetizar o contato prévio das duas células e modulação pós infecção. Após 24 horas de contato, adicionamos anti-CD3 para simular o primeiro sinal e adicionamos logo em seguida as células TCD4+ CD62L+, aqui descritas como T CD4+ naive **(Figura 19 h)**. Vimos então que as DCs estimuladas com CM – IC se tornaram mais eficazes na ativação e proliferação de células T CD4+ naive **(Figura 19 i-j)**.

Figura 19. Produtos da célula epitelial infectada por *Mycobacterium tuberculosis* modulam a expressão de moléculas co-estimuladoras por células dendríticas, facilitando a expansão de células TCD4+. Células MLE-15 foram infectadas ou não com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado, filtrado e adicionado às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas (a). Após 24 horas de exposição ao sobrenadante das

células epiteliais, BMDCs foram coletadas para análise de MHC-II, CD80 e CD86 por citometria de fluxo **(b-g)**. BMDCs foram plaqueadas em placa de 96 poços ($0,5 \times 10^5$ DCs/poço) estimuladas com meio condicionado de células epiteliais infectadas (IC) ou não (NIC) por 24 horas. Em seguida, foram adicionadas células T CD4⁺ CD62L⁺ (1×10^5 células/poço), consideradas como T CD4⁺ naive, e anti-CD3 (1 µg/ml) à cultura de DCs na proporção de 1:2. Após 4 dias de co-cultura, as células T CD4⁺ naive foram avaliadas quanto a sua proliferação através do marcador Ki67 **(i,j)**. Os resultados são representativos de pelo menos 2 experimentos e foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=3/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05. (*) isolados indicam significância em relação ao grupo controle (-).

Uma vez que as células epiteliais parecem capazes de induzir a ativação de DCs e essas células induzem a ativação de células T CD4⁺ naive, nos perguntamos se as DCs levariam a que perfil de células T CD4⁺ já que as mesmas produzem um perfil misto de citocinas. Sabendo da importância do IFN γ no controle da replicação de Mtb (COOPER et al., 1993a), e que as DCs mostraram maior expressão gênica de IL-12, avaliamos a frequência de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ após contato em co-cultura com DCs tratadas com CM - IC ou CM - NIC **(Figura 20 a)**. Curiosamente, observamos que tanto as DCs previamente expostas ao CM - IC ou CM - NIC apresentaram uma inibição da indução de um perfil de células CD4⁺IFN γ ⁺ **(Figura 20 b-c)**, sugerindo que as células epiteliais atuam no desfavorecimento de uma resposta Th1.

Figura 20. As células epiteliais alveolares modulam a função de DCs, inibindo o perfil de resposta Th1. Os ensaios foram realizados seguindo o delineamento acima **(a)**. DCs foram plaqueadas em placa de 96 poços ($0,5 \times 10^5$ DCs/poço) e estimuladas com meio condicionado de células epiteliais infectadas (CM-IC) ou não (CM-NIC) durante 24 horas. Em seguida, foram adicionadas células T CD4+ CD62L+ (1×10^5 células/poço), consideradas como T naive, e anti-CD3 ($1 \mu\text{g/ml}$) à cultura de DCs na proporção de 1:2. Após 4 dias de co-cultura as células T CD4+ naive foram avaliadas quanto a produção de IFN- γ por citometria de fluxo **(b,c)**. Os resultados são representativos de pelo menos 2 experimentos e foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls ($n=3/\text{grupo}$) e foram considerados significantes aqueles com * $P < 0,05$.

Apesar dos resultados interessantes obtidos, nos questionamos se esses dados poderiam ser associados aos produtos da bactéria e não aos produtos da célula epitelial. Para isso, durante a infecção das células epiteliais, plaqueamos também a micobactéria sozinha como um controle do que é produzido pela mesma. Em seguida, filtramos esse meio e adicionamos sobre BMDCs. Em seguida, avaliamos a expressão de MHC-II, CD86, CCR7 e iNOS por citometria de fluxo. Observamos que os produtos de Mtb foram capazes de reduzir significativamente a expressão de MHC-II, CD86 e CCR7 (**Figura 21 b-d**), não interferindo significativamente na expressão de iNOS (**Figura 21 e**). Com isso, concluímos que a resposta que encontramos é realmente de produtos da célula epitelial e não aqueles secretados pela micobactéria.

Figura 21. Produtos da bactéria modulam negativamente a expressão de MHC-II, CD86, CCR7 e iNOS por células dendríticas. Células MLE-15 foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado, filtrado e adicionado às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas. Após 24 horas de exposição ao sobrenadante das células epiteliais, BMDCs foram coletadas para avaliação de CCR7 por citometria de fluxo, ou foram adicionadas a câmara de boyden para ensaio de quimiotaxia utilizando a quimiocina CCL19 200ng/ml. Os resultados (**a-c**) consistem em 2 experimentos independentes. Todos foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

Uma vez que as BMDCs estimuladas com CM de células epiteliais independente da infecção reduziram a polarização de células CD4⁺ IFN γ ⁺, decidimos investigar a indução de outros perfis, como de células CD4⁺ IL17⁺, já que encontramos uma grande produção de IL-6 por BMDCs estimuladas com CM – IC. Além disso, acreditamos que essas células poderiam ajudar na manutenção de um perfil Th17 no local da infecção.

Para provar essa hipótese, utilizamos um meio condicionado de BMDCs após 24 horas de exposição ao CM - NIC ou CM – IC. Vimos que houve uma maior produção de IL-17 por células Th17 em contato com BMDCs previamente estimuladas com CM - NIC ou CM – IC (**Figura 22 b, c**).

Figura 22. As células epiteliais alveolares modulam a função de DCs, favorecendo a manutenção de células CD4+ IL-17+. DCs foram plaqueadas em placa de 24 poços (1×10^6 DCs/poço) e estimuladas com meio condicionado de células epiteliais infectadas (CM-IC) ou não (CM-NIC) durante 24 horas. Em seguida, o meio condicionada (CM) foi coletado e usado para estimular células Th17. Para obtenção de células Th17, células T CD4+ CD62L+ (1×10^5 células/poço), consideradas como T naive, foram plaqueadas juntamente com anti-CD3 (1µg/ml), anti-CD28 (1µg/ml), IL-6, IL-23, IL-1β, anti-IFNγ, anti-IL-4 e anti-IL-2. No 3º dia, quando já consideradas Th17, as células foram estimuladas com CM das DCs (**a**). Após 2 dias de incubação, as células Th17 foram avaliadas quanto a produção de IL-17 por citometria de fluxo (**b, c**).

Os resultados são representativos 2 experimentos e foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=3/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * $P < 0,05$.

Até o momento vimos que, uma vez infectadas, as células epiteliais alveolares modulam a função de DCs, tornando-as mais ativadas, aumentando a sua capacidade de migração e tornando-as potentes ativadoras de células T, além de facilitarem a manutenção de um perfil Th17. Por isso, nos questionamos a partir de então sobre que possíveis mecanismos que estariam envolvidos nessa resposta.

Decidimos investigar qual seria o papel do metabolismo celular e de HIF-1 α para a obtenção desse fenótipo. Para isso, seguimos com o mesmo protocolo de estímulo indireto de BMDCs com os meios condicionados CM - NIC e CM - IC. Evidenciamos que as BMDCs estimuladas com CM - IC apresentaram um aumento do transportador de glicose GLUT1 (**Figura 23 b**) e da enzima da via glicolítica hexoquinase 2 (HK2) (**Figura 23 c**) comparadas às BMDCs estimuladas com CM- NIC. Entretanto, não observamos diferença na expressão gênica de PKM2 entre os grupos (**Figura 23 d**). Sabendo que o aumento da via glicolítica culmina com a estabilização do fator de transcrição HIF-1 α . Avaliamos a sua expressão gênica e proteica e vimos que, existe um aumento precoce significativo de ambas em 12 horas após o estímulo, sem, no entanto, haver aumento tardiamente, 24 horas depois da exposição ao CM (**Figura 23 e,f**). Logo, os dados sugerem que existe um aumento sutil da glicólise e de HIF-1 α precocemente, que não se mantém por longos períodos. Para corroborar com esses resultados, avaliamos um gene alvo de HIF-1 α , a enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e seu produto, NO. Observamos que o CM-IC não foi capaz de alterar a expressão de iNOS (**Figura 23 g,h**) todo NO mensurado correspondeu ao produzido pela célula MLE-15 infectada (**Figura 23 i**), como observado na linha tracejada.

