

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

O papel das vesículas extracelulares na ativação de células dendríticas humanas
durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

PATRICK FERNANDES DA SILVA

Ribeirão Preto

2022

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

PATRICK FERNANDES DA SILVA

**O papel das vesículas extracelulares na ativação de células dendríticas humanas
durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada
Orientador:

Prof^a. Dra. Fabiani Gai Frantz

Ribeirão Preto

2022

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.

Silva, Patrick Fernandes da

O papel das vesículas extracelulares na ativação de células dendríticas humanas durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Ribeirão Preto, 2022.

90 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Frantz, Fabiani Gai.

1. Tuberculose. 2. Imunidade Inata. 3. Vesículas extracelulares. 4. Atraso da resposta imunológica. 5. Célula Dendrítica.

Patrick Fernandes da Silva

O papel das vesículas extracelulares na ativação de células dendríticas humanas durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dra Fabiani Gai Frantz

Instituição: USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que investiram seu tempo em me formar, a todos os abnegados professores com os quais a vida me presenteou.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, o único e verdadeiro, pelo amor incondicional e imerecido.

- Aos meus pais, Eliana e Altair, que em nenhum momento fizeram menos que o máximo para que todos meus sonhos fossem realizados. Que saibam que toda conquista em meu nome é uma extensão do que vocês viabilizaram com seu amor, trabalho e dedicação. Essa não é diferente de nenhuma outra.

- A minha noiva, Lara, que com seu amor instigou e impulsionou a concretização das nossas realizações. Que, desde a sua chegada em minha vida, tem sido agente multiplicador de feitos e de felicidade.

- A minha orientadora, Dra. Fabiani Gai Frantz, que, com sua colaboração intelectual, propiciou a todos alunos do LIME atmosfera amplamente voltada ao debate e desenvolvimento científico. Que a todo momento buscou nos fornecer o melhor ambiente e ferramentas de trabalho. Que sempre nos prestigiou com autonomia e liberdade para inovar e colaborar com outros grupos. E agradeço, acima de tudo, pelo altruísmo de priorizar a preocupação com o futuro de seus alunos.

- As instituições de fomento CAPES e CNPq pelo aporte financeiro, que viabilizou a bolsa de estudo e subsidiou os experimentos deste trabalho.

- Aos meus primeiros orientadores, Raphael Vasconcellos e Leandro Licursi de Oliveira, que, por depositarem confiança, me formaram.

- A todos professores do programa de Imunologia Básica e Aplicada pelos momentos de aprendizado e pelo empenho em formar ótimos profissionais.

- Ao meu grande amigo, Murilo Duarte, que nunca se absteve em dividir os meus fardos e tornou esta jornada muito mais leve. A quem eu tenho imensa gratidão por me receber como um de seus amigos.

- Aos amigos do LIME, Ricardo Cardoso Castro, Felipe Teixeira Lima, Fabiana Zambuzi e Caroline Fontanari pela amizade, colaboração e presteza, tanto pelas discussões científicas quanto pela ajuda em todos os experimentos. Toda essa ajuda possibilitou a existência desse trabalho. Amigos dentro e fora da USP.

- Aos colaboradores desse trabalho Renan Carvalho, Dario Zamboni e Fausto Almeida, que me acolheram e auxiliaram em experimentos que contribuíram imensamente para a abertura de uma nova perspectiva deste trabalho.

- A Ana Cristine Ferreira, pela amizade e, por seu empenho ao trabalho, ter sido sempre resolução de problemas de todos os aspectos. Pela disponibilidade, conselhos e auxílio.

- À nova geração de amigos do LIME, Humberto Gravina, Fabrícia e Mathias, pelas discussões científicas, pela ajuda prestada e pela disponibilidade, que perdurou mesmo após me mudar de Ribeirão Preto.

- Aos amigos do LIIP, pela amizade, e à Dra. Lucia Faccioli, pela disponibilidade para ensinar e pela estrutura cedida.

- Aos funcionários e doadores voluntários do Hemocentro, que cordialmente me cederam material para a realização do trabalho.

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria”

– Santo Agostinho

“Viva Cristo Rei”

– São José Sanchez Del Río (1928).

LISTA DE SIGLAS

- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ALIX - Proteína X de interação com ALG-2
- Alox 15 - Araquidonato lipoxigenase 15
- BCG - Bacilo de Calmette Guérin
- CCL19 - Quimiocina C ligante 19
- CCL21 - Quimiocina C ligante 21
- CCR7 - Receptor de quimiocina tipo 7
- CD14 - Grupamento de diferenciação 14
- CD4 - Grupamento de diferenciação 4
- CD86 - Grupamento de diferenciação 86
- COVID-19 - Doença do coronavírus 2019
- DC-SIGN - Molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica- 3 não-integrina agarradora
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- ESAT6 - Alvo antigênico secretório precoce 6
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- ICAM-3 - Molécula de adesão intercelular 3
- IFN- γ - Interferon Gamma
- IL-10 - Interleucina 10
- IL-12 - Interleucina 12
- IL-1 β - Interleucina 1 β
- IL-4 - Interleucina 4
- IL-6 - Interleucina 6
- IL-8 - Interleucina 8
- ILC - Célula Linfoide Inata
- LC3 - Proteína 1A/1B-cadeia leve 3 associada a microtúbulos
- MHC I - Complexo principal de histocompatibilidade 1
- MHC II - Complexo principal de histocompatibilidade 2
- Mtb - *Mycobacterium Tuberculosis*
- NF κ B - Fator Nuclear Kappa B
- NLRP3 - Domínio de pirina da família NLR 3

OMS - Organização Mundial da Saúde

OVA - Ovoalbumina

PAMP - Padrão molecular associado ao patógeno

PRR - Receptor de reconhecimento padrão

RNA - Ácido ribonucleico

TCR - Receptor de células T

TLR2 - Receptor do tipo Toll 2

TLR4 - Receptor do tipo Toll 4

TLR7 - Receptor do tipo Toll 7

TLR9 - Receptor do tipo Toll 9

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VE - Vesículas extracelulares

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Transmissão da Tuberculose.	19
Figura 2 Delineamento experimental utilizado na pesquisa.	32
Figura 3 Vesículas extracelulares produzidas por monócitos, avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão.	43
Figura 4 Análise da distribuição média de tamanho das vesículas extracelulares	44
Figura 5 Expressão de ALIX por vesículas extracelulares derivadas de monócitos infectados.	45
Figura 6 Alteração em marcadores de superfície em células dendríticas pré-incubadas com vesículas extracelulares	46
Figura 7 Expressão de TLR2 e pNFκB por células dendríticas estimuladas com vesículas extracelulares de monócitos infectados	47
Figura 8 Produção de citocinas por células dendríticas tratadas com vesículas extracelulares.	48
Figura 9 Produção de IL-1β e ativação de inflamassomas por células dendríticas estimuladas com vesículas extracelulares de monócitos infectados.	49
Figura 10 Citocinas IL-12, IFN-γ e IL-2, liberadas por células dendríticas estimuladas com vesículas extracelulares de monócitos infectados.	50
Figura 11 Transporte de mitocôndrias por vesículas extracelulares isoladas de células infectadas com Mtb.	51
Figura 12 Índice de autofagia em células dendríticas tratadas com vesículas extracelulares.	52
Figura 13 Contagem da média de corpúsculos lipídicos em células dendríticas.	53
Figura 14 Resumo dos resultados encontrados	68
Figura 15 Estratégia de gates para identificação das células dendríticas	87

SUMÁRIO

1	Introdução.....	18
1.1	Breve contextualização sobre a tuberculose	18
1.2	O microambiente pulmonar	20
1.3	O primeiro momento da infecção	21
1.4	Papel das células dendríticas na infecção	23
1.5	O papel das citocinas na construção da resposta imunológica	24
1.6	O papel das microvesículas na resposta imunológica.....	26
2	Objetivos	30
3	Metodologia	32
3.1	Delineamento Experimental	32
3.2	Casuística.....	32
3.3	Isolamento de vesículas do sobrenadante de cultura	34
3.4	Caracterização das vesículas por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	34
3.5	Crescimento bacteriano e estimulação dos monócitos	35
3.6	Diferenciação das células dendríticas	35
3.7	Estimulação das células dendríticas com as vesículas extracelulares.....	36
3.8	Quantificação de citocinas liberadas no sobrenadante de cultura.....	36
3.9	Avaliação fenotípica por citometria de fluxo	37
3.10	Western blot.....	37
3.11	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	38
3.12	Análise da expressão gênica - PCR em tempo real para análise de expressão de genes relacionados à ativação celular	39
3.13	Identificação de transferência de mitocôndrias	40
3.14	Análise estatística.....	40

4	Resultados	42
4.1	Caracterização das vesículas extracelulares purificadas de monócitos	42
4.2	Modulação morfofuncional de células dendríticas pelas vesículas extracelulares	45
4.3	Identificação da transferência de mitocôndrias, transportadas em vesículas, para células dendríticas.....	50
4.4	Avaliação da autofagia de células dendríticas cultivadas com vesículas	51
4.5	Quantificação da formação e acúmulo de corpúsculos lipídicos em células dendríticas cultivadas com vesículas	52
5	Discussão	55
6	Conclusão	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMO

SILVA, P. F. **O papel das vesículas extracelulares na ativação de células dendríticas humanas durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis***. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Até o ano de 2019, a tuberculose era a doença infectocontagiosa mais letal do mundo, causando aproximadamente 1,4 milhões de mortes por ano. A resposta efetiva contra a doença é dependente da resposta imune celular adaptativa bem estruturada, que auxilie as células infectadas a eliminar o micro-organismo em seu interior. Contudo, já foi observado que nos pacientes com tuberculose ativa a indução da resposta atrasa de 12 a 14 dias. Por esse motivo acredita-se que a resposta formada com atraso não é suficiente para conter a infecção, que se multiplica na ausência da imunidade adaptativa efetora no pulmão. As vesículas extracelulares, entre tantas funções, já foram descritas pelo seu papel imunomodulador. Nesse trabalho, nosso objetivo foi entender como as vesículas secretadas por monócitos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* atuam sobre as células dendríticas. Células dendríticas cultivadas na presença de vesículas derivadas de monócitos previamente infectados com Mtb (H37Rv) tiveram expressão prejudicada de receptores TLR2 e TLR4, que por sua vez levaram à redução na fosforilação de NFκB e, conseqüentemente, alteraram a produção de citocinas importantes para a resposta imunológica. As células dendríticas tiveram também diminuição no índice de autofagia, um importante mecanismo para o controle da infecção. Sugerimos que vesículas extracelulares liberadas por células infectadas podem induzir a ativação de mecanismos relacionados ao aumento da suscetibilidade durante a tuberculose, demonstrando assim o papel imunomodulador das vesículas derivadas de monócitos durante a progressão da doença.

Palavras-chave: Ativação celular, vesículas extracelulares, atraso da resposta imune.

ABSTRACT

SILVA, P. F. **The role of extracellular vesicles in the activation of human dendritic cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection.** Thesis (PhD). Ribeirão Preto Medical School– University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Until 2019, tuberculosis was the most lethal infectious disease in the world, causing approximately 1.4 million deaths per year. The effective response against the disease is dependent on the well-structured adaptive cellular immune response, which helps the infected cells to eliminate the microorganism inside them. However, it has already been observed that in patients with active tuberculosis, the induction of the response is delayed by 12 to 14 days. For this reason, it is believed that the delayed response is not sufficient to contain the infection that multiplies in the absence of adaptive effector immunity in the lung. Extracellular vesicles, among many functions, have already been described for their immunomodulatory role. In this work, our objective was to understand how the vesicles secreted by monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* act on dendritic cells. Dendritic cells, cultured in the presence of vesicles derived from monocytes previously infected with Mtb (H37Rv) had impaired expression of TLR2 and TLR4 receptors, which in turn led to a reduction in NF κ B phosphorylation and, consequently, altered the production of cytokines important for the immune response. Dendritic cells also had a decrease in autophagy index, an important mechanism for infection control. We suggest that extracellular vesicles released by infected cells may induce the activation of mechanisms related to increased susceptibility during tuberculosis, thus demonstrating the immunomodulatory role of monocyte-derived vesicles during disease progression.

Keywords: Cell activation, extracellular vesicles, delayed immune response.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Breve contextualização sobre a tuberculose

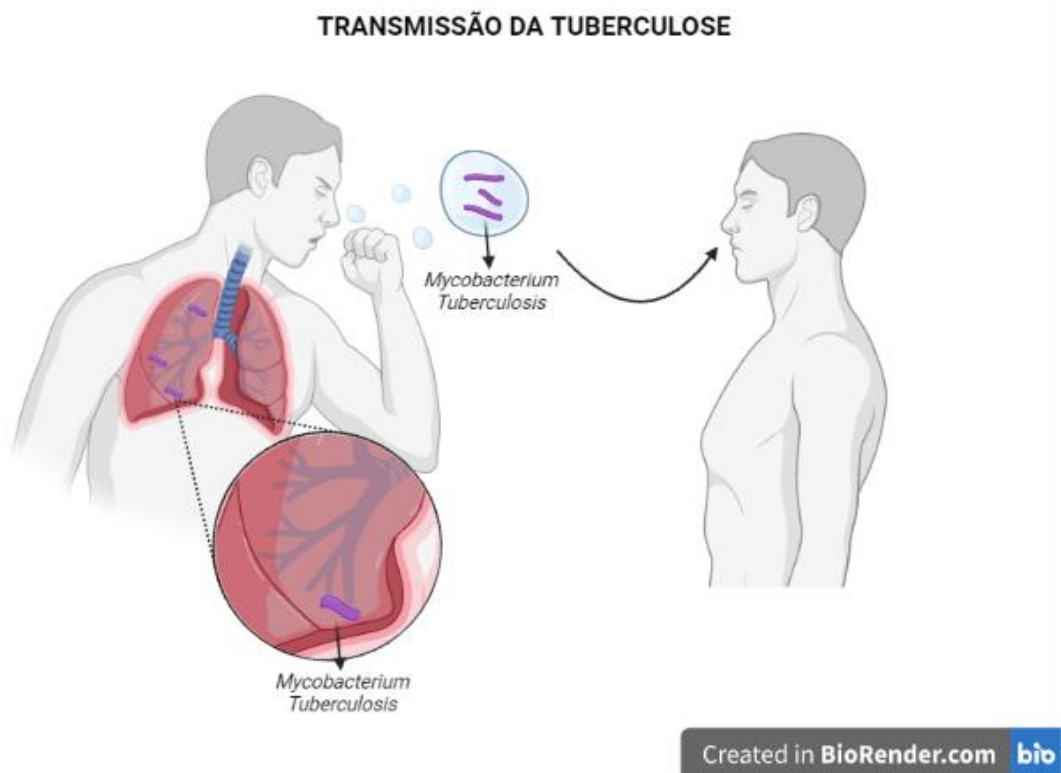
De acordo com o último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), até antes da pandemia de COVID-19, a Tuberculose era a principal causa de morte quando se tratava de agente infeccioso único, superando até mesmo o HIV/AIDS. Sendo uma das doenças presente no ranking que elencou as principais causas de morte do ano de 2019. Aproximadamente 10 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose apenas no ano de 2020, com 1,3 milhões de mortes (OMS 2021). Esses dados retrocedem o avanço no controle da doença, que vinha sendo alcançado até 2019, retomando atualmente os índices de 2017. É ainda mais alarmante o fato de que um terço das pessoas no mundo estão infectadas com a forma latente da doença, e estima-se que cerca de 10% dessas pessoas irão desenvolver a forma ativa em algum estágio da vida (OMS, 2021).