Figura 23. Produtos da célula epitelial infectada por *Mycobacterium tuberculosis* modulam o metabolismo e a expressão de HIF-1α por células dendríticas. Células MLE-15 foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado, filtrado e adicionado às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas (a). Após 6, 12 e 24 horas de exposição ao sobrenadante das células epiteliais, BMDCs foram coletadas para avaliação da expressão gênica de hexoquinase 2 (HK2) (b), transportador de glicose 1 (GLUT1) (c), Isoenzimas piruvato quinase M1 / M2 (PKM2) (d), e HIF-1α (e). Além disso, a expressão proteica de HIF-1α também foi avaliada nos tempos de 12 e 24 horas por western blotting (f) e seu gene-alvo iNOS, assim como NO₂⁻ foram mensurados também em 24 horas por citometria de fluxo e ensaio de Griess, respectivamente. Os resultados foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls. (n=3-4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

A resposta da glicólise e de HIF-1 α , que aumenta e reduz com o tempo, nos fez acreditar que possivelmente esse fator de transcrição poderia estar envolvido de alguma forma na resposta obtida de MHC-II, CD80, CD86 e CCR7. Para avaliar o papel de HIF-1 α na modulação dessas moléculas, utilizamos o seu estabilizador, DMOG, afim de manter a expressão de HIF-1 α elevada. Observamos que as BMDCs tratadas com CM-IC e DMOG em conjunto perdem significativamente a capacidade de expressão de CD80 (**Figura 24 a, b**), CD86 (**Figura 24 b, c**), MHC-II (**Figura 24 d, e**) e CCR7 (**Figura 24 f, g**), quando comparadas aquelas estimuladas somente com CM – IC. Como esperado, a estabilização com DMOG nas DCs estimuladas com CM-IC foi capaz de restaurar a frequência e MFI de iNOS (**Figura 24 h, i**).

Figura 24. HIF-1 α regula negativamente a expressão de moléculas co-estimuladoras por BMDCs. Células MLE-15 foram infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o meio condicionado (CM) foi coletado de células infectadas (CM – IC) foi filtrado e assim como o meio das células não infectadas (CM – NIC) adicionado com ou sem DMOG 200 μ M às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas. Após 24 horas de exposição, BMDCs foram coletadas para avaliação de CD80 (b,c), CD86 (d,e), MHC-II (f,g), CCR7 (h,i) e iNOS (j,l) por citometria de fluxo. Os gráficos de histogramas (m) são representativos de cada grupo. MFI (Mean fluorescence intensity). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05.

Para investigar se a modulação de HIF-1 α em BMDCs via produtos da célula epitelial infectada estaria envolvida no perfil de citocinas produzido, adicionamos o DMOG juntamente com meio condicionado da célula epitelial infectada com o objetivo de estabilizar HIF-1 α e reverter o fenótipo encontrado anteriormente. Como esperado, BMDCs tratadas com DMOG e CM - IC produziram uma quantidade significativamente maior de IL-6 (Figura 25 c), além de mais IL-1 β , embora não de forma significativa (Figura 25 b), comparadas às BMDCs estimuladas com CM - NIC. Do mesmo modo, a produção de NO mostrou-se dependente de HIF-1 α . Já a produção de IL-10 não foi dependente de HIF-1 α (Figura 25 d).

Figura 25. HIF-1 α contribui parcialmente para a produção de IL-6 por BMDCs moduladas por células epiteliais infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Células MLE-15 foram infectadas ou não com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado, filtrado e adicionado às células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas com ou sem DMOG (a, b, c). Após 24 horas de exposição ao sobrenadante das células epiteliais, o meio das BMDCs foi coletado para avaliação de IL-1 β (b), IL-6 (c), IL-10 (d) por ELISA e NO₂ (e) por ensaio de Griess. Os resultados são representativos de 3 experimentos repetidos analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significativos aqueles com * P < 0,05.

Até agora encontramos que as BMDCs quando em contato com meio condicionado de AEC-II infectadas mostraram um acúmulo de HIF-1 α inicialmente, que foi degradado 24 horas após o estímulo. Além disso, houve aumento precoce das enzimas da glicólise, que devem ter sido responsáveis pela estabilização de HIF-1 α no tempo de 12 horas. Além disso, vimos que há uma maior expressão de MHC-II, moléculas co-estimuladoras e CCR7 por DCs tratadas com CM - IC, que foi inversamente dependente de HIF-1 α . Não sabemos ainda de que forma HIF-1 α pode modular negativamente essas moléculas, mas hipotetizamos que isso pode ocorrer via enzima iNOS. iNOS seria então responsável por bloquear a função mitocondrial e a fosforilação oxidativa (OXPHOS), tornando a célula totalmente dependente de glicólise aeróbica. Portanto, as DCs estimuladas com CM - IC, que não tiveram aumento de HIF-1 α constante, também não tiveram aumento de iNOS. Isso permitiria que a célula continuasse com as duas vias energéticas, tanto a glicólise como a OXPHOS.

Os resultados vistos até o momento consistem na modulação de BMDCs não infectadas. Entretanto, sabemos que Mtb possui fatores de virulência capazes de modificar o fenótipo de células infectadas (ROBERTS; ROBINSON, 2014). Por isso, nos perguntamos se as células epiteliais alveolares ainda seriam capazes de exercer uma função importante em BMDCs infectadas com Mtb. Para responder esse questionamento,

infectamos BMDCs com Mtb (MOI2) e, 4 horas após a infecção, adicionamos CM-NIC ou CM-IC durante 24 horas (**Figura 26 a**). Observamos BMDCs infectadas e estimuladas com CM – IC não aumentaram significativamente a sua frequência e MFI de MHC-II. No entanto, o CM - IC foi capaz de manter níveis de MHC-II semelhantes ao controle negativo de BMDCs não estimuladas (-), enquanto que a infecção sozinha reduziu a expressão e o MFI de MHC-II e o CM - NIC não conseguiu modular essa resposta (**Figura 26 b,c**).

Com relação à expressão de CCR7, vimos que no contexto de infecção, o CM – IC não consegue se sobrepor aos efeitos da micobactéria que sozinha consegue reduzir consideravelmente a frequência de CCR7. O CM de células epiteliais também não conseguiu modular o MFI de BMDCs infectadas (**Figura 26 d, e**). Do mesmo modo, o CM - IC não foi capaz de aumentar a frequência nem o MFI de BMDCs infectadas (**Figura 26 f, g**), agindo em sinergismo com a própria micobactéria. Com relação ao iNOS, o CM-IC também não consegue regular a frequência nem o MFI, embora este esteja reduzido, ainda se encontra significativamente maior que o controle (-). O CM de células epiteliais não afetou a produção de IL-1 β ou IL-6 por DCs infectadas (**Figura 26 j, l**). Curiosamente, as células epiteliais independentemente da infecção foram capazes de reduzir a produção de TNF por DCs infectadas (**Figura 26 n**). Além disso, as AEC-II não infectadas induziram aumento de IL-10 por DCs infectadas (**Figura 26 m**).

Figura 26. *Mycobacterium tuberculosis* consegue se sobrepor aos efeitos das células epiteliais sobre a função de células dendríticas. Células MLE-15 foram infectadas ou não com *M. tuberculosis* H37Rv (MOI10). Após 48 horas, o meio condicionado (CM) de células infectadas (CM – IC) ou não (CM – NIC) foi coletado e filtrado. Células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 fêmeas foram infectadas com H37Rv (MOI2) e, em seguida estimuladas ou não com CM – IC ou CM – NIC. Após 24 horas de exposição, BMDCs foram coletadas para avaliação de MHC- II (**b, c**), CCR7 (**d, e**), CD86 (**f, g**) e iNOS (**h, i**) por citometria de fluxo. Os resultados representam a média da frequência de células CD11b+ que expressam MHC-II, CCR7, CD86 e iNOS ou o MFI (Mean Fluorescency Intensity) de cada molécula em CD11b+ DCs. Os resultados foram analisados por one way ANOVA com pós-teste Newman Keuls (n=4/grupo) e foram considerados significantes aqueles com * P < 0,05. * isolados indicam comparativo em relação ao controle negativo (-).