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente causador da tuberculose, foi isolado e descrito pela primeira vez pelo cientista alemão Robert Koch (KOCH, 1884). É uma bactéria gram-positiva, de coloração álcool-ácido resistente, não formadora de esporos e intracelular facultativa (TRAAG et al., 2010), que em ambientes favoráveis leva de 14 a 18 horas para se dividir (WAYNE, 1977). Sua fisiologia é marcada pela alta dependência de O_2 , e por isso em humanos colonizam principalmente os pulmões, desencadeando a tuberculose pulmonar (COOK et al., 2013).

A transmissão da doença se dá pelo contato direto do hospedeiro com os bacilos de Mtb, presentes em gotículas formadas pela tosse, fala ou espirro de pacientes com tuberculose ativa (WAMPANDE et al., 2015). As gotículas formadas com tamanho entre 1 e 3 μm são as mais infectantes; por serem pequenas, elas não sofrem expulsão natural pelos cílios epiteliais, logo, conseguem atingir o interior dos alvéolos do novo hospedeiro (GROSSET, 2003). Uma gotícula

de 1 a 3 μm é capaz de transportar entre 1 e 3 bacilos, o que, por convenção, já é considerada carga infectante, apesar de não ter sido provado experimentalmente (GROSSET, 2003). A esquematização da infecção é demonstrada na Figura 1.

Figura 1 Transmissão da Tuberculose.



Paciente ativo da doença expela os bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* em gotículas propelidas pela tosse (Adaptado do "Center for Disease Control and Prevention": www.cdc.gov)

Após a infecção primária, se a resposta imunológica não for capaz de eliminar o patógeno, pode se desenvolver a doença ativa. Caso o sistema imunológico atue devidamente, o bacilo pode ser eliminado ou ainda contido no interior de granulomas, evitando seu crescimento ou espalhamento pelo pulmão, e formando o conhecido quadro latente da infecção (LAWN; ZUMLA, 2011). Sendo assim, os casos de tuberculose pulmonar são divididos em primários e secundários. A tuberculose primária, responsável por cerca de 5-10% dos casos, se

desenvolve logo após a infecção; já a tuberculose secundária (90-95% dos casos), é decorrente da reativação do bacilo que já estava presente no pulmão, porém de forma controlada, ou latente (NITU et al., 2017). O espalhamento do bacilo pelo pulmão pode levar à pneumonia lobular obstrutiva, e pode se desenvolver para pneumonia caseosa, caracterizada pelas lesões típicas da tuberculose e fibrose, que podem comprometer toda a fisiologia do órgão (HUNTER, 2018).

1.2 O microambiente pulmonar

O pulmão, por causa de sua atuação constante na troca de gases, é um dos principais sítios-alvo para os patógenos ambientais e demais estressores do sistema imunológico (JAMIE D. K. WILSON, 2015). O microambiente pulmonar, devido às suas características fisiológicas e seu contato direto com o meio externo, é uma região altamente regulada, e que, para manter-se saudável, ao mesmo tempo tem de conter possíveis infecções e controlar respostas imunológicas exacerbadas (BRANCHETT; LLOYD, 2019). Por ser um órgão que abarca uma microbiota nativa, o interior do pulmão é um local onde a resposta imunológica deve, assim como no intestino, ser capaz de tolerar as bactérias que formam a microbiota e não tolerar os micro-organismos patogênicos (MATHIEU et al., 2018; SOMMARIVA et al., 2020).

De forma resumida, as células que compõe o sistema imunológico no pulmão, em situação de homeostase, podem ser divididas entre as que estão em região intersticial – células dendríticas, macrófagos, ILCs e células T e B – e as constituintes da barreira natural e primeira defesa, que estão no interior dos alvéolos – células epiteliais brônquicas e alveolares, e os macrófagos alveolares (KUMAR, 2020; LAMBERT; CULLEY, 2017; YANG et al., 2018). Diferentemente das células do interstício, essas células constituem a primeira linha que entrará em contato com qualquer patógeno que ingresse no trato respiratório (KUMAR, 2020).

1.3 O primeiro momento da infecção

Inicialmente, o primeiro contato do bacilo com o sistema imunológico se dá nos alvéolos pulmonares, quando eles são fagocitados por macrófagos alveolares e células dendríticas na submucosa (COOPER, 2009).

Os macrófagos alveolares, assim como os outros macrófagos espalhados pelos diferentes tecidos do corpo, recebem estímulos do microambiente e se diferenciam fenotipicamente a fim de atender às necessidades e manter o estado homeostático do local (HU; CHRISTMAN, 2019). No corpo humano existe uma vasta quantidade de tipos de macrófagos, sendo que a diferença entre eles está relacionada com as necessidades fisiológicas do tecido em que eles se encontram. Os macrófagos alveolares, diferentemente dos macrófagos de outros tecidos, apresentam uma menor quantidade de receptores de ativação em sua superfície, e por isso respondem de forma diferente à infecção (JUAREZ et al., 2010). A menor quantidade de receptores de ativação está diretamente relacionada ao papel dos macrófagos alveolares no alvéolo. Diferentemente do papel dos macrófagos habituais, no alvéolo o macrófago alveolar não pode responder apenas convergido à remoção de patógenos, deve haver um controle fino da atuação para que seja capaz de combater os patógenos e tolerar a microbiota local, além de evitar lesões causadas por respostas exacerbadas (ALLARD; PANARITI; MARTIN, 2018; COLEMAN et al., 2013; MARTIN et al., 2021). A diferença na atuação entre o macrófago alveolar e o macrófago convencional é dirigida por uma pressão do microambiente pulmonar, que leva a mudanças fenotípicas expressivas (MARTIN et al., 2021). Por serem mais adaptados a reduzir o impacto de lesão tecidual nos pulmões, os macrófagos alveolares são considerados, por alguns autores, como pouco equipados para a atuação contra patógenos evoluídos (HUSSELL; BELL, 2014; RAJARAM et al., 2014). É válido ressaltar que os pulmões, apesar de serem ambientes com baixa proporção de nutrientes, acomodam uma microbiota comensal

saudável e necessária para o bom funcionamento do órgão, pois o protegem contra infecções oportunistas (O'DWYER; DICKSON; MOORE, 2016).

O *Mycobacterium tuberculosis*, por suas características evolutivas e pelas características peculiares do sistema imunológico no pulmão e de seus mecanismos diversos de evasão, utiliza os macrófagos alveolares como ponto de partida na infecção e propagação. As características celulares do pulmão oferecem um ambiente propício ao crescimento do *M. tuberculosis*, um patógeno bastante adaptado ao microambiente pulmonar, que é capaz de utilizar receptores imunológicos para infectar as células, e que desenvolveu mecanismos de evasão da resposta imune que proporcionaram a manutenção de viabilidade mesmo no interior dos macrófagos alveolares (KEANE; REMOLD; KORNFELD, 2000; PIETERS, 2008; QUEVAL; BROSCHE; SIMEONE, 2017).

Após a infecção pelo Mtb, o processo de amadurecimento do fagossomo é retardado, o que diminui a chance de ser eliminado no interior dessa vesícula. Os mecanismos de autofagia e apoptose também são reduzidos, além de acontecer o rompimento da membrana do fagossomo e bloqueio da formação do fagolisossomo; ou seja, o Mtb permanece livre e viável no citoplasma dos macrófagos (UPADHYAY; MITTAL; PHILIPS, 2018).

No interior dos macrófagos alveolares, o reconhecimento do Mtb induz a ativação e a secreção de IL-1, o que ativa as células, fazendo-as migrar do interior do alvéolo para o interstício pulmonar, e conseqüentemente há o espalhamento pelo pulmão quando a célula entra em processo de morte celular (COHEN et al., 2019). Na infecção por Mtb, os macrófagos alveolares, ao fagocitarem o bacilo e migrarem para o interstício, não conseguem eliminá-lo e, com isso, permitem o crescimento do bacilo em seu interior e posterior propagação para o interstício pulmonar (LEEMANS et al., 2001). Assim, logo nas primeiras semanas, os bacilos infectam e matam os macrófagos alveolares, e a morte desses macrófagos leva ao espalhamento do bacilo pelo pulmão (FENTON; VERMEULEN, 1996). Além de não ser eliminado pelos

macrófagos, o bacilo diminui a capacidade deles em apresentarem antígenos para as células T, e dessa forma retardam a formação da resposta adaptativa (PANCHOLI et al., 1993).

1.4 Papel das células dendríticas na infecção

Em contraponto ao que foi dito anteriormente, as principais células da imunidade inata responsáveis pelo processo de transição para a resposta adaptativa são as células dendríticas, células essas que têm origem direta da medula óssea ou podem se diferenciar a partir de monócitos sanguíneos (LIU; NUSSENZWEIG, 2010). São as células apresentadoras de antígeno mais eficientes no corpo humano, podendo fagocitar uma grande variedade de antígenos, como vírus, bactérias, corpos apoptóticos, parasitas e fluido extracelular, e apresentá-los em forma de peptídeos ligados ao seus MHC I e II (MELLMAN; STEINMAN, 2001). Ao reconhecerem um produto microbiano ou estímulo pró-inflamatório, as células dendríticas iniciam um processo de ativação também descrito como maturação, no qual elas diminuem sua capacidade de captação antigênica e aumentam sua capacidade de migrar e estimular células T, aumentando a expressão de diversos receptores como o MHC II e moléculas coestimuladoras (MELLMAN; STEINMAN, 2001). Elas levam informações relevantes da periferia para dentro dos linfonodos, e por meio da sinapse imunológica iniciam a ativação de linfócitos T. Isso é mediado pelos receptores expressos na superfície e pelas citocinas liberadas por essas células no interior dos linfonodos (MIHRET, 2012). Durante a maturação e o processo de migração, as células dendríticas precisam iniciar uma série de modificações no citoesqueleto, como a perda de estruturas que conferem aderência no tecido e o aumento de receptores de quimiocinas como o CCR7, que as guiam para o linfonodo mais próximo (BANCHEREAU et al., 2000). Além disso, durante a migração para os linfonodos, as células dendríticas diminuem sua capacidade de capturar antígenos e aumentam seu potencial em apresentar antígenos às células T (BANCHEREAU et al., 2000). No entanto, o reconhecimento do Mtb pelas células dendríticas pode ser um fator que determina a resposta

imunológica ao patógeno. Se o reconhecimento do Mtb é realizado por receptores do tipo DC-SIGN, a resposta tende a ser menos efetora (GEIJTENBEEK et al., 2003). Evidências sugerem que as melhores respostas contra a infecção são as que preterem a ativação dos receptores DC-SIGN e priorizam os receptores do tipo Toll (TLR) no reconhecimento do Mtb, quando feito na superfície das células dendríticas (KAUFMANN; SCHAIBLE, 2003).

1.5 O papel das citocinas na construção da resposta imunológica

O processo de ativação dos macrófagos alveolares e das células dendríticas é iniciado no reconhecimento dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) de Mtb por seus receptores de reconhecimento padrão (PRR), como os TLR, principalmente pelo TLR2 e TLR4, o que culmina na fosforilação de NF κ B e na produção de citocinas importantes como TNF- α e IL-6 (JO et al., 2007).

O TNF- α está relacionado à manutenção dos granulomas e à ativação de células da imunidade inata, que leva à produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, e, conseqüentemente, à eliminação das bactérias fagocitadas, além de ser importante para a indução da produção de quimiocinas indutoras de migração das células do sistema imunológico (COOPER; MAYER-BARBER; SHER, 2011; ROACH et al., 2002; SAUNDERS et al., 2005). A importância do TNF- α para o controle da infecção por Mtb é bem definida na literatura, em pesquisas que bloqueiam sua atuação, e assim a infecção tende a ser mais grave (SODENKAMP et al., 2012).

Já a produção de IL-6 é induzida por um dos fatores de virulência secretados pelo Mtb, o ESAT6 (JUNG et al., 2017). A IL-6 produzida desempenha o papel pró-inflamatório, sua produção acarreta a rápida produção de IFN- γ , e conseqüentemente melhor proteção contra a infecção (SAUNDERS et al., 2000). No entanto, a IL-6, induzida pelo Mtb, quando estimula

os macrófagos, gera resistência do próprio macrófago ao estímulo de IFN- γ , reduzindo assim a efetividade do sistema imunológico em combater o bacilo (NAGABHUSHANAM et al., 2003). Isso demonstra como o Mtb, por ser um micro-organismo adaptado e repleto de fatores de virulência, tem o potencial de subverter a resposta imunológica e impedir o bom funcionamento do sistema imunológico.

No interior das células dendríticas da submucosa, o Mtb é capaz de sobreviver, mas não é capaz de se proliferar (JIAO et al., 2002). Ao infectar as células dendríticas, o bacilo induz a sua maturação e, uma vez maduras, migram para o linfonodo do mediastino e iniciam a apresentação de antígenos para as células T (HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997). As células dendríticas maduras diminuem sua capacidade de fagocitose e aumentam sua capacidade de apresentação de antígenos (LARSEN et al., 1990). Todavia, a infecção por Mtb, com o passar do tempo, modula as células dendríticas e diminui a capacidade de apresentação de antígenos e de migração para os linfonodos, fazendo com que sua capacidade de ativar linfócitos T seja eficiente apenas nos dias iniciais em que é infectada (JIAO et al., 2002). O motivo que explica o atraso das células dendríticas é pouco explorado, contudo, sabe-se que, além de quimiocinas como CCL19 e CCL21, para que haja a migração de células dendríticas para os linfonodos após a fagocitose de *Mycobacterium tuberculosis*, é necessário que haja o processo de maturação e a produção de IL-12 (DIEU et al., 1998; KHADER et al., 2006; RUEZ et al., 2018). Todavia, apesar da produção de IL-12 ser um fator fundamental para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa e as células dendríticas serem as principais produtoras dessa citocina no início das infecções (CAETANO et al., 1997), durante a infecção por Mtb a produção de IL-12 é suprimida por meio da produção autóloga de IL-10 pelas células dendríticas, que diminui a produção de IL-12, suprimindo assim a migração para os linfonodos drenantes (DEMANGEL; BERTOLINO; BRITTON, 2002).

Em contrapeso ao reconhecimento do Mtb pelos receptores TLR2 e TLR4, o reconhecimento do Mtb por meio dos receptores DC-SIGN, nas células dendríticas, também é responsável por iniciar a produção de IL-10, o que direciona uma resposta menos efetiva no combate ao patógeno (GEIJTENBEEK et al., 2003; KAUFMANN; SCHAIBLE, 2003). Além da produção de IL-10, a ativação das células pelos receptores DC-SIGN no contexto de infecção por Mtb leva à expressão de IL-4, que atua com papel anti-inflamatório direcionando a uma resposta menos efetora à infecção (LUGO-VILLARINO et al., 2018).

1.6 O papel das microvesículas na resposta imunológica

A fase de ativação do sistema imunológico e maturação das células da imunidade inata é estabelecida por um processo complexo constituído de interações célula-célula, ativação de receptores, secreção de ativadores e pela liberação e absorção de pequenas vesículas conhecidas como vesículas extracelulares (VE) (GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ et al., 2013; MEDZHITOV, 2007). Durante a etapa de apresentação de antígenos, uma série de vesículas extracelulares, secretadas por células no tecido, ajudam as células dendríticas a apresentarem e ativarem as células T no combate aos micro-organismos (GIRI; SCHOREY, 2008; MONTECALVO et al., 2008; VINCENT-SCHNEIDER et al., 2002). Vesículas extracelulares são pequenas estruturas revestidas de membrana celular provenientes de corpos multivesiculares, endossomos ou da membrana plasmática, que são secretadas pelas células para o meio extracelular e têm a capacidade de alterar o comportamento das células em condições fisiológicas e patológicas (SCHIERA et al., 2015). Elas são divididas em microvesículas com tamanho de 100nm a 1µm, e exossomos com cerca de 50 a 100nm de diâmetro, e se formam diretamente na membrana plasmática ou por meio de vesículas, respectivamente (KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

As microvesículas mantêm o fenótipo de membrana da célula que as originou e carregam em si MHC com seus respectivos peptídeos, integrinas, moléculas co-estimuladoras

e outros receptores. No entanto, somente as microvesículas são pouco eficientes na ativação das células T, precisando de um número muito maior de interações entre MHC e TCR, que as torna apenas acessórios durante o processo de ativação, necessitando da presença de células apresentadoras de antígeno (ROBBINS; MORELLI, 2014).

Células da imunidade inata, quando ativadas com agonistas de TLR, secretam vesículas capazes de levar as células dendríticas a aumentar a expressão de moléculas apresentadoras de antígeno, receptores de coestimulação e integrinas importantes para a migração (EKEN et al., 2008; SKOKOS et al., 2003). Vesículas extracelulares produzidas por células infectadas com *Mtb* desempenham um papel imunomodulador em células que as internalizam, gerando modificações na resposta imunológica *in vivo* e *in vitro* (WALTERS et al., 2013). Em diversas ocasiões, vesículas extracelulares podem desencadear papel imunossupressor, como quando camundongos, ao serem imunizados com OVA, após 14 dias de imunização produzem vesículas extracelulares chamadas de tolerossomos, que são vesículas que tolerizam células T fazendo ligação de FAS com FAS-ligante (KIM et al., 2007; ÖSTMAN; TAUBE; TELEMO, 2005). Vesículas produzidas por células endoteliais quiescentes tendem, naturalmente e sem qualquer estímulo, a suprimir a resposta inflamatória de monócitos (NJOCK et al., 2015). No sobrenadante de células de melanoma, vesículas extracelulares têm a capacidade de interromper a maturação de células dendríticas *in vitro*, fazendo com que a resposta adaptativa não seja desenvolvida de forma correta (MAUS et al., 2017). De forma geral, as vesículas extracelulares têm relevante influência na resposta imune inata e podem funcionar tanto como ativadores quanto como repressores da resposta imunológica, de acordo com seu conteúdo (ZHOU et al., 2020).

As vesículas carregam no seu interior constituintes internos das células de origem, macromoléculas como proteínas, constituintes do citoesqueleto, lipídeos e material genético, assim como antígenos de patógenos que as estejam colonizando (ROBBINS; MORELLI,

2014). Entre os constituintes de material genético estão RNAs mensageiros, micro RNAs e RNAs de interferência (ROBBINS; MORELLI, 2014). As vesículas transportam também material genético proveniente das mitocôndrias, que são fortes ativadores da via dos Interferons do tipo 1 (TORRALBA et al., 2018). Além disso, as vesículas carregam enzimas capazes de alterar a expressão gênica causando modificações epigenéticas nas células alvo (SCHIERA et al., 2013). Enzimas epigenéticas têm a capacidade de modificar as histonas adicionando grupamentos químicos com capacidade de reprimir ou ativar vias de transcrição, assim como podem fazer alterações diretamente na sequência de nucleotídeos com os mesmos intuitos (MERSFELDER; PARTHUN, 2006; VARRIALE, 2014).

Recentemente, foi reconhecida a existência de memória imunológica na imunidade inata e foi descrita como imunidade treinada. O fenômeno da imunidade treinada é decorrente de modificações epigenéticas na célula que tornam sequências do DNA mais ou menos acessíveis para a transcrição no caso de um posterior desafio (NETEA et al., 2016a). A imunidade treinada é completamente inespecífica, e seu efeito pode induzir melhoras expressivas da resposta imunológica, como quando macrófagos expostos ao BCG respondem melhor a um segundo desafio com *Candida albicans* ou *Schistosoma mansoni*, ou piores, como quando macrófagos incubados com LPS têm indução de tolerância e não conseguem responder a micro-organismos (IFRIM et al., 2014; NETEA et al., 2016b; WOUT; POELL; FURTH, 1992).

Em vesículas extracelulares, também já foram encontrados no seu interior constituintes com capacidade para alterações epigenéticas e para modulação da resposta imunológica, influenciando em ativação, supressão e migração celular (HOSSEINKHANI et al., 2018; QIAN et al., 2015).

Neste trabalho, buscamos entender como as vesículas extracelulares secretadas pelos macrófagos – primeiras células a fagocitarem o Mtb durante a infecção – podem influenciar na função das células dendríticas, e se isso tem ligação com o atraso da resposta adaptativa.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das vesículas extracelulares (VE), produzidas por células infectadas por Mtb, em modular a resposta células dendríticas humanas.

2.2 Estratégias e Objetivos específicos

Para atingir este objetivo, monócitos humanos foram isolados e infectados com Mtb, a fim de mimetizar a infecção de macrófagos alveolares por Mtb. Após isso, por meio de centrifugação diferencial, foram coletadas as vesículas extracelulares produzidas por estes monócitos infectados. As vesículas isoladas foram usadas para serem cultivadas com células dendríticas humanas, diferenciadas a partir de monócitos isolados. Após as células dendríticas serem cultivadas com vesículas, foram avaliados os objetivos específicos deste trabalho, como a modulação fenotípica e funcional destas células.

Os monócitos foram usados para mimetizar os macrófagos alveolares, primeiras células a serem infectadas durante a infecção por Mtb. Já as células dendríticas foram usadas para avaliar a ação das vesículas, produzidas pelos monócitos infectados, nessas células e no desenvolvimento da resposta contra o patógeno.

Objetivos específicos:

- 2.2.1 Expor células dendríticas a VE, produzidas por monócitos, *in vitro*;
- 2.2.2 Avaliar as mudanças fenotípicas das células dendríticas pelas VE;
- 2.2.3 Quantificar a produção de citocinas por células dendríticas pós cultura com VE;
- 2.2.4 Determinar do índice de autofagia de células dendríticas pós cultura com VE;
- 2.2.5 Investigar a ativação do inflamassoma em células dendríticas pós cultura com VE;
- 2.2.6 Avaliar a formação de corpúsculos lipídicos em células dendríticas pós cultura com VE.

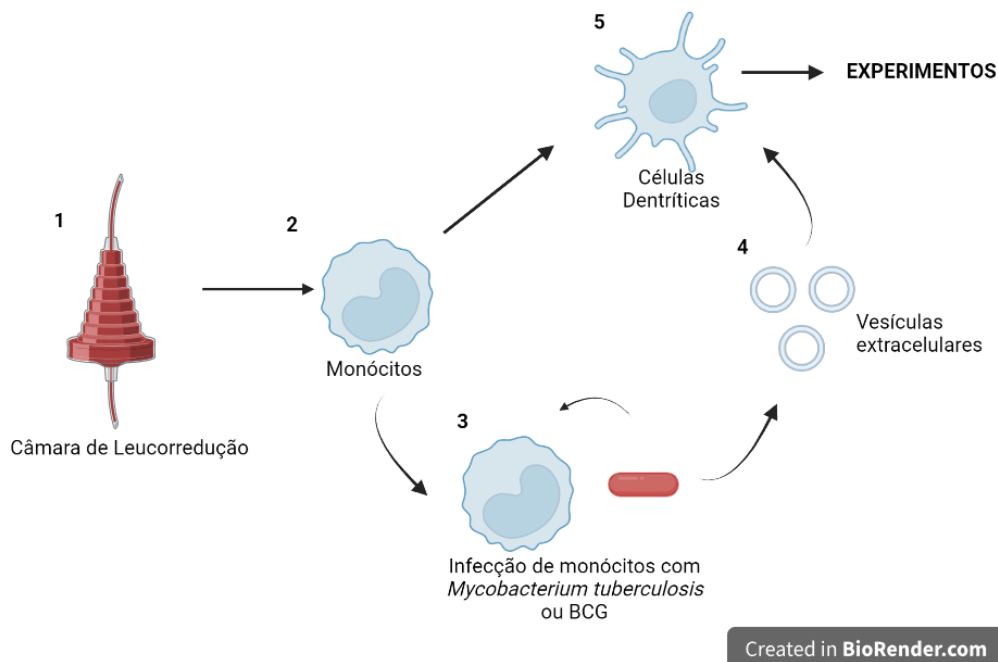
METODOLOGIA

3 Metodologia

3.1 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado na pesquisa será detalhado na Figura 2.

Figura 2 Delineamento experimental utilizado na pesquisa.



Câmaras de leucorredução de indivíduos hígidos foram coletadas (1). Os monócitos foram isolados por método de separação por beads magnéticas anti-cd14(2). Os monócitos isolados foram infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e seus devidos controles (BCG e os monócitos que não foram submetidos à infecção) (3). As vesículas extracelulares produzidas pelos monócitos infectados foram isoladas por centrifugação diferencial (4). Células dendríticas diferenciadas, a partir dos monócitos isolados, foram co-cultivadas com vesículas isoladas da cultura de monócitos infectados, e as células dendríticas foram avaliadas funcionalmente, morfológica e fenotipicamente (5).

3.2 Casuística

Os indivíduos hígidos foram recrutados no Hemocentro de Ribeirão Preto. Os indivíduos abordados no momento da coleta/consulta foram convidados a participar voluntariamente do estudo, mediante autorização que foi registrada através da assinatura do

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética (Disponibilizado em anexo).

Para a realização do estudo, foram obtidos filtros provenientes da coleta de plaquetas, conhecidas como câmaras de leucorredução, de 40 indivíduos hígidos na faixa etária de 18 a 60 anos, de ambos os sexos, pertencentes a qualquer classe social e de qualquer etnia. Não foram incluídos aos grupos pacientes/voluntários que apresentavam infecção por HIV, idade inferior a 18 anos ou superior a 60 anos, assim como mulheres grávidas, pacientes com outras doenças crônicas, e aqueles que não consentiram em participar do estudo. A coleta da câmara de leucorredução não acarreta nenhum prejuízo ao doador. Das amostras doadas, foram separadas as frações celulares, que foram utilizadas para realização de infecção *in vitro* com cepas do Mtb.

A coleta dos monócitos foi realizada a partir da lavagem residual das câmaras de leucorredução, obtidos por concessão voluntária dos doadores de plaquetas no hemocentro de Ribeirão Preto-SP. As amostras de sangue coletadas foram diluídas em tampão fosfato (PBS) (1:2), pH 7,4 e aplicadas cuidadosamente sobre gradiente de Ficoll-PaqueTMPLUS, d=1,078 g/mL (GE HealthcareBio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Logo após, foram centrifugadas a 600g por 30 minutos, à temperatura ambiente, para separação da camada de células mononucleares. As células mononucleares de sangue periférico presentes na interfase do gradiente de separação foram cuidadosamente coletadas, transferidas para um novo tubo e lavadas duas vezes em PBS para obtenção do precipitado celular. Em seguida, as células mononucleares isoladas na etapa anterior foram purificadas por seleção imunomagnética positiva com kit específico (MiltenyBiotec, Auburn, CA, USA). Com o auxílio desta ferramenta, as células da fração mononuclear foram adicionadas à beads magnéticas, complexadas a anticorpos monoclonais anti-CD14, e a solução foi aplicada à coluna de separação magnética. Após eluição das células aderidas à coluna, apenas os monócitos (fração

CD14+) foram obtidos para realização dos demais experimentos. Todos os indivíduos que consentiram em participar da pesquisa, deixaram registrado sua autorização, por meio de assinatura, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Disponível em anexo), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP (#18492/2014). Foram realizados experimentos apenas com amostras dos indivíduos do grupo controle.

3.3 Isolamento de vesículas do sobrenadante de cultura

As vesículas extracelulares foram isoladas do sobrenadante de cultura de células pré-incubadas com Mtb H37Rv, BCG e meio de cultura, através de protocolo de centrifugações sequenciais, como descrito por Xie, H. *et al.*, 2016(XIE et al., 2016). Em resumo, as amostras foram inicialmente centrifugadas a 750g por 15min e 1.500g por 20min para remoção de células e restos celulares. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 16.000g por 60min a 4°C para obtenção do precipitado com as vesículas extracelulares, que foram lavadas em solução salina, com nova centrifugação a 16.000g por 60min a 4°C. Para confirmação, as vesículas extracelulares serão avaliadas quanto à morfologia, através de microscopia eletrônica e citometria de fluxo, de acordo com Chandler, W. L, 2016 (CHANDLER, 2016).

3.4 Caracterização das vesículas por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

NTA foi realizado usando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Reino Unido). Os parâmetros utilizados seguiram o manual do usuário do fabricante (NanoSight Manual do usuário NS300, MAN0541-01-PT-00, 2017). O registro das análises utilizou o Software integrado NTA3.3.301 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, REINO UNIDO). As amostras foram diluídas em PBS para um volume final de 1 mL, e sua

concentração foi ajustada observando uma taxa de partículas/quadro de cerca de 50 (30–100 partículas/quadro).

3.5 Crescimento bacteriano e estimulação dos monócitos

As cepas H37Rv de *M. tuberculosis* (American Type Culture Collection, Rockville, MD) e a BCG, armazenadas a -70°C , foram repicadas em meio líquido Mildebrook 7H9, enriquecido com Mildebrook ADCTM (BD Biosciences, Sparks, USA), e incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por onze dias, para crescimento bacteriano. Após tal período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 3.000g por 20min e ressuspendidas em solução salina até atingir turbidez correspondente à escala padrão de McFarland nº1 ($1,0 \times 10^7$ micobactérias/mL). Desta suspensão, 100 μL foram diluídos por meio de uma diluição seriada para avaliar a viabilidade das micobactérias, bem como confirmar o estabelecimento da concentração através da escala padrão de McFarland nº1. Para a infecção *in vitro*, as amostras de micobactérias foram submetidas à agitação com pérolas de vidro esterilizadas para desfazer grumos, e foram utilizadas nos experimentos em um MOI 1 (1 bactéria para 1 célula).

3.6 Diferenciação das células dendríticas

As DCs humanas foram diferenciadas a partir de monócitos isolados a partir da lavagem residual das câmaras de leucorredução, como descrito anteriormente. Depois de isolados os monócitos, foram suspensos em meio de cultura AIM-V (Invitrogen - Carlsbad, Ca) e semeados em placas de 6 poços (5×10^6 / mL). Os monócitos foram então cultivados em meio de cultura completo com 50 ng/mL de GM-CSF recombinante humano e 10 ng/mL (rh) de IL-4 (PeproTech -Rocky Hill, NJ - EUA), por 7 dias, com a devida renovação do meio após 3 dias de cultura.