A **Figura 27** representa o resumo dos resultados até o momento.

Figura 27. Resumo dos resultados. Células epiteliais alveolares do tipo II são permissivas à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e produzem moléculas pró-inflamatórias que são capazes de modular positivamente a maturação e migração de células dendríticas não infectadas, induzindo maior ativação de células T CD4+naive. Além disso, a modulação positiva de DCs facilitou a manutenção de células Th17 no local da infecção **(a)**. Esse fenótipo parece ser dependente do pico glicolítico inicial, mas também do balanço energético posterior entre glicólise, ciclo do ácido cítrico (TCA) e OXPHOS. Por outro lado, a

estabilização HIF-1 α por maior tempo prejudica o fenótipo encontrado, provavelmente por causar disfunção mitocondrial e tornar a glicólise a única fonte energética utilizada **(b)**. No entanto, uma vez que as DCs estão infectadas, o bacilo de *Mycobacterim tuberculosis* consegue subverter a modulação positiva de células epiteliais **(c)**.

5 DISCUSSÃO

Existem poucos trabalhos que avaliam a função de AEC-II durante a infecção por Mtb. Alguns caracterizaram a produção de peptídeos antimicrobianos produzidos (RIVAS-SANTIAGO et al., 2006, 2008a), além de IFN- γ (SHARMA et al., 2007) e outras citocinas secretadas por essas células mediante à infecção(LI; WANG; LIU, 2012). No entanto, um único trabalho recente evidenciou que células epiteliais brônquicas são inertes à infecção direta por Mtb e somente são ativadas e produzem moléculas pró-inflamatórias, como as da família S100A9, e peptídeos antimicrobianos quando estimuladas por macrófagos infectados através da produção de citocinas como IL-1 β (REUSCHL et al., 2017). Outros também investigaram o efeito de macrófagos infectados com Mtb sobre células epiteliais alveolares, observando a indução na expressão de HIF-1 α e da metaloproteinase MMP1 nestas células(BELTON et al., 2016). Nosso trabalho vem com uma abordagem diferente das demais, no qual investigamos como a infecção sozinha afeta a resposta de AEC-II e, por conseguinte, como estas poderiam modular a resposta de DCs no ambiente pulmonar.

Para nossa surpresa, a expressão aumentada de HIF-1 α em AEC-II parece estar associada a uma resposta predominantemente anti-inflamatória, com redução de IL-6 e NO, permitindo o crescimento de *M. tuberculosis* no interior das mesmas. Acreditamos que, no início da infecção, o aumento de HIF-1 α ocorre devido à sinalização via TLR2, uma importante forma de ativação de HIF-1 α em condições de normóxia(SPIRIG et al., 2010). No entanto, a proteína HIF-1 α deve ser rapidamente hidroxilada e degradada, permitindo que as AEC-II infectadas permaneçam produzindo níveis elevados de IL-6 e NO.

Diversos estudos já demonstraram que células epiteliais alveolares são capazes de produzir NO e citocinas como IL-1 β , TNF, IL-6 e IFN- γ (ROY et al., 2004; SHARMA et al., 2007; LI; WANG; LIU, 2012; SCORDO; KNOELL; TORRELLES, 2016, 2017) além de produzirem peptídeos antimicrobianos como β -defensinas e catelicidinas(RIVAS-SANTIAGO et al., 2005, 2006, 2008b) mediante a infecção por *M. tuberculosis*. Além de citocinas, quimiocinas como KC, CCL5(SEQUEIRA; SENARATNE; RILEY, 2014) e CXCL5 são secretadas por AEC-II infectadas, sendo esta última

importante para recrutamento de neutrófilos e associada a um perfil deletério na tuberculose (NOUAILLES et al., 2014). No entanto, nenhum estudo no âmbito de tuberculose associou HIF-1 α como regulador negativo da produção dessas moléculas pró-inflamatórias. Alguns pesquisadores demonstraram uma associação positiva de HIF-1 α com a produção de β - defensinas por células epiteliais pulmonares, mostrando o papel protetor de desse fator de transcrição em infecções (KELLY et al., 2013). No contexto de Tb crônica, a destruição pulmonar causada por metaloproteinases, como a MMP1, é dependente de HIF-1 α (BELTON et al., 2016). Todavia, esses trabalhos evidenciaram o papel de HIF-1 α como participante na inflamação e destruição do tecido pulmonar em condições tardias da doença e, em um contexto de hipóxia. Já o nosso trabalho focou no estudo o papel de HIF-1 α em condições de normóxia e no início da infecção.

Já foi demonstrado recentemente que em condições de normóxia existe o acúmulo de HIF-1 α em AEC-II em contato com meio condicionado de macrófagos infectados por Mtb (BELTON et al., 2016). Pesquisadores têm relatado a importância de HIF-1 α para uma resposta inflamatória em células mielóides como macrófagos e DCs (NIZET; JOHNSON, 2009; TAKEDA et al., 2010). No contexto da tuberculose, HIF-1 α está associado a um perfil de macrófagos M1, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, além da produção de NO (BRAVERMAN et al., 2016). Além disso, a sinalização via IFN- γ potencializa a expressão de HIF-1 α , aumentando a capacidade de *killing* de macrófagos infectados (BRAVERMAN et al., 2016).

Todavia, no contexto de célula epitelial, como em células epiteliais intestinais e renais, existe uma relação de HIF-1 α com uma resposta mais anti-inflamatória, através da redução de mieloperoxidase (MPO) e citocinas como IL-6 e KC, que reduzem a inflamação no local, conferindo uma ação protetora de HIF-1 α em doenças como colite e lesão renal aguda (PACKARD et al., 2014). Na colite, HIF-1 α está associado à proteção da barreira epitelial, redução de citocinas e aumento de peptídeos antimicrobianos, como a β defensina (SHAH, 2016). No dano renal agudo, está descrito o papel de HIF-1 α na redução da produção de ROS, e consequente, redução do dano, demonstrando uma função mais anti-inflamatória de HIF-1 α nessa situação.(AHN et al., 2012) Devido à modulação negativa de IL-6 e NO por HIF-1 α nessas células, sugerimos que a sua função seja primariamente anti-inflamatória nesse contexto.

Além de estudarmos a resposta de AEC-II à infecção, investigamos também a capacidade dessas células na modulação de outras células do sistema imune, especialmente DCs. O relacionamento entre AEC-II e DCs já está bem descrito na asma, onde as AEC-II conseguem atuar sobre DCs induzindo um perfil Th2 de resposta (LAMBRECHT; HAMMAD, 2014b). No entanto, não existe nenhum trabalho que tenha estudado a interação de AEC-II e DCs na tuberculose. Escolhemos investigar as DCs principalmente devido a sua importância como células apresentadoras de antígeno (APCs) responsáveis por interligar a imunidade inata e a adaptativa, e também porque estas células encontram-se na lâmina própria, próximas às AEC-II (PALUCKA; BANCHEREAU, 1999; STEINMAN; HEMMI, 2006; KIM; LEE, 2014)

Nos pulmões existem quatro subpopulações de DCs: DCs plasmocitoides (pDCs), DCs derivadas de monócitos (moDCs), e dois tipos de DCs denominadas DCs convencionais (cDCs), que são as CD11b+ cDCs e as CD103+ cDCs (DESCH; HENSON; JAKUBZICK, 2013). Embora, tanto a CD11b+cDCs como a CD103+cDCs sejam capazes de migrar para os linfonodos, as CD11b+ cDCs têm sido caracterizadas como a principal subpopulação de DCs responsável pelo *priming* de células Th1. Em contrapartida, foi demonstrado que a CD103+ regula a função da CD11b+ de induzir a polarização de células Th1 através da secreção de IL-10 (LAI et al., 2018).

Sabendo da importância da resposta Th1 no controle da infecção por *M. tuberculosis* (FLYNN et al., 1993) e que as CD11b+ cDCs também são as maiores produtoras de quimiocinas pró-inflamatórias como MCP-1, MIP-1 α , RANTES e MCP5, atraindo células inflamatórias e linfócitos T efetores para os pulmões (BEATY; ROSE; SUNG, 2007), decidimos avaliar a modulação de CD11b+ cDC por AEC-II, utilizando DCs derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 cuja diferenciação via GM-CSF gera somente a subpopulação CD11b+cDC.

A maturação das DCs é determinada pela expressão de MHC-II, bem como moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86, e receptores de quimiocinas, como CCR7, que é essencial para a migração para os linfonodos mediastinais que drenam o pulmão. Os mecanismos de virulência de *Mtb* são capazes não apenas de prevenir a maturação e a migração da DC, mas também podem inibir a apresentação de antígenos através do MHC-II, sem influenciar na sua expressão (WOLF et al., 2007). Um estudo evidenciou que

a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 estava significativamente aumentada em DCs presentes nos linfonodos apenas aos 21 dias após a infecção (GARCIA-ROMO et al., 2004). Isso mostra que o bacilo consegue subverter a função de DCs para favorecimento próprio. No entanto, apesar de haverem estudos abordando a capacidade da micobactéria em modular a resposta de DCs, não se sabe se outras células do microambiente, como as AEC-II podem influenciar nesse processo.

Demonstramos que as AEC-II infectadas secretaram produtos que tornaram as DCs mais ativadas, com maior expressão de MHC-II, CD80 e CD86, além de induzirem a produção de diversas citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10. Sabe-se que encontro do antígeno de via MHC-II com o TCR de células TCD4+ (1º sinal), juntamente com as moléculas co-estimuladoras (2º sinal) e as citocinas secretadas (3º sinal) contribuem para a ativação e proliferação de células T CD4+ nos linfonodos locais (NUSSENZWEIG et al., 1980; GRAKOUÏ et al., 1999). No entanto, para que isso ocorra, as DCs precisam migrar para a zona de células T nos órgãos linfoides secundários. Essa migração é dependente da interação de CCR7 com as quimiocinas CCL19 e CCL21 (FÖRSTER et al., 1999).

É sabido que na imunopatogênese da Tb existe um grande dilema com relação ao atraso da migração de DCs para os linfonodos (ROBERTS; ROBINSON, 2014), contribuindo para um retardo da resposta imune adaptativa e, conseqüentemente, facilitando a replicação desenfreada do bacilo (LAI et al., 2018). Os mecanismos que permitem esse atraso da migração das DCs ainda permanecem não esclarecidos. A maioria dos estudos associam esse problema à mecanismos de virulência da própria bactéria, que, quando no interior das DCs, levam a uma menor expressão de integrinas e do receptor de quimiocina CCR7, importantes para a adesão e migração (KHADER et al., 2006; ROBERTS; ROBINSON, 2014). No entanto, até o momento, não se tinha investigado se as células presentes no espaço alveolar atuam sobre a migração de DCs durante a infecção por Mtb. No presente trabalho, encontramos que as AEC-II, quando infectadas, colaboram para o aumento da expressão de CCR7 e, conseqüentemente, para que as DCs migrem mais rapidamente para os linfonodos e possam induzir uma resposta de células T, demonstrando um papel benéfico dessas células sobre a migração de DCs.

Logo, sabendo que as DCs passaram a expressar mais MHC-II, CD80 e CD86 e seriam capazes de migrar via expressão aumentada de CCR7, fizemos uma co-cultura dessas DCs com células T CD4+ naive e observamos que houve uma maior ativação e proliferação destas células. Portanto, em geral, as células epiteliais contribuíram positivamente para a resposta de células dendríticas não infectadas na tuberculose.

Como previamente citado, a interação de células epiteliais alveolares e DCs está bem descrita na asma (HAMMAD; LAMBRECHT, 2008). Nesse contexto, as células epiteliais alveolares respondem aos estímulos dos alérgenos através de PRRs como dectina-1 e TLRs, levando a produção de TSLP, GM-CSF, IL-33 e IL-25, que agem sobre DCs, tornando-as eficazes na polarização de células Th2 (LAMBRECHT; HAMMAD, 2014a). Entretanto, não se sabe a interação de células epiteliais e DCs durante a infecção por Mtb poderia influenciar na resposta de células T.

As DCs estimuladas por produtos das AEC-II infectadas aumentaram a expressão gênica de IL-12 de forma significativamente elevada. Já é bem descrito que a IL-12 é um elemento chave na imunidade protetora na Tb (COOPER et al., 1995). Além de ser importante para a expressão de CCR7 e migração de DCs para os linfonodos (KHADER et al., 2006), a IL-12 pode ativar células NK e direcionar células T CD4+ para um perfil Th1. O IFN γ produzido via NK ou célula T é essencial na proteção contra a infecção (COOPER et al., 1993b), atuando sobre a ativação de macrófagos infectados, aumentando a fagocitose, a fusão do fagolisossomo e o *burst* oxidativo (ERRANTE; FRAZÃO; CONDINO-NETO, 2008). Dada a importância da IL-12 e do IFN γ no controle da infecção por Mtb, avaliamos se as AEC-II favoreceriam a indução de células T CD4+IFN γ +. Curiosamente, tanto as células epiteliais infectadas como as não infectadas reduziram a polarização de células T CD4+IFN γ + por DCs, fato que ainda não conseguimos explicar.

Na Tb, é importante que exista um balanço da resposta de células Th1 e Th17 para o controle da replicação do bacilo. Mediante a infecção por Mtb, tanto as células T CD4+IFN+ como as T CD4+ IL17+ são induzidas nos linfonodos drenantes, que migram para o local onde exercem sua função e contribuem para a organização do granuloma (TORRADO; COOPER, 2010). Vários estudos sugerem que células T produtoras de IL-17 são geradas após a vacinação com BCG e ajudam na manutenção

do perfil Th1 através da regulação negativa de IL-10 e positiva de IL-12, além de estarem envolvidas com a resposta de memória após o desafio com Mtb (UMEMURA et al., 2007). Todavia, o papel dessas células na infecção primária ainda é controverso. Alguns associam células Th17 à proteção na Tb (GALLEGOS et al., 2011; GOPAL et al., 2014), enquanto outros relatam que essas células têm uma função na progressão da doença (BASILE et al., 2011). É possível que as células TCD4+ produtoras de IL-17 tenham papéis distintos em estágios subsequentes da infecção por Mtb, promovendo a proteção no início da infecção enquanto pode ser deletéria na doença avançada (LYADOVA; PANTELEEV, 2015).

As DCs expostas aos produtos das AEC-II infectadas produziram altas quantidades de IL-6, quando comparada a outras citocinas secretadas, e também produziram IL-1 β . Portanto, nos perguntamos se essas células favoreceriam a manutenção do perfil Th17 de resposta durante a infecção pro Mtb. Como esperado, houve uma maior produção de IL-17 por células Th17 em contato com DCs estimuladas por AEC-II infectadas, demonstrando mais uma função indireta de células epiteliais sobre a resposta de células T no local da infecção.

Curiosamente, foi demonstrado que a IL-17 é uma potente citocina estimuladora de β -defensinas por células epiteliais do trato respiratório (KAO et al., 2004). Isso nos leva a crer que possa também haver um *crosstalk* entre células epiteliais e células T CD4+ produtoras de IL-17 que migraram para local da infecção, onde estas podem atuar no aumento de peptídeos antimicrobianos e, conseqüentemente, para menor carga bacilar e proteção.

Em busca dos mecanismos por trás da resposta de maior ativação de DCs por células epiteliais alveolares infectadas, decidimos avaliar se o metabolismo dessas células poderia estar envolvido na alteração de função das DCs, já que, uma vez ativadas, essas células modificam o seu metabolismo de OXPHOS para glicólise (KRAWCZYK et al., 2010). Ademais, um estudo atual demonstrou que a respostas imunes diferentes de macrófagos alveolares e intersticiais na Tb está associado ao metabolismo distinto de cada um deles (HUANG et al.,). Portanto, acreditamos que, da mesma forma que em macrófagos alveolares, cuja função é associada ao seu

metabolismo, o mesmo pode ocorrer em DCs residentes devido à modulação do ambiente pulmonar via AEC-II infectadas.