3.7 Estimulação das células dendríticas com as vesículas extracelulares

Após a diferenciação, as células dendríticas foram cultivadas na presença de vesículas extracelulares advindas de monócitos infectados com Mtb ou BCG, ou com vesículas de monócitos não infectados. A proporção usada para a estimulação foi de 20 µg/mL, por 12 horas.

3.8 Quantificação de citocinas liberadas no sobrenadante de cultura

Foram avaliadas citocinas produzidas pelas células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos (2×10^5 células/poço) com meio condicionado, e incubadas com as vesículas extracelulares, de acordo com o protocolo. Após o tempo de incubação, as células foram induzidas a produzir citocinas com estímulo de Mtb. As citocinas IL-12, IFN- γ e IL-2 foram quantificadas pela plataforma personalizada multiplex (16 plex, EMD Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após incubação com as microesferas magnéticas fluorescentes revestidas com anticorpos de captura específicos para as citocinas listadas acima, as amostras foram avaliadas em um instrumento baseado em fluorescência (Luminex® MAGPIX® System, Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA). Analisaremos os dados adquiridos pelo Luminex, utilizando o software Milliplex Analyst v3.5 (Millipore, VigeneTech Inc., Boston, Massachusetts, EUA) e uma curva logística de três parâmetros.

As citocinas IL-8 e IL-1 β foram quantificadas pelo teste de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. De modo resumido, microplacas de 96 poços foram previamente sensibilizadas com os anticorpos anti-citocinas por 18 horas à temperatura ambiente. Foi utilizada solução de Soro Albumina Bovina 4% em PBS a fim de bloquear as ligações inespecíficas nos poços da microplaca. Após ciclo de lavagens com tampão PBS/ 0,05% Tween-20, foram adicionadas as amostras e então incubadas por 1h em temperatura ambiente. Após o término da incubação, foi realizada nova série de lavagens, e os anticorpos anti IL-8 e IL-1 β conjugados com biotina foram adicionados e incubados, novamente, por 1h. A seguir, foi

realizada uma nova série de três lavagens, e foi então adicionada a estreptoavidina peroxidase por 20 minutos. Foi realizada nova sequência de três lavagens e foi adicionado o substrato TMB. A reação foi interrompida por meio da adição de ácido sulfúrico 1M. A leitura, em leitor de placas, foi realizada a 450nm.

3.9 Avaliação fenotípica por citometria de fluxo

As células dendríticas (1×10^6) foram estimuladas com as vesículas extracelulares, na concentração de 20ng/mL, por 24 horas, em seguida foram infectadas com a cepa de Mtb (H37Rv) e BCG por 4 horas. Após, foram fixadas com 200 μ L de solução de paraformaldeído 4%, e então foram analisadas por citometria de fluxo com os marcadores de superfície MHC II e CD86.

3.10 Western blot

Para analisar o fenótipo e o índice de autofagia e ativação de NFkB, as células cocultivadas com as vesículas extracelulares, na concentração de 20ng/mL, foram submetidas ao estímulo com Mtb inativada com calor, e ao estímulo farmacológico indutor de autofagia, rapamicina (200nM). A inativação do Mtb por calor foi realizada utilizando banho-maria na temperatura de 80°C por 25 minutos.

Cerca de 1×10^6 células dendríticas, após serem pré-incubadas com os estímulos com vesículas por 12h, foram tratadas por 4 horas com fatores que estimulam a ativação e a autofagia. Após o tratamento, as células foram precipitadas por centrifugação a 400g por 10 minutos em temperatura ambiente e foram tratadas com 500 μ L de tampão ripa, 10mM Tris-HCL pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X100, 1% desoxicolato de sódio e 0.1% SDS, contendo coquetel de inibidores de protease. Após o tratamento as células lisadas, foram ressuspendidas em tampão de amostra contendo SDS (50mM Tris, pH 6,8), 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 2,5% β -mercaptoetanol. As proteínas foram atraídas para uma

membrana de nitrocelulose, por meio do sistema de transferência Semidry Transfer Cell (Bio-Rad laboratories), a 15 volts por 40 minutos. Para a transferência foi utilizado tampão de transferência (50mM Tris, 40mM glicina e 10% metanol). Foi realizado bloqueio das membranas por 12h a 4°C em tampão Tris (25mM Tris, pH 7.4, 0,3mM KCL e 140mM NaCl) contendo 0,1% Tween-20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado. Após realizado o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-LC3 (1:250), anti-p-NFκB (1:250) e anti-TLR2 (1:250), por 1 hora em temperatura ambiente. Após essas etapas, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário apropriado, conjugado com peroxidase (1:3000).

3.11 Extração de RNA e síntese de cDNA

As células dendríticas foram incubadas com as vesículas extracelulares por 24 horas, e em seguida infectadas com Mtb e seus controles por 4 horas. As células foram centrifugadas a 400g por 10 minutos, e o sedimento celular foi armazenado em 750 µL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, EUA) a -80°C, até ao momento da extração do mRNA. Para esta etapa, descongelamos o material à temperatura ambiente. Foram adicionados 250 µL de PBS a cada amostra, seguido pela adição de 200 µL de clorofórmio e 10 µL de glicogênio, e feita agitação leve por inversão. Centrifugamos as amostras a 17.500g, 4°C, durante 15 minutos, e o RNA foi recuperado da fase aquosa por precipitação com álcool isopropílico. As amostras foram incubadas durante toda a noite a -80°C, e depois centrifugadas a 17.500g, 4°C, durante 15 minutos. Descartamos o sobrenadante, e para melhor obtenção do RNA, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e 500 µL de álcool isopropílico, e as amostras foram sujeitas a uma nova centrifugação. O mRNA obtido foi lavado uma vez em etanol 70% e centrifugado a 17.500 g, 4°C, durante 15 minutos, e então foi ressuscitado em 30µL de água livre de endonuclease.

Após a extração, tratamos o mRNA com DNase pelo kit TURBO DNA-free (Ambion, Carlsbad, EUA). O material obtido foi quantificado utilizando um Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, San Jose, Califórnia, EUA). Para realizar a PCR em tempo real, 1.080ng de cada mRNA foi traduzido em cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Assim, o mRNA foi incubado com 3 μ L de tampão 10X, 1,2 μ L de mistura de dNTP, 3 μ L de iniciadores aleatórios 10X e 1,5 μ L da enzima MultiScribe Reverse transcriptase (50 U/ μ L), e água livre de endonucleases para completar o volume de 40 μ L. Realizamos a reação em termociclador num ciclo de incubação por 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C e 5 minutos a 85°C.

3.12 Análise da expressão gênica - PCR em tempo real para análise de expressão de genes relacionados à ativação celular

Determinamos a expressão genética por PCR em tempo real. Os primers utilizados foram determinados de acordo com sua presença em estudos celulares, seguindo a literatura, bem como disponibilidade. Desta forma, foram observadas a expressão de TLR4, TLR2, CCR7, TNF- α , IL-6, IL-10 e pelo menos dois genes constitutivos como controle (GAPDH e beta actina). Foi utilizada a Placa TaqMan Array de 96 poços StepOnePlus™ Fast (Applied Biosystems, Foster City, EUA), e foi realizada a reação de amplificação adicionando 30ng de cDNA por poço de cada amostra. A reação de PCR foi feita no equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e nas seguintes condições de amplificação: 20 segundos a 95°C seguido por 40 ciclos de 3 segundos a 95°C, e 30 segundos a 60°C.

3.13 Identificação de transferência de mitocôndrias

Monócitos humanos foram isolados de acordo com o protocolo de isolamento, e posteriormente foram submetidos a marcação de suas mitocôndrias pelos reagentes Mitotracker red e Mitotracker green.

Monócitos em cultura (10^7) foram marcados por 45 minutos com a concentração de 100nM dos reagentes Mitotracker. Após isso, foram realizadas duas lavagens das células por centrifugação a 400g por 10 minutos para eliminar todo o Mitotracker sobressalente. Os monócitos foram submetidos ao protocolo de produção de vesículas descrito no capítulo 3.3.

As vesículas isoladas foram incubadas com células dendríticas (10^6) pelos tempos de 30 minutos e 2 horas. As células dendríticas foram então submetidas à citometria de fluxo para avaliar se existia marcação de mitocôndrias no seu interior.

3.14 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os testes para análise foram escolhidos de acordo com a distribuição dos dados paramétricos ou não paramétricos. Para todos os testes foram considerados significativos valores de p menor ou igual a 0,05 (Two tailed).

RESULTADOS

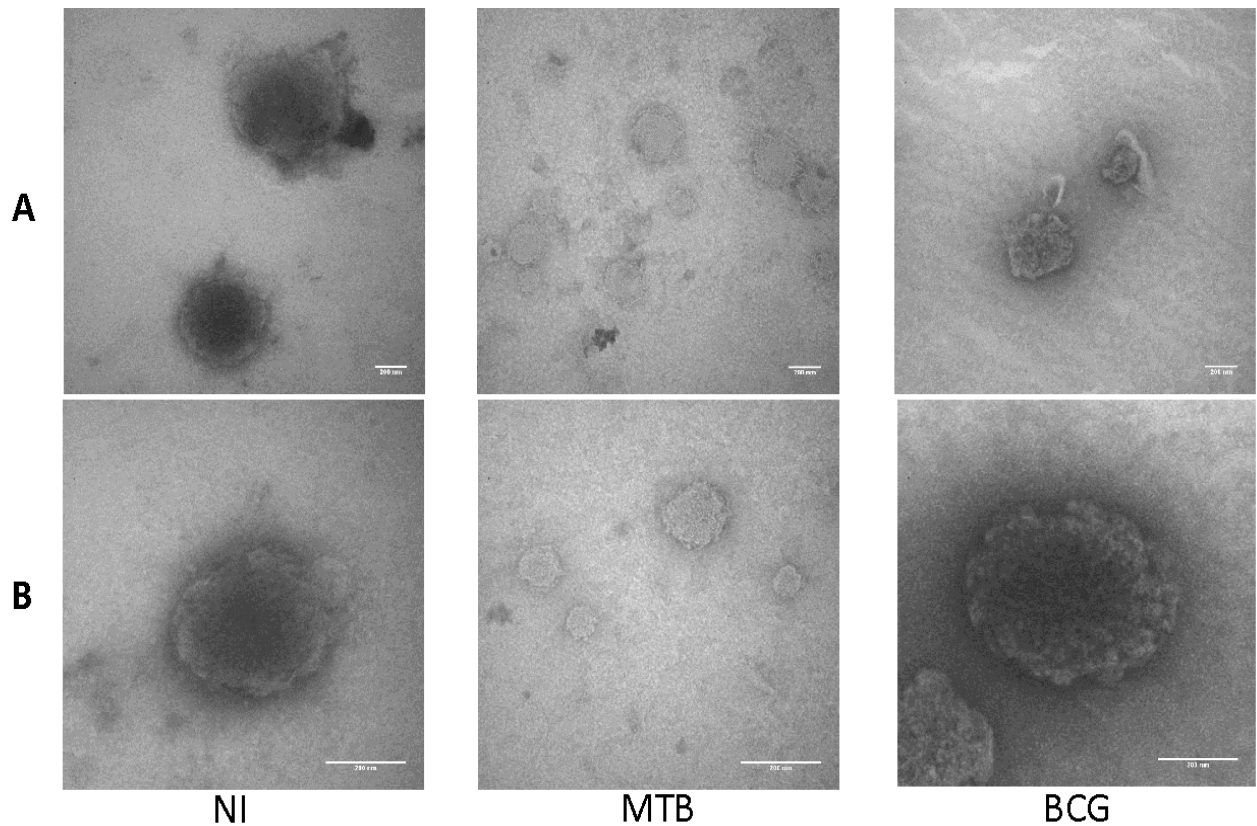
4 Resultados

4.1 Caracterização das vesículas extracelulares purificadas de monócitos

As vesículas extracelulares, produzidas por monócitos humanos, previamente isolados e infectados com Mtb ou BCG, foram purificadas por técnica de centrifugação. A caracterização foi feita em três etapas: morfologia, distribuição por frequência de tamanho, e identificação de marcador de superfície por western blot. A morfologia das vesículas foi observada por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3), e o tamanho e distribuição média das vesículas foi analisado por "Nanoparticles tracking analysis".

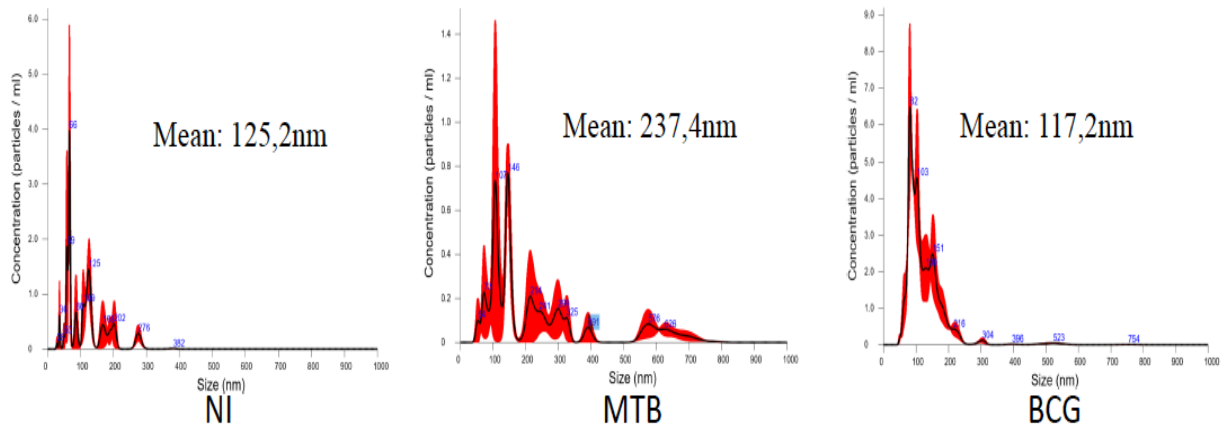
Observamos que as vesículas de monócitos infectados com Mtb apresentaram maior variedade de tamanhos, tendo vesículas maiores, com média de tamanho cerca de 100nm maior que as vesículas de células não infectadas ou infectadas com BCG, conforme apresentado na Figura 4.

Figura 3 Vesículas extracelulares produzidas por monócitos, avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão



Monócitos humanos foram infectados com Mtb, BCG ou não foram infectados, por 12 horas. Após essa etapa, o sobrenadante foi coletado para isolamento de vesículas extracelulares. Por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, as vesículas extracelulares foram avaliadas quanto às características morfológicas. NI = Advindas de células não infectadas; Mtb = Advindas de células infectadas com Mycobacterium tuberculosis; BCG = Advindas de células infectadas com Bacilo de Calmette-Guérin. A barra de escala está definida em 200nm em todas as figuras dispostas.

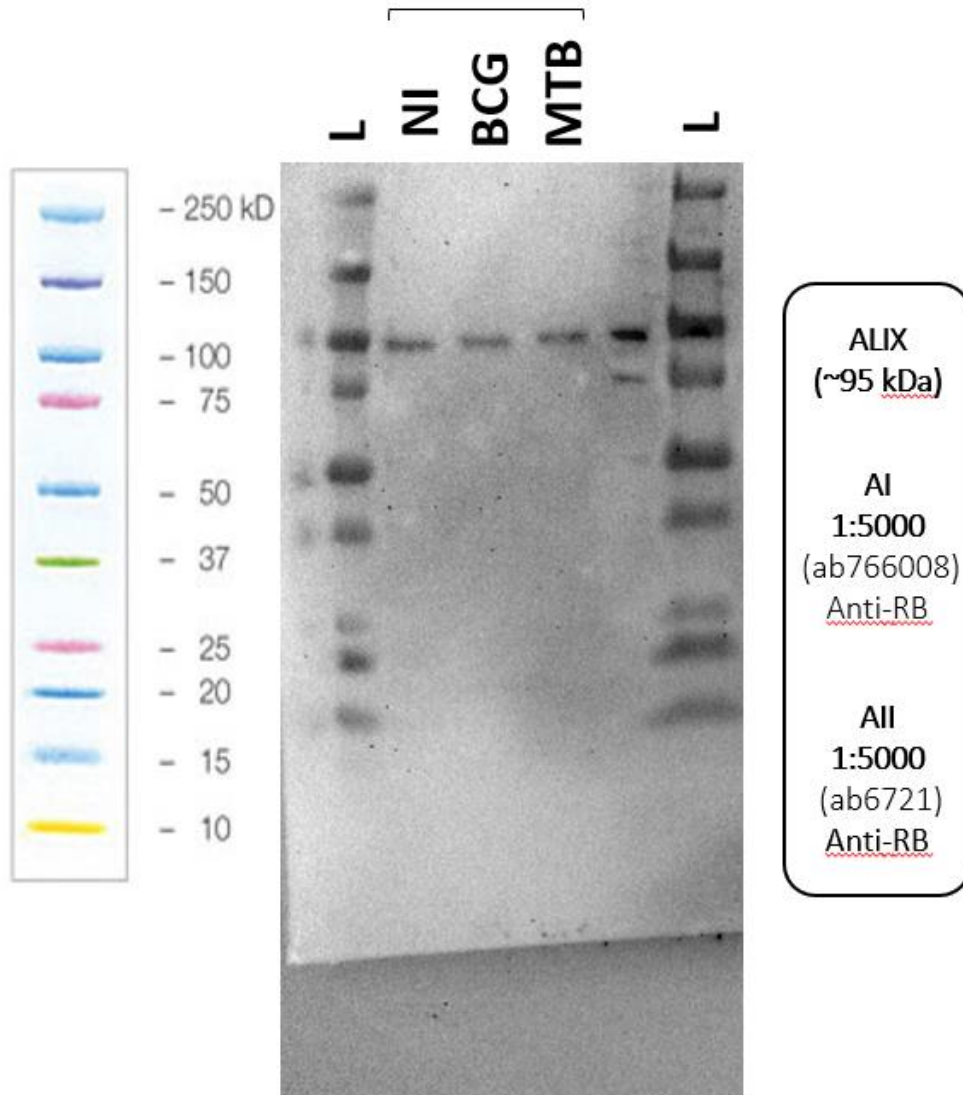
Figura 4 Análise da distribuição média de tamanho das vesículas extracelulares



Monócitos humanos foram infectados com Mtb, BCG ou não foram infectados, por 12 horas. Após essa etapa, o sobrenadante foi coletado para isolamento de vesículas extracelulares. Por meio da técnica de "Nanoparticles tracking analysis" (NTA), as vesículas extracelulares foram avaliadas quanto a concentração e frequência média por tamanho, indicada em cada gráfico. NI = Advindas de células não infectadas; Mtb = Advindas de células infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*; BCG = Advindas de células infectadas com Bacilo de Calmette-Guérin.

Objetivando finalizar a etapa de caracterização das vesículas extracelulares de monócitos, avaliamos a presença do marcador de superfície para vesículas extracelulares ALIX, que se encontra na altura de 96kDa na imunoeletroforese (Figura 5). Observamos que em todas as amostras purificadas do sobrenadante das células, infectadas ou não, houve marcação da proteína ALIX, o que é indicativo da presença de vesículas (Figura 5).

Figura 5 Expressão de ALIX por vesículas extracelulares derivadas de monócitos infectados



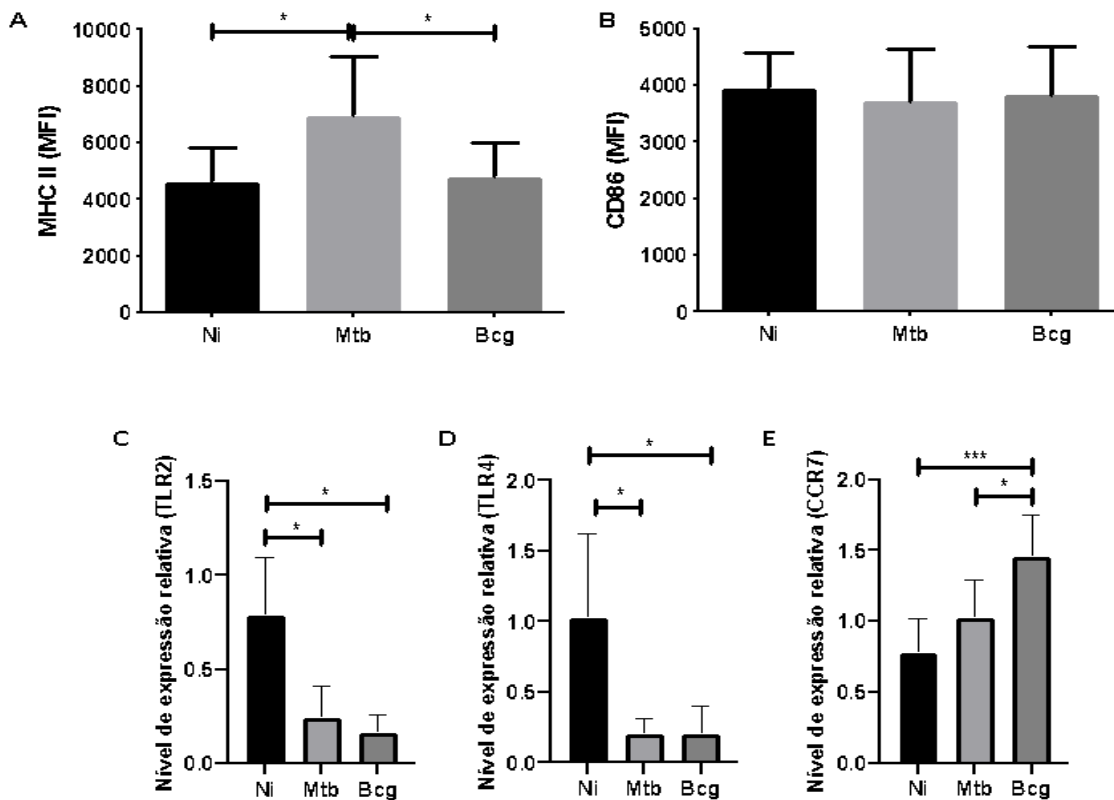
Monócitos humanos foram infectados com Mtb, BCG ou não foram infectados, por 12 horas. Após essa etapa, o sobrenadante foi coletado para isolamento de vesículas extracelulares. Por meio da técnica de Western Blot, foi avaliada a expressão do marcador ALIX, com 96kDa. NI = Advindas de células não infectadas; Mtb = Advindas de células infectadas com Mycobacterium tuberculosis; BCG = Advindas de células infectadas com Bacilo de Calmette-Guérin.

4.2 Modulação morfofuncional de células dendríticas pelas vesículas extracelulares

Uma vez caracterizadas as vesículas extracelulares produzidas por monócitos infectados, analisamos os efeitos exercidos por estas vesículas em células dendríticas.

As vesículas extracelulares produzidas pelos monócitos na infecção por Mtb induziram maior expressão de MHC-II em células dendríticas, sem alterar a expressão da molécula de coestimulação CD86. As vesículas de monócitos infectados com BCG não induziram modificação na expressão de MHC II ou CD86. Na presença de vesículas provenientes de monócitos infectados com Mtb ou BCG, houve também a redução na expressão de RNAm para receptores de ativação e reconhecimento de produtos bacterianos, TLR4 e TLR2 (Figura 6). Entretanto, a expressão do receptor responsável pela migração das células dendríticas para os linfonodos (CCR7) foi aumentada apenas nas células dendríticas que receberam vesículas de BCG (Figura 6).

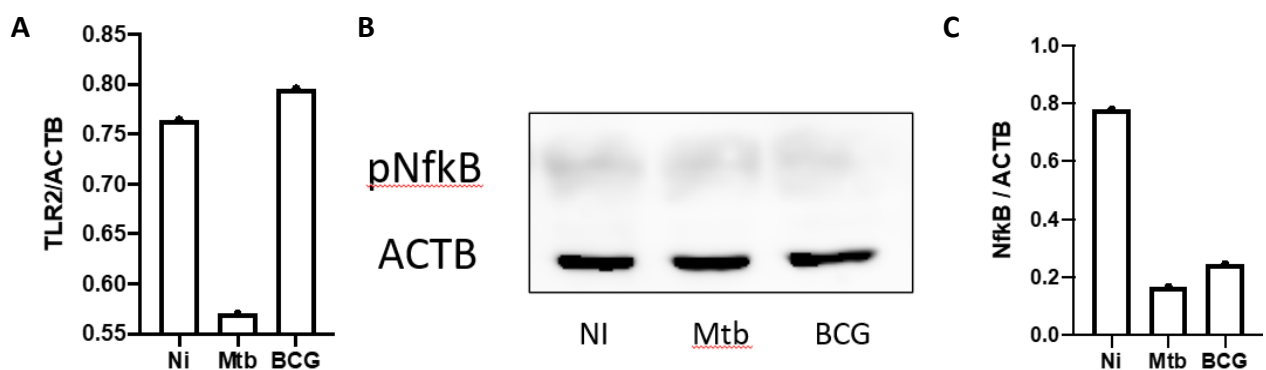
Figura 6 Alteração em marcadores de superfície em células dendríticas pré-incubadas com vesículas extracelulares



Vesículas extracelulares liberadas por monócitos infectados com BCG ou Mtb foram incubadas com células dendríticas por 12h. Por citometria de fluxo, foram avaliadas a expressão de marcador MHC-II (A) e CD86 (B). Por rtPCR foi analisada a expressão de mRNA para TLR2 (n=6) (C), TLR4 (n=6) (D) e CCR7 (n=6) (E). Foi utilizado método estatístico One-Way ANOVA e as diferenças estatisticamente significativas foram demonstradas com um asterisco (*) para o p valor <0.05 e com dois asteriscos (**) para o p valor <0.01.

A fim de analisar o efeito da baixa expressão dos genes dos marcadores de superfície TLR2, TLR4 e CCR7 na produção de proteínas marcadoras da ativação celular, foi avaliada a expressão de NFκB fosforilado, fator de transcrição relacionado à produção de citocinas, bem como a expressão do próprio TLR2. As células dendríticas, previamente tratadas com vesículas provenientes dos monócitos infectados, foram estimuladas com Mtb heat killed, para que houvesse o devido estímulo ativador. A baixa expressão gênica de TLR2 foi confirmada por Western blot, demonstrando uma redução em sua produção por células dendríticas tratadas com vesículas extracelulares de monócitos infectados com Mtb (Figura 7). Também foi observada uma baixa fosforilação de NFκB, o que possivelmente pode indicar o efeito da redução dos TLRs (Figura 7).

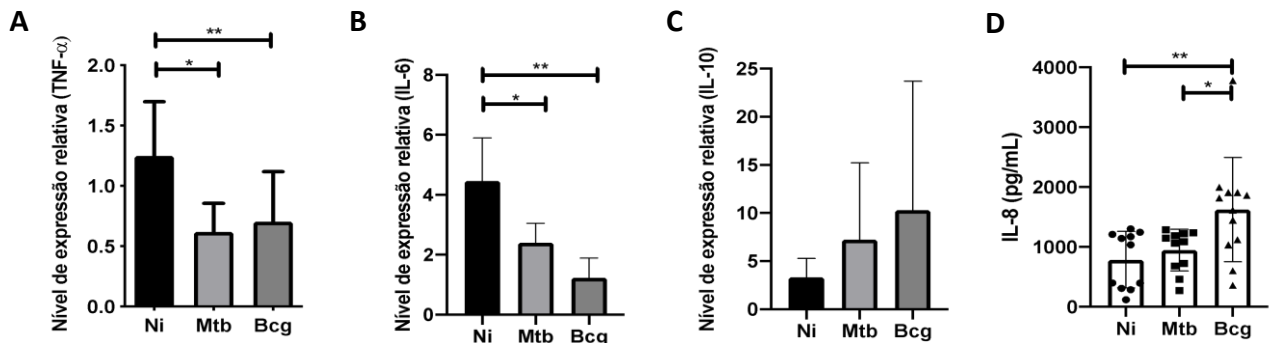
Figura 7 Expressão de TLR2 e pNFκB por células dendríticas estimuladas com vesículas extracelulares de monócitos infectados



Células dendríticas foram incubadas com vesículas extracelulares de monócitos previamente infectados com Mtb ou BCG. Após 12 horas, foram estimuladas com Mtb heat killed por 4h, e posteriormente o extrato das células foi avaliado por western blot quanto a presença de TLR2, pNFκB, e ACTB como controle. Relação de expressão de TLR2 por ACTB (n=3) (A); Western blotting para fosforilação do fator de transcrição NFκB (n=3) (B); Relação da quantidade de pNFκB por ACTB (n=3) (C).

Com o objetivo de analisar o efeito funcional das reduções observadas anteriormente, algumas citocinas importantes para ativação foram quantificadas. Nas células incubadas com vesículas advindas de monócitos infectados com BCG ou Mtb, houve redução na expressão gênica de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Figura 8), no entanto, não houve alteração na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 8). Quanto à produção de citocinas no sobrenadante, observou-se aumento na produção de IL-8 apenas nas células incubadas com vesículas extracelulares provenientes de células infectadas com BCG, demonstrando possível modulação causada pelas vesículas extracelulares oriundas de células infectadas com Mtb (Figura 8).

Figura 8 Produção de citocinas por células dendríticas tratadas com vesículas extracelulares.