Como esperado, encontramos um aumento precoce de proteínas que participam da via glicolítica como GLUT1 e HK2. Devido a alteração dessas enzimas, em seguida, avaliamos o HIF-1 α , que também se mostrou elevado inicialmente. Já está bem estabelecido na literatura o envolvimento de HIF-1 α na reprogramação metabólica de células para a glicólise anaeróbica mesmo em condições normais de oxigênio, fenômeno conhecido como Efeito Warburg (KIM et al., 2006; COURTNEY et al., 2015). Esse fenômeno foi primariamente descoberto em células cancerosas, que possuíam aumento de HIF-1 α , assim como de todas as enzimas glicolíticas (LU; FORBES; VERMA, 2002). Nenhum grupo de pesquisa investigou ainda o papel de HIF-1 α e do metabolismo glicolítico na função de DCs durante a infecção por Mtb.

Em geral, o HIF-1 α está associado a uma resposta pró-inflamatória em células imunes durante a infecção por Mtb. Foi demonstrado que em animais C57BL/6 infectados com Mtb, as células imunes utilizam principalmente a glicólise aeróbica ou efeito *Warburg* como fonte energética (SHI et al., 2015). Além disso, outro trabalho evidenciou em modelo de *Zebra fish* que o HIF-1 α seria importante para a resistência à infecção por *M. marinum* através da regulação positiva de iNOS (ELKS et al., 2013). Reforçando a função protetora de HIF-1 α , estudos de Braverman e colaboradores têm descrito que esse fator de transcrição é importante para a ativação de macrófagos infectados via sinalização de IFN γ , através da regulação de citocinas pró- inflamatórias (IL-1 β e IL-6), iNOS e eicosanoides (BRAVERMAN et al., 2016). No nosso trabalho, observamos a produção de IL-1 β , em baixas concentrações, pelas DCs em contato indireto com AEC-II infectadas. A degradação de HIF-1 α de forma mais tardia poderia explicar essa quantidade pequena de IL-1 β produzida. No entanto, a utilização do estabilizador de HIF-1 α não induziu aumento significativo de IL-1 β , demonstrando que somente a estabilização desse fator de transcrição não é suficiente para o aumento dessa citocina. Apesar disso, com Tannahill e colaboradores, a expressão da citocina IL-1 β é reduzida para pelo menos a metade quando há inibição de HIF-1 α (TANNAHILL et al., 2013).

Apesar de agir em vias de sinalização importantes para o controle da replicação do bacilo (BRAVERMAN et al., 2016), o HIF-1 α pode ter um papel dual na TB

experimental. Sua função foi avaliada *in vivo* no início e no final da infecção por Mtb em animais Balb/c. Esse estudo mostrou que há um aumento da expressão de HIF-1 α não somente no início da infecção, mas principalmente na infecção tardia. No entanto, observaram que a inibição de HIF-1 α no início da infecção foi ruim para o controle da replicação do bacilo, enquanto que a sua inibição associada à terapia com antibióticos foi significativamente importante na redução da carga bacteriana na doença avançada. Essa função dual foi associada ao fato de HIF-1 α inibir a apoptose em tempos tardios, embora o mesmo seja importante na resposta inflamatória precoce (BAAY-GUZMAN et al., 2018).

Os estudos citados acima avaliaram HIF-1 α de maneira generalizada ou em macrófagos infectadas. Até o momento, não sabíamos como esse fator de transcrição estaria envolvido na função de DCs durante a infecção por Mtb de forma precoce, em condições de normóxia. Apesar de termos encontrado um acúmulo de HIF-1 α no tempo de 12 horas após estímulo com produtos da célula epitelial infectada, em 24 horas a proteína foi degradada. Em seguida, decidimos investigar algum de seus genes-alvo no tempo de 24 horas para avaliar se o HIF-1 α ainda exerceria alguma função nesse tempo. Para isso, mensuramos a expressão da enzima iNOS e vimos que as AEC-II infectadas não foram capazes de induzir aumento de iNOS após 24 horas de estímulo, corroborando com o menor acúmulo de HIF-1 α encontrado nesse mesmo tempo.

Posteriormente, nos perguntamos se o HIF-1 α estaria envolvido de alguma forma com o fenótipo obtido de aumento de MHC-II, CD80 e CD86. Para isso, estabilizamos HIF-1 α com DMOG nessas células, afim de garantir que o mesmo se encontraria acumulado por mais tempo. Observamos que a estabilização de HIF-1 α nas DCs estimuladas com o meio condicionado de AEC-II infectadas e tratadas com DMOG tiveram uma redução significativa de MHC-II, CD80 e CD86. Corroborando com nossos dados, recentemente, foi relatado o papel negativo de HIF-1 α via glicólise na ativação de DCs, reduzindo a expressão de CD80 e CD86 (LAWLESS et al., 2017). Esse mesmo estudo demonstrou que o HIF-1 α via iNOS/NO induz disfunção função mitocondrial, levando à inibição da OXPHOS e tornando a glicólise aeróbica como única fonte energética (LAWLESS et al., 2017). A ausência de um aumento de iNOS e, conseqüentemente, de NO em DCs estimuladas indiretamente com AEC-II infectadas associada ao aumento de MHC-II e moléculas co-estimuladoras nos leva a sugerir que

nesse contexto, as DCs aumentam a via glicolítica, mas não a ponto de aumentar efetivamente a expressão de iNOS e NO, de modo que a célula ainda deve fazer as duas vias bioenergéticas, glicólise e OXPHOS. Então, acreditamos que com a estabilização de HIF-1 α através do DMOG, o aumento iNOS/NO atuaria na redução da expressão de MHC-II, CD80 e CD86.

Além de avaliarmos a função de HIF-1 α sobre a ativação de DCs, observamos que o mesmo também tem um papel negativo sobre a expressão de CCR7. Um estudo recente demonstrou que o aumento precoce da glicólise é essencial para a oligomerização de CCR7 (GUAK et al., 2018). Por isso, sugerimos que o aumento inicial da glicólise seja importante no aumento de CCR7 encontrado. No entanto, o balanço energético, através da utilização das duas vias, glicólise e OXPHOS, pode ser essencial para a manutenção do fenótipo obtido. Portanto, hipotetizamos que o bloqueio da OXPHOS via HIF-1 α /iNOS pode contribuir para que a célula expresse menores níveis de MHC-II, CD80, CD86 e CCR7.

No entanto, vimos também que apesar de serem importantes para a migração de DCs não infectadas, em DCs infectadas, o bacilo consegue se sobrepor aos efeitos positivos das células epiteliais, fazendo com que as mesmas não consigam induzir o aumento da migração das DCs. Esse dado, apesar de desanimador, foi de encontro ao que já é descrito na literatura em relação a migração atrasada de DCs (ROBERTS; ROBINSON, 2014), mostrando que o bacilo e seus fatores de virulência reduzem a frequência de DCs CCR7+ e não permitem a interferência de células epiteliais nesse contexto.

Do mesmo modo, vimos que em dendríticas infectadas, as AEC-II não foram capazes de modular positivamente a expressão de CD86. Sabe-se que DCs com BCG (DEMANGEL et al., 1999) ou Mtb (TASCON et al., 2000) mostraram aumento de CD80 e CD86, semelhante ao encontrado no nosso trabalho. No entanto, aparentemente, existe algum produto das AEC-II que favorece a micobactéria e leva à menor expressão de CD86.

Embora o bacilo de Mtb tenha aumentado a expressão de CD86, observamos a redução de MHC-II em DCs infectadas. Além disso, vimos que os produtos de AEC-II infectadas conseguiram manter níveis basais de MHC-II em DCs infectadas. Já foi

relatado que Mtb é eficiente em reduzir a expressão de MHC-II e, consequentemente, a função de DCs (GONZALEZ-JUARRERO; ORME, 2001), corroborando com nossos dados. Desse modo, as AEC-II parecem parcialmente cumprir uma função de aumentar, mesmo que não significativamente, a expressão de MHC-II.

Apesar de perderem a sua capacidade de modular positivamente a expressão de MHC-II, moléculas co-estimuladoras e CCR7 em DCs quando estas estão infectadas, sabemos que no pulmão haverá tanto DCs infectadas como as DCs não infectadas. Na Leishmaniose, as DCs não infectadas e ativadas por moléculas solúveis do parasito são as principais responsáveis pela produção de TNF e ativação de células T (CARVALHO et al., 2008). Com base nisso e nos nossos dados, sugerimos que na Tb a maior migração e ativação poderá ser de DCs não infectadas e, consequentemente o priming de células T ocorrerá por meio dessas células.