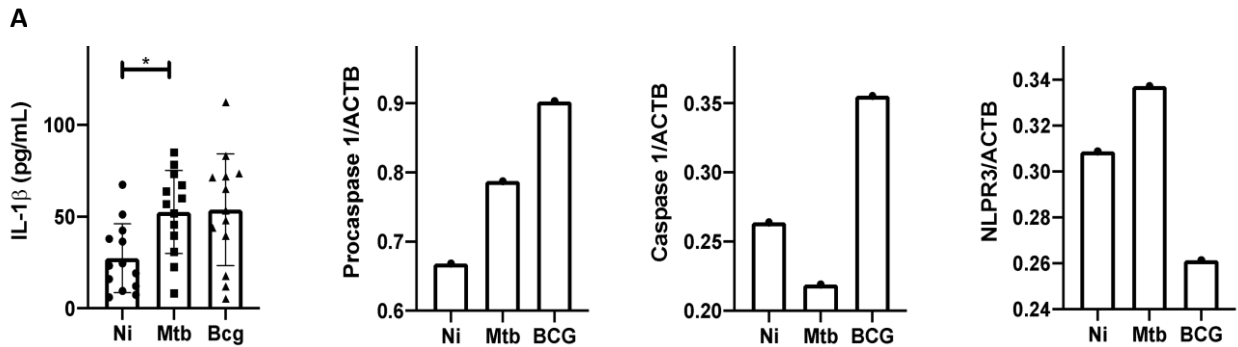


Células dendríticas tratadas com vesículas extracelulares por 12h foram analisadas quanto a expressão gênica de TNF- α (n=6) (A), IL-6 (n=6) (B) e IL-10 (n=6) (C). No sobrenadante foi realizada a quantificação da produção de IL-8 por ELISA (n=11) (D). Os dados apresentados em barras demonstram a média e o desvio padrão de cada grupo. Foi utilizado método estatístico One-Way ANOVA e as diferenças estatisticamente significativas foram demonstradas com um asterisco(*) para o p valor <0.05 e com dois asteriscos (**) para o p valor <0.01.

Houve, em contrapartida, aumento na produção de IL-1 β por células estimuladas com vesículas extracelulares provenientes de monócitos infectados com Mtb ou BCG; no entanto, a disposição de caspase 1 e NLPR3 foram diferentes entre as células que receberam vesículas extracelulares de Mtb e BCG. A diferença entre os grupos denota uma possível alteração quanto ao mecanismo de produção de IL-1 β , sendo que nas células que recebem vesículas de Mtb, a

formação de IL-1 β parece ser pela via canônica de ativação dos inflamassomos; e as que recebem de BCG, possivelmente são independentes de inflamassomo (Figura 9).

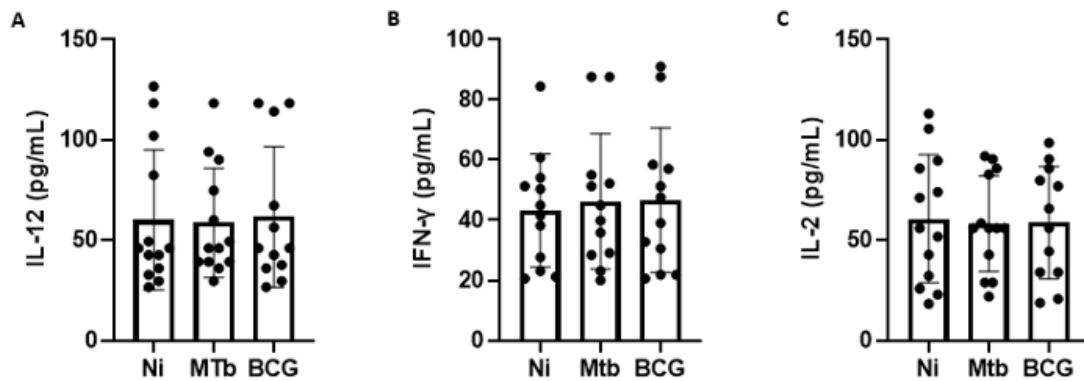
Figura 9 Produção de IL-1 β e ativação de inflamassomas por células dendríticas estimuladas com vesículas extracelulares de monócitos infectados



Células dendríticas foram incubadas com vesículas extracelulares de monócitos previamente infectados, com Mtb ou BCG, ou não infectados. Após 12 horas, foram estimuladas com Mtb heat killed por 4h, e posteriormente no sobrenadante das culturas foi avaliada a presença de IL-1 β e o lisado celular, avaliado quanto a presença de Procaspase 1, caspase 1, NLPR3 e ACTB, que foi utilizado como controle. A expressão de IL-1 β foi quantificada no sobrenadante por ELISA (n=13) (A); Pool de 3 amostras que foram submetidas ao mesmo estímulo foram analisadas por meio da técnica de Western blot. Foi determinada a expressão de Procaspase 1 (n=3) (B); Caspase 1 (n=3) (C) e NLPR3 (n=3) (D). Os dados apresentados em barras demonstram a média e o desvio padrão de cada grupo. Foi utilizado método estatístico One-Way ANOVA e as diferenças estatisticamente significativas foram demonstradas com um asterisco(*) para o p valor <0.05 e com dois asteriscos (**) para o p valor <0.01.

Como as células dendríticas são importantes células apresentadoras de antígenos e ativadoras da resposta imune adaptativa, buscamos avaliar qual o papel das vesículas extracelulares em modular o contexto de ativação da resposta imune do tipo Th1. Para isso avaliamos a produção das citocinas IL-12, IFN- γ e IL-2, consideradas o terceiro sinal de ativação na sinapse imunológica. Observamos que as células dendríticas, quando estimuladas com as vesículas de Mtb ou BCG e posteriormente desafiadas com Mtb morto por calor, produziram a mesma quantidade destas citocinas em relação às células dendríticas controle. (Figura 10).

Figura 10 Citocinas IL-12, IFN- γ e IL-2, liberadas por células dendríticas estimuladas com vesículas extracelulares de monócitos infectados.

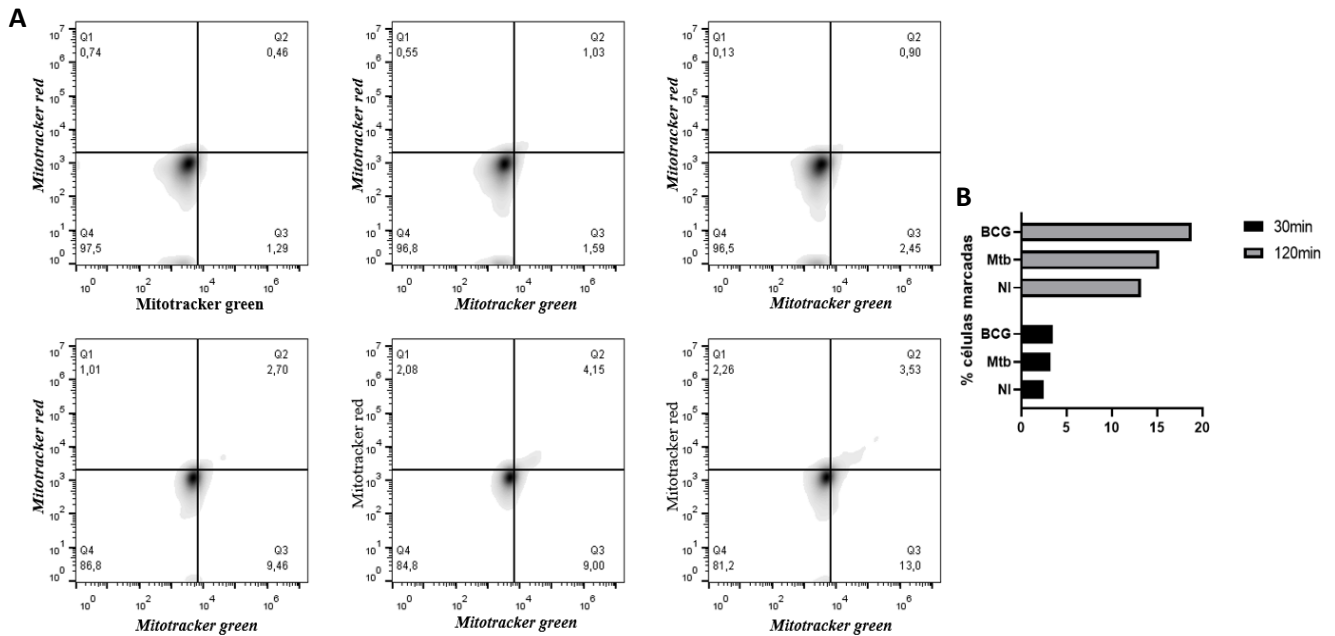


Células dendríticas foram incubadas com vesículas extracelulares de monócitos previamente infectados com Mtb ou BCG. Após 12 horas, foram estimuladas com Mtb heat killed por 4h, e posteriormente no sobrenadante das culturas foi avaliada a presença de IL-12 (n=12) (A); IFN- γ (n=12) (B) e IL-2 (n=12) (C). A inativação do Mtb por calor foi realizada em banho-maria a 80°C por 25 minutos. Os dados apresentados em barras demonstram a média e o desvio padrão de cada grupo. Foi utilizado método estatístico One-Way ANOVA e as diferenças estatisticamente significativas foram demonstradas com um asterisco(*) para o p valor <0.05 e com dois asteriscos (**) para o p valor <0.01.

4.3 Identificação da transferência de mitocôndrias, transportadas em vesículas, para células dendríticas

A fim de identificar a presença de mitocôndrias sendo transferidas por vesículas, monócitos foram tratados com Mitotracker verde e vermelho, que servem como corantes específicos para mitocôndrias, e foram infectados com Mtb ou BCG. Após a cultura de infecção, as vesículas foram isoladas para incubação com as células dendríticas. Na Figura 11, podemos observar que as células dendríticas, após receberem as vesículas dos monócitos, apresentaram índice crescente de fluorescência, tanto em 30 quanto em 120 minutos, o que demonstra que as vesículas estavam carregando mitocôndrias ou parte delas (Figura 11). Foi possível notar que as vesículas advindas de células infectadas, Mtb ou BCG, elevaram o índice de fluorescência nas células dendríticas quando comparadas às vesículas de células não infectadas (Figura 11).

Figura 11 Transporte de mitocôndrias por vesículas extracelulares isoladas de células infectadas com Mtb.

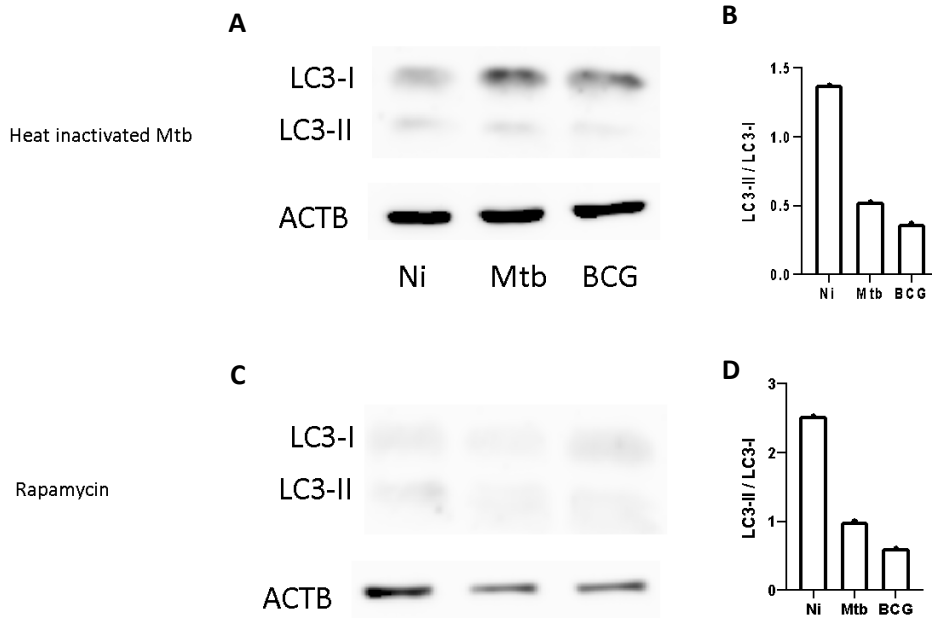


Monócitos foram marcados com Mitotracker verde e vermelho, e posteriormente foram infectados ou não com Mtb e BCG; após 12h as vesículas foram isoladas. Vesículas, provenientes de monócitos marcados, foram cultivadas com células dendríticas e a presença de fluorescência de mitotracker foi avaliada após 30 e 120 minutos de incubação, eixo x Mitotracker green e eixo y Mitotracker red (A); Representação gráfica da marcação de mitotracker em células dendríticas que receberam vesículas de monócitos (B).

4.4 Avaliação da autofagia de células dendríticas cultivadas com vesículas

Tendo em vista as modificações funcionais das células dendríticas causadas pelas vesículas extracelulares provenientes de células infectadas, foi analisado o mecanismo de autofagia, que é notoriamente descrito na literatura como o mecanismo mais eficaz para eliminação da Mtb intracelular. As células tratadas com vesículas extracelulares foram submetidas a estímulos de autofagia (Rapamycin e Mtb inativada por calor) e avaliadas quanto à proporção de LC3-II por LC3-I, que evidenciou a redução na capacidade de autofagia pelas células que receberam vesículas extracelulares de células infectadas, mostrando um possível mecanismo de virulência (Figura 12).

Figura 12 Índice de autofagia em células dendríticas tratadas com vesículas extracelulares.



Células dendríticas tratadas por 12 h com vesículas extracelulares provenientes de monócitos infectados foram estimuladas com rapamycin e heat killed Mtb por 4h para análise do índice de autofagia por Western blot, pela relação entre a expressão de LC3.-I e LC3-II. Pool de 3 amostras submetidas ao mesmo estímulo foram submetidos a Western blot. Western blot de LC3 de células que foram estimuladas com Mtb inativada por calor (A); Representação gráfica da relação de LC3-I por LC3-II de células que foram estimuladas por Mtb inativada por calor (B); Western blot de LC3 de células que foram estimuladas com Rapamicina (C); Representação gráfica da relação de LC3-I por LC3-II de células que foram estimuladas com Rapamicina (D). A inativação do Mtb por calor foi realizada em banho-maria a 80°C por 20 minutos. O pool para realização do Westernblot foi constituído com n=3.

4.5 Quantificação da formação e acúmulo de corpúsculos lipídicos em células dendríticas cultivadas com vesículas

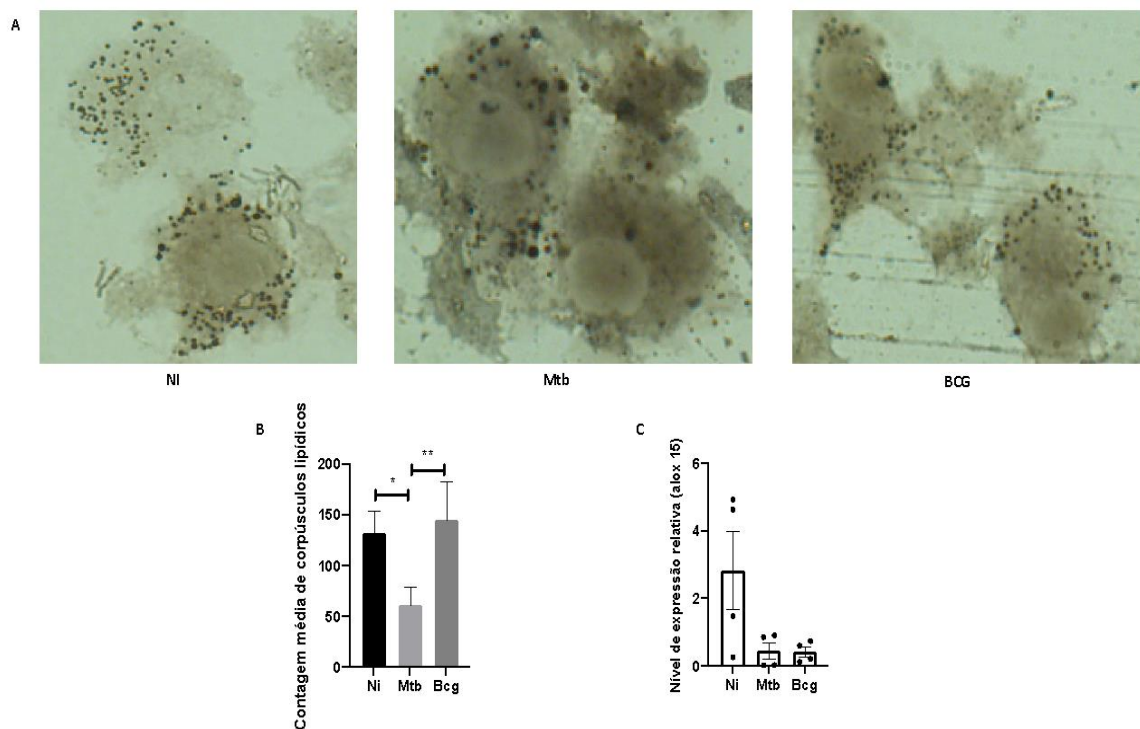
Além da produção de citocinas, a presença de corpúsculos lipídicos é um indicador utilizado para entendimento do armazenamento das fontes de prostaglandinas e, conseqüentemente, para o entendimento da resposta imunológica em células infectadas. A formação de corpúsculos lipídicos nas células que recebem vesículas extracelulares foi analisada por coloração por ósmio. As células que receberam vesículas de monócitos infectados com Mtb tiveram uma redução significativa no acúmulo de corpúsculos lipídicos em seus citoplasmas em relação às células controle ou as que receberam vesículas de culturas de

monócitos infectados com BCG (

Figura 13). Houve também uma redução significativa no nível de expressão de RNA de alox 15, enzima responsável pela produção dos corpúsculos (

Figura 13).

Figura 13 Contagem da média de corpúsculos lipídicos em células dendríticas.



Células dendríticas tratadas por 12h com vesículas extracelulares provenientes de macrófagos infectados foram estimuladas com Mtb para calcular o acúmulo de corpúsculos lipídicos em seu citoplasma por coloração com ósmio (A); Representação gráfica da média da contagem dos corpúsculos em 20 campos (B); Nível de expressão gênica do gene Alox 15 (n=4) (C). Os dados apresentados em barras demonstram a média e o desvio padrão de cada grupo. Foi utilizado método estatístico One-Way ANOVA e as diferenças estatisticamente significativas foram demonstradas com um asterisco(*) para o p valor <0.05 e com dois asteriscos (**) para o p valor <0.01.

DISCUSSÃO

5 Discussão

Ao invadir o hospedeiro pelas vias aéreas, o Mtb entra nos alvéolos e infecta primeiramente os macrófagos alveolares residentes utilizando receptores como DC-SIGN, lectina ligante de manose, molécula de adesão ICAM-3, CD14, proteína surfactante A, receptores de complemento e a maquinaria de fagocitose (ERNST, 1998; SHALER et al., 2012). No entanto, os macrófagos são incapazes de eliminar o bacilo, que se mantém vivo no seu citoplasma utilizando diversas estratégias para evitar sua degradação, principalmente evitando a formação de óxido nítrico e a fusão do fagolisossomo (EHRT; SCHNAPPINGER, 2009). Os bacilos, pouco tempo após serem fagocitados, escapam para o citoplasma para se manterem vivos e evitar a resposta dos macrófagos (JAMWAL et al., 2016).

A resposta protetora contra o *Mycobacterium tuberculosis* depende da resposta proveniente de linfócitos T CD4, que ao secretarem IFN- γ induzem a produção de TNF- α por macrófagos e os auxilia na produção de radicais capazes de eliminar o Mtb (LILLEMEIER et al., 2006; MOGUES et al., 2001). Esse fenômeno é comprovado pela simples transferência dessas células, que, quando feitas após 5 dias de infecção, são capazes de induzir proteção total contra a doença (ORME, 1987).

No entanto, a resposta imune adaptativa na infecção por Mtb é extremamente atrasada quando comparada a outros patógenos, demorando cerca de 12 dias após a infecção por inalação para o aparecimento de células T antígeno específicas nos pulmões (CHACKERIAN et al., 2002). O atraso na montagem da resposta de célula T CD4 ao Mtb deve-se à deficiência na

migração das células dendríticas ao linfonodo, fazendo com que a resposta só seja montada quando a bactéria é drenada pelas vias linfáticas até o linfonodo, cerca de 9 dias depois da infecção (WOLF et al., 2008). O fato de que a resposta por células T é imprescindível para o controle da infecção, e que a necessidade de uma resposta rápida e sem atraso é comprovadamente benéfica para o combate do patógeno (BOZZANO; MARRAS; MARIA, 2014; WINSLOW et al., 2008), fez com que o estudo desse fenômeno fosse necessário.

Vesículas extracelulares são essenciais na comunicação célula-célula, muitas vezes exercendo papéis fundamentais na ativação do sistema imune para a resolução de doenças, mas podem também ter um papel deletério, modulando a resposta imune de forma a favorecer mecanismos de susceptibilidade. Neste trabalho, buscamos avaliar como vesículas extracelulares, liberadas por células infectadas pela *M. tuberculosis*, poderiam participar da ativação de células dendríticas, células fundamentais para a apropriada indução da resposta imune adaptativa.

Com a chegada do bacilo no epitélio pulmonar, os macrófagos alveolares são as primeiras células a serem infectadas. Posteriormente migram para o parênquima pulmonar e, por fim, funcionam como reservatório para o crescimento do bacilo (COHEN et al., 2019; COOPER, 2009), que, enquanto isso, poderiam liberar vesículas extracelulares que potencialmente seriam incorporadas por células ainda não infectadas, como as células dendríticas. Com o objetivo de esclarecermos essa pergunta, vesículas extracelulares foram purificadas de monócitos humanos que foram infectados *in vitro* por *Mtb*, e foram comparadas aos grupos controles, sendo eles o grupo infectado com BCG e o grupo não infectado. As vesículas foram inicialmente identificadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3); também foi realizada a técnica de nanosight para determinar tamanho e concentração por amostra (Figura 4); e, por fim, as vesículas foram identificadas pelo seu marcador consolidado na literatura, ALIX (Figura 5). De forma geral, vesículas extraídas de

monócitos infectados com *Mtb* apresentavam maior tamanho, aproximadamente 100 nanômetros maiores que vesículas de monócitos não infectados ou infectados com BCG (Figura 4). O crescimento das vesículas poderia indicar aumento na concentração de moléculas secretadas ou no tipo de estrutura carregada.

Uma das principais funções das células da imunidade inata é ativar a imunidade adaptativa. Esse papel é dependente da apresentação de antígenos com a devida coestimulação e liberação de citocinas. Esse processo demanda que as células apresentadoras de antígenos estejam ativadas, e que haja expressão devida das moléculas apresentadoras de antígeno e coestimuladoras. Em nossos resultados, notamos que as vesículas advindas de monócitos infectados com *Mtb* induziam aumento significativo na capacidade da célula dendrítica em expressar na sua superfície o MHC de classe II; no entanto, não houve aumento na capacidade de coestimular, com o receptor CD86 se mantendo igual entre os grupos (Figura 6). Diversos autores já descreveram a deficiência das células infectadas com *Mtb* em expressar o MHC-II (DE JONG et al., 1998; GERCKEN, et al., 1994; NOSS et al., 2001). Foi descrito que, via ativação de TLR2, por meio de uma lipoproteína, o *Mtb* é capaz de inibir a expressão de MHC-II (NOSS et al., 2001). Também já foi descrito que o bacilo causador da tuberculose bovina, por impedir a fusão do lisossomo, tende a diminuir a expressão de MHC-II na superfície de macrófagos e células dendríticas; no entanto, é discutido o potencial de retomar a expressão de MCH-II com adjuvantes agonistas de TLR7 e TLR9 (BAKHURU et al., 2014). No entanto, em um estudo publicado em 2018, foi descrito que a proteína Acr-1, ao entrar em contato com monócitos, leva à modulação imunológica, ocasionando a redução na expressão de MHC-II e moléculas coestimuladoras como CD-86 (MUBIN et al., 2018).

Entre a gama de receptores para moléculas derivadas de patógenos, que auxiliam as células dendríticas a se ativarem e a amadurecerem após o contato com o agente infeccioso, os

TLR têm grande importância. Na infecção por Mtb, sob este aspecto, os TLR2 e TLR4 são destacados pela importância no reconhecimento da bactéria e das vias que são ativadas. A sinalização por TLR2 está ligada à indução de apoptose em macrófagos infectados, e a sinalização por TLR4 é importante para impedir a necrose dessas células (SÁNCHEZ et al., 2010). Em nosso estudo, foi identificado que as vesículas isoladas de monócitos infectados com Mtb induziram redução na expressão gênica de receptores TLR2 e TLR4 (Figura 6), o que posteriormente foi confirmado por Western blotting para TLR2 (Figura 7). Além disso, após receberem vesículas de células infectadas, apenas as células que receberam vesículas de BCG tiveram aumento na expressão de CCR7 (Figura 6), o que demonstra, de certa forma, que as vesículas de Mtb não induziram a ativação e a maturação das células dendríticas. CCR7 é o receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21, que promovem a migração das células dendríticas até o linfonodo, para que possam apresentar antígenos e ativar as células T. A diminuição na expressão desses receptores implica diretamente na capacidade de ativação das células imunológicas e capacidade de secreção de citocinas pelas células dendríticas (GRASSIN-DELYLE et al., 2020; JUAREZ et al., 2010; KAWASAKI; KAWAI, 2014; YANG; PANG; MOSES, 2010).

O estímulo via receptores TLR2 e TLR4 induz a ativação de uma cascata de sinalização que leva até a fosforilação de NFκB, e também ativa enzimas responsáveis por clivar o pró-TNF em TNF-α (CALDWELL et al., 2014). O TNF-α produzido pela célula atua também de maneira autócrina, que por sua vez induz à fosforilação de NFκB e ativação imunológica (CALDWELL et al., 2014). Após observarmos a diminuição dos receptores TLR, buscamos investigar o índice de fosforilação de NFκB. Constatamos a diminuição na fosforilação deste fator de transcrição, que possivelmente está diminuído devido à menor capacidade de ativação das células dendríticas (Figura 7). Foi demonstrado na literatura que uma das proteínas do Mtb – Rv0927c – é capaz de inibir a expressão gênica de citocinas como IL-6 e TNF- α. Além disso,

essa proteína é capaz de inibir a ativação da via do NFκB (XIA et al., 2021). Nas infecções em camundongos, ao nocautear NFκB, tem-se uma resposta ao Mtb muito prejudicada, levando a sérias lesões pulmonares e ao baixo controle da infecção por micobactéria (YAMADA et al., 2001).

Durante a infecção por Mtb, a redução na fosforilação de NFκB está diretamente relacionada à baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8 (HUANG et al., 2014). A redução dos meios necessários para ativação das células dendríticas e a baixa fosforilação de NFκB, quando estimuladas, levaram conseqüentemente à redução significativa na expressão de citocinas como TNF-α, IL-6 e IL-8 (Figura 8). É atualmente conhecido que um dos fatores de virulência do Mtb – fator de resposta ao stress SigH – altera o funcionamento das células da imunidade inata, levando à diminuição na produção de IL-6, que por sua vez leva à menor ativação imunológica e acarreta atraso na produção de IFN-γ e maior expressão de IFN-I (MARTINEZ; MEHRA; KAUSHAL, 2013; SAUNDERS et al., 2000). A indução da expressão de IFN do tipo 1 está diretamente relacionada com a progressão da doença, que, dentre outros efeitos, leva à redução na capacidade migratória de células da imunidade inata para os linfonodos (DONOVAN et al., 2017; DORHOI et al., 2014). O IFN do tipo 1, por meio do STAT1, inibe a expressão de CCR7 nas células dendríticas, o que afeta diretamente na capacidade migratória dessas células (YEN; KONG; GANEA, 2010). Esses efeitos são possivelmente ocasionados por uma série de fatores de virulência do Mtb. Em um trabalho de 2021, foi demonstrado que uma proteína exclusiva do *Mycobacterium tuberculosis* era capaz de reduzir significativamente a expressão de citocinas em macrófagos infectados, citocinas importantes para a ativação celular, como IL-6 e TNF-α (XIA et al., 2021).

A IL-1β tem papel protetor na infecção por Mtb, sendo de suma importância no recrutamento de moléculas que geram ação microbicida e auxiliando no aumento da sinalização

de TNF (JAYARAMAN et al., 2013). Em nossos resultados, foi encontrado um aumento significativo na produção de IL-1 β nas células dendríticas que recebiam vesículas de monócitos infectados com Mtb, demonstrando um possível sinal auxiliador da resposta imunológica exercido pelas vesículas (Figura 9). No entanto, um dos motivos da susceptibilidade ao Mtb, mesmo com a produção de IL-1 β por parte do hospedeiro, é a ativação da via dos IFN do tipo 1, que são responsáveis pelo aumento na produção do antagonista do receptor de IL-1 β , que por fim neutraliza a ação microbicida gerada pelo estímulo de IL-1 β nas células da imunidade inata (JI et al., 2019). A possível indução da expressão dos IFN do tipo 1 serão avaliadas em experimentos futuros.

Apesar da maior quantidade de NLRP3 nas células que receberam vesículas de monócitos infectados com Mtb, a quantidade de caspase 1 clivada é inferior aos dois outros grupos, o que sugere uma possível via alternativa na geração de IL-1 β (Figura 9). Já foi descrito que a infecção por Mtb nas células dendríticas leva a uma via parcialmente independente de caspase 1, mas não independente de NLRP3 (ABDALLA et al., 2012), o que explica a baixa clivagem de caspase 1, mesmo com grande produção de IL-1 β e alta presença de constituintes do inflamassoma (Figura 9). Devido à baixa clivagem de caspase 1, presume-se baixa atividade do inflamassoma, o que pode ser causado por uma estimulação das vias dos IFN do tipo 1, que têm a característica de reduzir a atividade dos inflamassomas de NLRP3 (GUARDA et al., 2011; KADER et al., 2021). A caspase 1 também é importante durante o processo de ativação de cascatas de sinalização que desencadeiam a fosforilação de NF-kB (DANELISHVILI et al., 2012). A redução nos índices de caspase 1 nas células que receberam vesículas de células estimuladas com Mtb pode ser mais um dos fatores que explicam a baixa fosforilação de NF-kB nesse grupo (Figura 7 e Figura 9).

Ao notar a redução dos receptores de ativação e da fosforilação do NF-kB, buscamos avaliar se a produção das citocinas relacionadas à ativação da resposta Th1 – IL-12, IFN- γ e

IL-2 – estavam prejudicadas nas células dendríticas que recebiam vesículas de células infectadas com Mtb. No entanto, não conseguimos observar diferença na produção dessas citocinas (Figura 10).