Vimos também que a infecção por si só aumenta a produção de IL-1 β e IL-6 a níveis tão elevados que as AEC-II não conseguem exercer nenhuma função sobre essa resposta. Entretanto, surpreendentemente, as AEC-II reduzem a produção de TNF por DCs. Estudos têm demonstrado que o TNF é importante para a maturação de DCs e, consequentemente, para o aumento de CD86 (BERTHIER-VERGNES et al., 2005). Essa redução de TNF os ajuda a entender a menor frequência de DCs CD86+ infectadas e tratadas com meio de AEC-II

Curiosamente, nossos dados de DCs infectadas mostraram também um aumento de IL-10 por DCs infectadas e tratadas com meio condicionado de AEC-II infectadas. Estudos evidenciaram que um importante mecanismo de virulência de Mtb é a indução de DCs tolerogênicas, através de uma maior produção de IL-10 e menor expressão de moléculas co-estimuladoras (KIM et al., 2017). Com isso sugerimos que o excesso de IL-10 induzido no contexto de infecção e modulação de DCs por AEC-II infectadas poderia contribuir para um efeito inverso de redução da molécula co-estimuladora CD86.

Em resumo, as AEC-II demonstraram-se permissivas à infecção por Mtb e incapazes de controlar o crescimento do patógeno. Exibiram um perfil aumentado de moléculas pró-inflamatórias que são produzidas de forma inversamente proporcional à expressão de HIF-1 α . A medida que a infecção progride, a expressão de HIF-1 α cai e as AEC-II produzem mais moléculas como IL-6 e NO, sugerindo que HIF-1 α tem caráter

anti-inflamatório nesse contexto. Além disso, as AEC-II infectadas foram capazes de modular DCs, tornando-as mais ativadas e maduras, através do aumento da expressão de MHC-II, CD80, CD86 e CCR7 que foram associadas à regulação negativa de HIF-1 α e iNOS. Ademais, as DCs produziram IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10. Essas DCs, quando infectadas, expressam menos MHC-II e CCR7 e mais CD86. No entanto, as AEC-II não conseguem modular positivamente essas moléculas mediante à infecção, mostrando que a micobactéria consegue se sobrepor aos efeitos dessas células.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que a infecção de AEC-II por Mtb, induz a secreção de diversas moléculas capazes de modular a função de DCs. O perfil pró-inflamatório de AEC-II infectadas é regulado negativamente por HIF-1 α e, à medida que esse fator de transcrição é degradado, a resposta pró-inflamatória aumenta. Esse fato foi bastante curioso e necessita ser melhor investigado, através de AEC-II não imortalizadas afim de mimetizar melhor a realidade e reproduzir nossos dados.

As AEC-II infectadas são capazes de modular positivamente a função de DCs, atuando sobre a maturação e migração dessas células e favorecendo uma resposta de células Th17. O aumento da maturação de DCs foi inversamente dependente de HIF-1 α . Sugerimos que o aumento glicolítico inicial seja importante para o fenótipo obtido em DCs. No entanto, acreditamos que o total bloqueio da função mitocondrial via eixo HIF-1 α /iNOS/NO seja prejudicial para a manutenção da resposta encontrada.

Por fim, apesar de exercer uma função positiva sobre DCs não infectadas, a infecção por Mtb consegue se sobrepor aos efeitos das AEC-II, que perdem a sua capacidade de modular as AEC-II, fato que é compreensível dada a complexidade do bacilo de Mtb.

Esse trabalho deixou algumas perguntas que devem ser respondidas posteriormente. Por exemplo, ainda precisamos responder que molécula produzida por AEC-II está sendo responsável pela modulação de DCs. Também iremos avaliar se a OXPHOS em conjunto com a glicólise participa da manutenção do estado ativado de DCs moduladas por AEC-II infectadas. Ademais, nos resta descobrir que fatores de virulência da micobactéria são capazes de subverter a modulação de DCs de AEC-II e o que fazer para permitir que as AEC-II consigam exercer sua função nesse contexto.

Concluimos que a interação de células epiteliais e DCs contribuem para a resposta imune na Tb, favorecendo uma resposta Th17. Apesar das limitações do trabalho, o mesmo servirá como base para o melhor entendimento da importância do *crostalk* entre células no espaço alveolar, especialmente AEC-II e DCs, e dos possíveis mecanismos por trás dessa resposta afim de, no futuro, utilizar esse conhecimento para a obtenção de novas opções terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J. et al. Hypoxia-Inducible Factor Activation Protects the Kidney from Gentamicin-Induced Acute Injury. v. 7, n. 11, p. 1–9, 2012.

ARMSTRONG, L. et al. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 31, n. 2, p. 241–5, ago. 2004. Disponível em:

<<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2004-0078OC>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BAAY-GUZMAN, G. J. et al. Dual role of hypoxia-inducible factor 1 α in experimental pulmonary tuberculosis: its implication as a new therapeutic target. **Future**

Microbiology, p. fmb-2017-0168, 31 maio 2018. Disponível em:

<<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2017-0168>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715–24, 19 dez. 2005. Disponível em:

<<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20051782>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BASILE, J. I. et al. Outbreaks of Mycobacterium Tuberculosis MDR Strains Induce High IL-17 T-Cell Response in Patients With MDR Tuberculosis That Is Closely Associated With High Antigen Load. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1054–1064, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881121>>.

Acesso em: 18 nov. 2018.

BEATY, S. R.; ROSE, C. E.; SUNG, S.-S. J. Diverse and potent chemokine production by lung CD11b^{high} dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation.

Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 178, n. 3, p. 1882–95, 1 fev. 2007.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237439>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

BEHARKA, A. A. et al. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages.

Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 169, n. 7, p. 3565–73, 1 out. 2002.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244146>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

BELTON, M. et al. Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB. **Thorax**, v. 71, n. 12, p. 1145–1153, dez. 2016. Disponível em: <<http://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thoraxjnl-2015-207402>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BERTHIER-VERGNES, O. et al. TNF- α enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. **FEBS Letters**, v. 579, n. 17, p. 3660–3668, 4 jul. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001457930500671X>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

BODNAR, K. a; SERBINA, N. V; FLYNN, J. L. Fate of Mycobacterium tuberculosis within Murine Dendritic Cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 800–809, 2001.

BOGGARAM, V. et al. Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-8 (IL-8) expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 35, p. 25500–11, 30 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.448217>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BRAVERMAN, J. et al. HIF-1 α Is an Essential Mediator of IFN- γ -Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 197, n. 4, p. 1287–97, 15 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1600266>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

BROOKS, M. N. et al. NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG in human macrophages. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 3, p. 402–18, mar. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2010.01544.x>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

CANTON, J.; NECULAI, D.; GRINSTEIN, S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 9, p. 621–634, 9 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928573>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

CARVALHO, L. P. et al. Activated to Promote T Cell Responses 1. 2008.

CHACKERIAN, A. A.; PERERA, T. V; BEHAR, S. M. Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity**, v. 69, n. 4, p. 2666–74, 1 abr. 2001. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.69.4.2666-2674.2001>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

CHAN, E. D.; CHAN, J.; SCHLUGER, N. W. What is the Role of Nitric Oxide in Murine and Human Host Defense against Tuberculosis? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 25, n. 5, p. 606–612, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713103>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

CHEN, M. et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 12, p. 2791–801, 24 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20080767>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

CHEN, M.; GAN, H.; REMOLD, H. G. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 6, p. 3707–16, 15 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517739>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 4, p. 1349–55, 1 out. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879207>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

COOPER, A. M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2243–7, 1 dez. 1993a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245795>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

COOPER, A. M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2243–7, 1 dez. 1993b.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245795>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

COOPER, A. M. et al. The role of interleukin-12 in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunology**, v. 84, n. 3, p. 423–32, mar. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751026>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

CORCORAN, S. E.; O'NEILL, L. A. J. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 10, p. 3699–3707, 3 out. 2016. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/84431>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

COURTNAY, R. et al. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 4, p. 841–851, 18 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25689954>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

DEMANGEL, C. et al. Protection against aerosol Mycobacterium tuberculosis infection using Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin-infected dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 6, p. 1972–1979, 1999.

DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: Where the action starts. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 318–324, 2000.

DESCH, A. N.; HENSON, P. M.; JAKUBZICK, C. V. Pulmonary dendritic cell development and antigen acquisition. **Immunologic research**, v. 55, n. 1–3, p. 178–86, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22968708>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

DING, A. et al. Induction of macrophage-derived SLPI by Mycobacterium tuberculosis depends on TLR2 but not MyD88. **Immunology**, v. 116, n. 3, p. 381–9, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236128>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

ELKS, P. M. et al. Hypoxia inducible factor signaling modulates susceptibility to mycobacterial infection via a nitric oxide dependent mechanism. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003789, 19 dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003789>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

ERRANTE, P. R.; FRAZÃO, J. B.; CONDINO-NETO, A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. **Recent patents on anti-infective drug**

discovery, v. 3, n. 3, p. 225–30, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991804>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

FERGUSON, J. S. et al. Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 1, p. 312–21, 1 jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384130>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

FLYNN, J. L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2249–54, 1 dez. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504064>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

FÖRSTER, R. et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**, v. 99, n. 1, p. 23–33, 1 out. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10520991>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

GABER, T.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F. Metabolic regulation of inflammation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 5, p. 267–279, 23 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331208>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

GALLEGOS, A. M. et al. A Gamma Interferon Independent Mechanism of CD4 T Cell Mediated Control of M. tuberculosis Infection in vivo. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002052, 19 maio 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002052>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

GARCIA-ROMO, G. S. et al. Airways infection with virulent Mycobacterium tuberculosis delays the influx of dendritic cells and the expression of costimulatory molecules in mediastinal lymph nodes. **Immunology**, v. 112, n. 4, p. 661–668, 2004.

GEURTSVANKESSEL, C. H.; LAMBRECHT, B. N. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 6, p. 442–450, 17 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079211>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

GIACOMINI, E. et al. Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That

Modulates T Cell Response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7033–7041, 2001. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.12.7033>>.

GONZALEZ-JUARRERO, M.; ORME, I. A. N. M. Characterization of Murine Lung Dendritic Cells Infected with Mycobacterium tuberculosis. **Society**, v. 69, n. 2, p. 1127–1133, 2001.

GOPAL, R. et al. Unexpected Role for IL-17 in Protective Immunity against Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis HN878 Infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004099, 15 maio 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004099>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

GOPALAKRISHNAN, A.; SALGAME, P. Toll-like receptor 2 in host defense against Mycobacterium tuberculosis: to be or not to be—that is the question. **Current Opinion in Immunology**, v. 42, p. 76–82, out. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27326654>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

GORRES, K. L.; RAINES, R. T. Prolyl 4-hydroxylase. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 45, n. 2, p. 106–24, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20199358>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

GRAKOU, A. et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5425, p. 221–7, 9 jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398592>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

GUAK, H. et al. Glycolytic metabolism is essential for CCR7 oligomerization and dendritic cell migration. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2463, 25 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-018-04804-6>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

HAMMAD, H. et al. House dust mite allergen induces asthma via TLR4 triggering of airway structural cells. **Nature medicine**, v. 15, n. 4, p. 410–416, 2009.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 3, p. 193–204, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2275>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

HANEKOM, W. A. et al. Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 2,

p. 257–266, 2003.

HANSSON, G. C.; JOHANSSON, M. E. V. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 51–54, 27 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21327117>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

HELDWEIN, K. A.; FENTON, M. J. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. **Microbes and infection**, v. 4, n. 9, p. 937–44, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106786>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 2, p. 635–43, 15 jul. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218578>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

HUANG, L. E. et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 7987–92, 7 jul. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9653127>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

HUANG, Y. et al. Hypoxia-Inducible Factor 2 a Plays a Critical Role in the Formation of Alveoli and Surfactant. n. 18, [s.d.]

HUANG, Z. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129744, 19 jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0129744>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

JAHNSEN, F. L. et al. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 9, p. 5861–7, 1 nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056510>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

JANG, S. et al. IL-6 and IL-10 Induction from Dendritic Cells in Response to *Mycobacterium tuberculosis* Is Predominantly Dependent on TLR2-Mediated Recognition. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3392–3397, 2004. Disponível

em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.173.5.3392>>.

JOHANSSON, M. E. V.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 352–361, 12 mar. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478383>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

KAO, C.-Y. et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 5, p. 3482–91, 1 set. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322213>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

KELLY, C. J. et al. Fundamental role for HIF-1 α in constitutive expression of human β defensin-1. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 6, p. 1110–1118, 6 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462909>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

KHADER, S. A. et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1805–1815, 2006. Disponível em:

<<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20052545>>.

KHAN, N. et al. NOD-2 and TLR-4 Signaling Reinforces the Efficacy of Dendritic Cells and Reduces the Dose of TB Drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of innate immunity**, v. 8, n. 3, p. 228–42, 28 nov. 2016. Disponível em:

<<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000439591>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

KIM, H. et al. Virulence-dependent induction of interleukin-10-producing-tolerogenic dendritic cells by *Mycobacterium tuberculosis* impedes optimal T helper type 1 proliferation. **Immunology**, v. 151, n. 2, p. 177–190, jun. 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28140445>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

KIM, J. et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell metabolism**, v. 3, n. 3, p. 177–85, mar. 2006. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413106000623>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

KIM, T. H.; LEE, H. K. Differential roles of lung dendritic cell subsets against respiratory virus infection. **Immune network**, v. 14, n. 3, p. 128–37, jun. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24999309>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1–12, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603213>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

KONOWICH, J. et al. Divergent Functions of TLR2 on Hematopoietic and Nonhematopoietic Cells during Chronic *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 198, n. 2, p. 741–748, 15 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601651>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

KRAWCZYK, C. M. et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4742–9, 10 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351312>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

KRISHNAN, N.; ROBERTSON, B. D.; THWAITES, G. Pathways of IL-1 β secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93, n. 5, p. 538–47, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849220>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

LAI, R. et al. CD11b+ Dendritic Cell-Mediated Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Th1 Activation Is Counterregulated by CD103+ Dendritic Cells via IL-10. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 200, n. 5, p. 1746–1760, 1 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1701109>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

LAM, A. et al. Role of apoptosis and autophagy in Tuberculosis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, p. ajplung.00162.2017, 11 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28495854>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Dendritic cell and epithelial cell interactions at the origin of murine asthma. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. December, p. S236–S243, 2014a.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Dendritic cell and epithelial cell interactions at the origin of murine asthma. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11 Suppl 5, n.

Supplement 5, p. S236-43, dez. 2014b. Disponível em:

<<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1513/AnnalsATS.201405-218AW>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

LATCHUMANAN, V. K. et al. Mycobacterium tuberculosis Antigens Induce the Differentiation of Dendritic Cells from Bone Marrow. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 12, p. 6856–6864, 2002. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.12.6856>>.

LAWLESS, S. J. et al. Glucose represses dendritic cell-induced T cell responses.

Nature communications, v. 8, p. 15620, 30 maio 2017. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms15620>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

LI, Y.; WANG, Y.; LIU, X. The Role of Airway Epithelial Cells in Response to Mycobacteria Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–11, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570668>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

LOTTE, R. G. et al. Alveolar type II cells maintain bioenergetic homeostasis in hypoxia through metabolic and molecular adaptation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 306, n. 10, p. L947-55, 15 maio 2014.

Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00298.2013>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

LU, H.; FORBES, R. A.; VERMA, A. Hypoxia-inducible Factor 1 Activation by Aerobic Glycolysis Implicates the Warburg Effect in Carcinogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23111–23115, 28 jun. 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943784>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

LUTAY, N. et al. Mycobacteria bypass mucosal NF-κB signalling to induce an epithelial anti-inflammatory IL-22 and IL-10 response. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86466, 28 jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0086466>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

LYADOVA, I. V.; PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–13, 10 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/854507/>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

MATHEU, M. P. et al. Generation of bone marrow derived murine dendritic cells for use in 2-photon imaging. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 17, 9 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066518>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

MIHRET, A. The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 654–9, 15 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23154283>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 9, p. 609–17, set. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri2607>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

NOUAILLES, G. et al. CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 3, p. 1268–82, 3 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/72030>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

NUSSENZWEIG, M. C. et al. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 152, n. 4, p. 1070–84, 1 out. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6968335>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

O'NEILL, L. A. J.; PEARCE, E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. **The Journal of experimental medicine**, v. 213, n. 1, p. 15–23, 11 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20151570>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

ONG, C. W. M.; ELKINGTON, P. T.; FRIEDLAND, J. S. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 190, n. 1, p. 9–18, 1 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713029>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

PACKARD, T. et al. HIF1A Reduces Acute Lung Injury by Optimizing Carbohydrate Metabolism in the Alveolar Epithelium HIF1A Reduces Acute Lung Injury by Optimizing Carbohydrate Metabolism in the Alveolar Epithelium. n. September 2013, 2014.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16076, 27 out. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27784885>>. Acesso em: 25

jul. 2017.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. **Journal of clinical immunology**, v. 19, n. 1, p. 12–25, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080101>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

PARANDHAMAN, D. K.; NARAYANAN, S. Cell death paradigms in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 31, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634891>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

PASULA, R. et al. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 4, p. 483–90, 15 fev. 1999. Disponível em:

<<http://www.jci.org/articles/view/2991>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

PEARCE, E. J.; EVERTS, B. Dendritic cell metabolism. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 1, p. 18–29, jan. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534620>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

PEARCE, E. L.; PEARCE, E. J. Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 633–643, 18 abr. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601682>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

PEDDIREDDY, V.; DODDAM, S. N.; AHMED, N. *Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 84, 15 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28261197>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

PIÑEROS, A. R. et al. M2 macrophages or IL-33 treatment attenuate ongoing *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41240, 27 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28128217>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

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

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28863187>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

RICH, E. A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric

oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. **Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 78, n. 5–6, p. 247–55, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209679>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. Human α -Defensin 2 Is Expressed and Associated with Mycobacterium tuberculosis during Infection of Human Alveolar Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4505–4511, 1 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040961>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. α -Defensin Gene Expression during the Course of Experimental Tuberculosis Infection. v. 194, n. March, p. 1–5, 2006.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 935–941, 2008a.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 67, n. 5, p. 448–452, 2008b.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 67, n. 5, p. 448–52, maio 2008c. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2008.02088.x>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

ROBERTS, L. L.; ROBINSON, C. M. Mycobacterium tuberculosis infection of human dendritic cells decreases integrin expression, adhesion and migration to chemokines. **Immunology**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2014.

ROY, S. et al. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Immunology**, v. 112, n. 3, p. 471–80, jul. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2567.2004.01905.x>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SÁNCHEZ, D. et al. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage death. **Cellular immunology**, v. 260, n. 2, p. 128–36, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874909001737>>.

Acesso em: 25 jul. 2017.

SASINDRAN, S. J.; TORRELLES, J. B. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 2, 2011. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00002/abstract>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SCHÄFER, G. et al. Non-opsonic recognition of Mycobacterium tuberculosis by phagocytes. **Journal of innate immunity**, v. 1, n. 3, p. 231–43, 12 nov. 2009.

Disponível em: <<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000173703>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SCHAIBLE, U. E. et al. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 3, p. 1290–6, 1 fev. 1998a.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570546>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

SCHAIBLE, U. E. et al. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 3, p. 1290–6, 1 fev. 1998b.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570546>>. Acesso em: 3 jul. 2018.

SCHAIBLE, U. E. et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1039–1046, 2003.

SCORDO, J. M.; KNOELL, D. L.; TORRELLES, J. B. Alveolar Epithelial Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection: Active Players or Innocent Bystanders? **Journal of Innate Immunity**, v. 8, n. 1, p. 3–14, 2016.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26384325>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SCORDO, J. M.; KNOELL, D. L.; TORRELLES, J. B. Active Players or Innocent Bystanders. v. 8, n. 1, p. 3–14, 2017.

SCRIBA, T. J.; COUSSENS, A. K.; FLETCHER, H. A. Human Immunology of

Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, 1 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28155806>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SEGOVIA-JUAREZ, J. L.; GANGULI, S.; KIRSCHNER, D. Identifying control mechanisms of granuloma formation during *M. tuberculosis* infection using an agent-based model. **Journal of theoretical biology**, v. 231, n. 3, p. 357–76, 7 dez. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519304003212>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SEMENZA, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. **Biochemical pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 47–53, 1 jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605934>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SEQUEIRA, P. C.; SENARATNE, R. H.; RILEY, L. W. Inhibition of toll-like receptor 2 (TLR-2)-mediated response in human alveolar epithelial cells by mycolic acids and *Mycobacterium tuberculosis* mce1 operon mutant. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 2, p. 132–140, 2014.

SÉRGIO, C. A. et al. CD11c(+) CD103(+) cells of *Mycobacterium tuberculosis*-infected C57BL/6 but not of BALB/c mice induce a high frequency of interferon- γ - or interleukin-17-producing CD4(+) cells. **Immunology**, v. 144, n. 4, p. 574–86, abr. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12411>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SHAH, Y. M. The role of hypoxia in intestinal inflammation. **Molecular and Cellular Pediatrics**, p. 3–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40348-016-0030-1>>.

SHARMA, M. et al. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon- γ in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 229–37, 20 fev. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310225>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SHI, L. et al. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* induces the Warburg effect in mouse lungs. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 18176, 10 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep18176>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SHI, L.; EUGENIN, E. A.; SUBBIAN, S. Immunometabolism in Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 150, 21 abr. 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148269>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SMITH, V. L. et al. Exosomes function in antigen presentation during an in vivo *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Scientific reports**, v. 7, p. 43578, 6 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep43578>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SPETH, J. M. et al. Alveolar Epithelial Cell–Derived Prostaglandin E₂ Serves as a Request Signal for Macrophage Secretion of Suppressor of Cytokine Signaling 3 during Innate Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 12, p. 5112–5120, 15 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1502153>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SPIRIG, R. et al. Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 α and dendritic cell maturation under normoxic conditions. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e0010983, 7 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539755>>. Acesso em: 27 maio. 2018.

STEINMAN, R. M.; HEMMI, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 311, p. 17–58, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048704>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

SUNG, S.-S. J. et al. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 4, p. 2161–72, 15 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455972>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

TAILLEUX, L. et al. DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 1, p. 121–127, 2003. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20021468>>.

TAKEDA, N. et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. **Genes & development**, v. 24, n. 5, p. 491–501, 1 mar. 2010. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1881410>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–42, 11 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11986>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

TASCON, R. E. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-activated dendritic cells induce

protective immunity in mice. **Immunology**, v. 99, n. 3, p. 473–480, 2000.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 6, p. 455–62, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21075039>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

TORRELLES, J. B.; SCHLESINGER, L. S. Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 688–697, ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28366292>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

TSUJI, S. et al. Maturation of Human Dendritic Cells by Cell Wall Skeleton of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin: Involvement of Toll-Like Receptors. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6883–6890, 2000. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.68.12.6883-6890.2000>>.

UMEMURA, M. et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 6, p. 3786–96, 15 mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339477>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 294–309, abr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932234>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 182–203, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703560>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2016**Cdc 2016. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0%0Ahttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+title#0>>.

WINAU, F. et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 105–117, 2006.

WOLF, A. J. et al. Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, n.

4, p. 2509–2519, 2007. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.4.2509>>.

ZIMMERMANN, N. et al. Syndecans promote mycobacterial internalization by lung epithelial cells. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1846–1856, dez. 2016.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12627>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

APÊNDICE I – ESTRATÉGIAS DE GATE, CONTROLES E REPRESENTATIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Estratégia de gates (CD80)

Representativos

Estratégia de gates (CD86)

Representativos

Estratégia de gates (CCR7 & iNOS)

FMO

Representativos CCR7

Representativos iNOS

APÊDICE II ESTRATÉGIAS DE GATE, CONTROLES E REPRESENTATIVOS DA CO-CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E CÉLULAS T NAIVE

APÊDICE III ESTRATÉGIAS DE GATE, CONTROLES E REPRESENTATIVOS DA CULTURA DE CÉLULAS TH17

Estratégia de gates (Th17)

Representativos