Apesar de a resposta adaptativa, principalmente o IFN- γ , ser muito importante no enfrentamento ao Mtb, não é possível controlar a infecção sem ampla resposta de TNF- α , IL-1 e IL-6 (ZENG; ZHANG; CHEN, 2018). Além disso, autores relatam que o índice de migração de linfócitos para o pulmão é mais importante que a magnitude da resposta Th1 (SHAFIANI et al., 2010).

A ativação das vias de IFN do tipo 1 na infecção por Mtb acontece tanto pelo DNA bacteriano, que é reconhecido no citoplasma da célula infectada, como pelo stress mitocondrial nas células infectadas (LÚCIA MOREIRA-TEIXEIRA et al., 2018). É conhecido que a infecção por Mtb é responsável pela permeabilização das mitocôndrias das células infectadas, e que esse efeito é um dos fatores responsáveis pela indução da necrose dos monócitos infectados (DUAN et al., 2002). Nesse âmbito, buscamos entender se, de alguma forma, as vesículas poderiam estar transportando algum constituinte que ativasse a via dos IFN do tipo 1. É notável que as vesículas podem transportar em seu interior DNA e as outras classes de material genético, e que, dessa forma, podem atuar como moduladores da resposta imunológica (ROBBINS; MORELLI, 2014). Recentemente descobriu-se também a capacidade dos monócitos ativados de enviarem suas mitocôndrias via vesículas extracelulares (PUHM et al., 2019). Sabendo disso, sugerimos que os monócitos infectados com Mtb poderiam estar enviando em suas vesículas mitocôndrias já sensibilizadas pelo stress causado pela infecção, que poderiam servir como ativadores da via de IFN do tipo 1. Por meio de citometria de fluxo, determinamos que as mitocôndrias eram transportadas via vesículas quando, ao isolar vesículas de monócitos marcados com mitotracker e cultivá-las com células dendríticas, observamos o aumento gradual da marcação das células dendríticas com o mitotracker, mostrando assim a

presença de mitocôndrias marcadas no interior dessas células e confirmando a transmissão via vesículas extracelulares (Figura 11). As células dendríticas, diferentemente dos macrófagos, têm aumentada a quantidade dos receptores TLR7 e TLR9, que não reconhecem DNA próprio, mas reconhecem regiões CpG de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* e DNA mitocondrial (NGUYEN; GAZY; VENKETARAMAN, 2020). Células dendríticas, ao serem incubadas com vesículas contendo DNA mitocondrial, ativam a via de C-Gas e STING e, conseqüentemente, têm priorizada a produção de IFN do tipo 1 (TORRALBA et al., 2018). Do mesmo modo, o reconhecimento de DNA no citoplasma promove a estruturação do inflamassomo (WASSERMANN et al., 2015), o que explica o aumento dessa estrutura nas células que receberam vesículas de Mtb (Figura 9).

Os receptores do tipo TLR, além de cumprirem um importante papel na ativação das células da imunidade inata, também induzem, por sua via de sinalização, a morte celular por autofagia. O TLR2, por exemplo, já foi descrito pela sua capacidade de induzir a ativação da via de autofagia, e com isso levar à eliminação de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (ANAND et al., 2011; FANG et al., 2014). Já na infecção por Mtb, tanto o TLR2 quanto o TLR4 cumprem o papel de induzirem a autofagia para o controle da infecção (FANG et al., 2014; PADHI et al., 2019). Contudo, o Mtb, por meio de seus fatores de virulência, é capaz de reduzir a expressão desses receptores para impedir a autofagia (PADHI et al., 2019). Além do controle da ativação dos receptores do tipo TLR, a micobactéria é capaz de controlar a autofagia através de seus fatores de virulência, como a proteína Cpsa, e dessa forma impedir a principal forma de eliminação do patógeno no meio intracelular (KÖSTER et al., 2017).

Desta forma, a redução na expressão de TLR2 e TLR4 em células dendríticas estimuladas com vesículas de monócitos infectados com Mtb (Figura 6) sugere que a autofagia poderia estar reduzida também. Assim, investigamos o processo autofágico. Após cultura das

células dendríticas com vesículas isoladas de monócitos infectados com Mtb por 12h, as células dendríticas receberam dois estímulos indutores de autofagia, rapamicina e Mtb morta por calor; em ambos os casos o índice de autofagia foi drasticamente reduzido (Figura 12), demonstrando portanto, que as vesículas extracelulares derivadas de monócitos infectados com Mtb são capazes de modular a autofagia de células adjacentes, o que poderia prejudicar sua capacidade de eliminação do patógeno.

Os corpúsculos lipídicos são vesículas citoplasmáticas de importância imunológica, eles armazenam lipídios em seu interior e funcionam como fonte produtora de prostaglandinas e leucotrienos durante o processo inflamatório (SAKA; VALDIVIA, 2012). Avaliamos se as vesículas provenientes de células infectadas trariam alguma modificação na formação de corpúsculos lipídicos pelas células dendríticas estimuladas. Por meio da técnica de coloração por ósmio, encontramos uma redução significativa no armazenamento dessas organelas nas células dendríticas que receberam vesículas de monócitos infectados por Mtb (

Figura 13). Acreditava-se que a formação de corpúsculos lipídicos era prejudicial para a célula hospedeira, por funcionar como fonte de lipídeos para o crescimento do *mycobacterium* (PEYRON et al., 2008). No entanto, em 2018 foi descrito que os corpúsculos não só não funcionavam como fonte de lipídios para o Mtb, como também eram importantes para a ativação de uma resposta de IFN- γ eficiente e, conseqüentemente, maior controle da infecção. A enzima responsável pela geração de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos é denominada Alox-15 (WEIBEL et al., 2009). Alox-15 tem papel duplo nas inflamações, podendo estar relacionada ao desencadeamento de inflamações ou com sua resolução. No entanto, a enzima está diretamente relacionada com processos inflamatórios agudos, sua expressão se encontra aumentada em células do sistema imunológico em locais inflamados (ÇOLAKOĞLU; TUNÇER; BANERJEE, 2018). Nossos resultados sugerem uma possível

modulação na produção da enzima, mas deverá ser confirmado com outros experimentos (

Figura 13). Alox-15 faz parte do conjunto de enzimas necessárias para a produção de prostaglandina E2, que em sítios inflamatórios é responsável pelo controle da resposta imunológica (LOYNES et al., 2018). Durante a infecção por Mtb, a produção de prostaglandina E2 é reduzida e a lipoxina A4 é aumentada, fazendo com que a célula infectada se direcione para a necrose, o que permite que o Mtb escape da resposta imunológica (BEHAR; DIVANGAHI; REMOLD, 2010).

Além disso, a Alox-15 é importante para a recuperação tecidual e, também, para a migração de neutrófilos para o tecido inflamado (GRONERT et al., 2005). O aumento da expressão de Alox-15 tem relação direta com o aumento na produção de IL-8 (KUHN et al., 2016), o que corrobora com nosso resultado de redução na produção de IL-8 (Figura 8).

Portanto, nosso conjunto de dados aponta para o potencial imunomodulador das vesículas extracelulares provenientes de células infectadas por Mtb. Tendo em vista todas as modificações gênicas, morfológicas e funcionais observadas em células dendríticas, sugerimos que as vesículas extracelulares carregam em seu interior fatores de virulência, quais sejam, material genético, proteínas ou enzimas e constituintes celulares, como as mitocôndrias, que induzem nas células dendríticas um estado menos combativo à infecção quando comparado às células que não receberam essas vesículas, ou até mesmo com células estimuladas com vesículas provenientes de infecção com cepa não virulenta (BCG). Em resumo, nestas condições, as células dendríticas tiveram reduzida a expressão de receptores de reconhecimento de patógenos, e conseqüente redução na apresentação de antígeno e na ativação de vias intracelulares, que culminaram com a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e corpúsculos lipídicos. Este efeito foi correlacionado à ativação de inflamassomas e bloqueio

da autofagia. Assim, as vesículas extracelulares liberadas por monócitos infectados no sítio da infecção podem constituir importantes fatores na modulação da resposta à *M. tuberculosis*, e podem ser alvos de desenvolvimento de terapias imunomoduladoras na tuberculose.

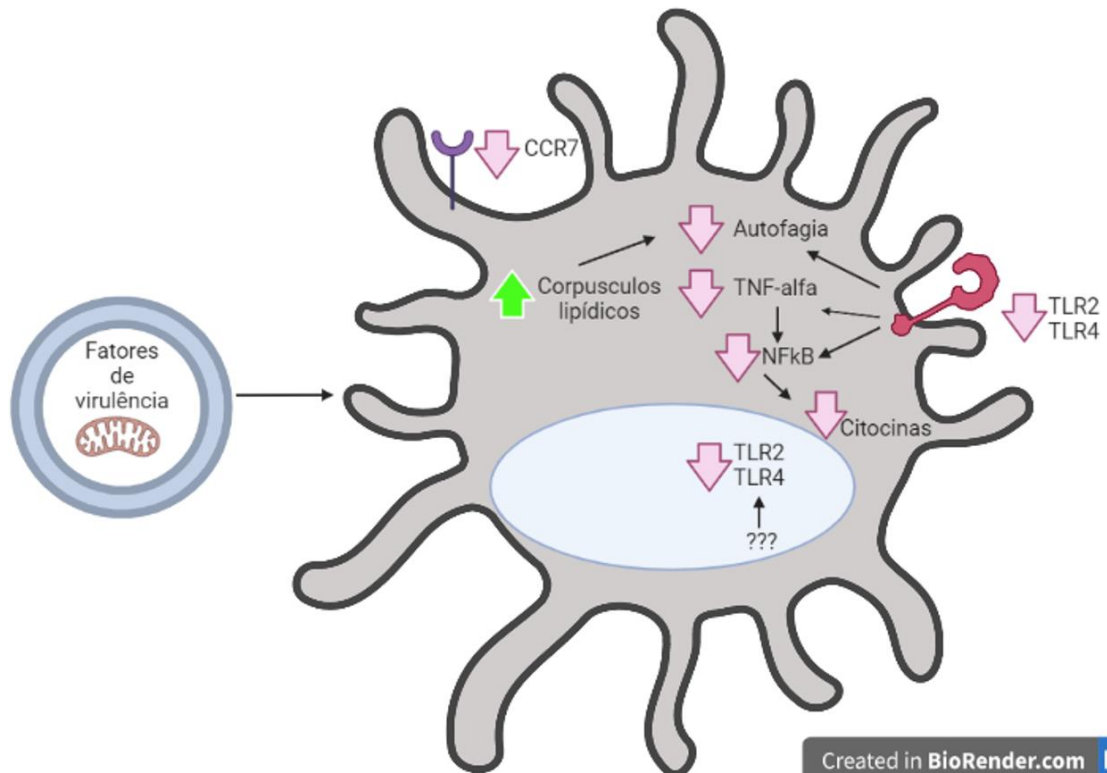
CONCLUSÃO

6 Conclusão

Vesículas extracelulares derivadas de monócitos infectados com *M. tuberculosis* induzem modulação da função de células dendríticas adjacentes, influenciando na indução de mecanismos efetores fundamentais para a ativação da resposta imune adaptativa, desde o reconhecimento da bactéria, passando pela apresentação de antígenos, produção de mediadores inflamatórios e autofagia.

Com a finalidade de representar os achados desse trabalho, os resultados encontrados foram resumidos na representação gráfica da Figura 14. Na figura, foram trazidas as modificações causadas pelas vesículas originárias de células infectadas por Mtb. A Figura 14, por meio do apanhado geral dos resultados, sugere a cadeia de acontecimentos que as vesículas originadas no início da infecção podem causar nas células dendríticas que ainda não tiveram contato com o Mtb.

Figura 14 Resumo dos resultados encontrados



Esquema gráfico demonstrando resumidamente os resultados obtidos no trabalho. As vesículas, advindas de células infectadas por Mtb, ao serem absorvidas pelas células dendríticas, induziram modificação na expressão e produção de diversas moléculas importantes para a resposta ao Mtb.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1 β and IL-18 secretion but not to pyroptosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.

ALLARD, B.; PANARITI, A.; MARTIN, J. G. **Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 31 jul. 2018.

ANAND, P. K. et al. TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of *Listeria monocytogenes* via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 42981–42991, 2011.

BAKHURU, P. et al. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. **Cellular Immunology**, v. 287, n. 1, p. 53–61, 2014.

BANCHEREAU, J. et al. IMMUNOBIOLOGY OF DENDRITIC CELLS. **Annu. Rev. Immunol**, v. 18, p. 767–811, 2000.

BEHAR, S. M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? (NIH public access manuscript). **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 668–674, 2010.

BOZZANO, F.; MARRAS, F.; MARIA, A. DE. Immunology of Tuberculosis. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, 2014.

BRANCHETT, W. J.; LLOYD, C. M. Regulatory cytokine function in the respiratory tract. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 3, p. 589–600, 2019.

- CAETANO, B. et al. Ligand – independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. v. 186, n. 11, 1997.
- CALDWELL, A. B. et al. Network dynamics determine the autocrine and paracrine signaling functions of TNF. **Genes and Development**, v. 28, n. 19, p. 2120–2133, 2014.
- CHACKERIAN, A. A. et al. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* Is Influenced by Host Factors and Precedes the Initiation of T-Cell Immunity. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4501–4509, 2002.
- COHEN, S. B. et al. Tuberculosis Niche and Initiate Dissemination. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 3, p. 439–446, 2019.
- ÇOLAKOĞLU, M.; TUNÇER, S.; BANERJEE, S. Emerging cellular functions of the lipid metabolizing enzyme 15-Lipoxygenase-1. **Cell Proliferation**, v. 51, n. 5, p. 1–14, 2018.
- COLEMAN, M. M. et al. Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 48, n. 6, p. 773–780, jun. 2013.
- COOK, G. M. et al. Physiology of mycobacteria. v. 55, n. 09, p. 1–77, 2013.
- COOPER, A. M. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 393–422, 2009.
- COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 252–260, 2011.
- DANELISHVILI, L. et al. Inhibition of the plasma-membrane-associated serine protease cathepsin G by *Mycobacterium tuberculosis* Rv3364c suppresses caspase-1 and pyroptosis in macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. JAN, 2012.

- DE JONG, G. et al. II Heterodimers Class Intracellular Sequestration of Immature Is Related to *Mycobacterium tuberculosis* Mononuclear Phagocytes Infected with Attenuation of HLA-DR Expression by. **Journal of Immunology**, v.161n n. 9, 1 Nov. 1998
- DEMANGEL, C.; BERTOLINO, P.; BRITTON, W. J. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC) -derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 994–1002, 2002.
- DIEU, B. M. et al. Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 2, p. 373–386, 1998.
- DONOVAN, M. L. et al. **Type I interferons in the pathogenesis of tuberculosis: Molecular drivers and immunological consequences.** **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 27 nov. 2017.
- DORHOI, A. et al. Type I IFN signaling triggers immunopathology in tuberculosis-susceptible mice by modulating lung phagocyte dynamics. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 8, p. 2380–2393, 2014.
- DUAN, L. et al. Critical Role of Mitochondrial Damage in Determining Outcome of Macrophage Infection with *Mycobacterium tuberculosis* . **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5181–5187, 1 nov. 2002.
- EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defense against host stresses. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 8, p. 1170–1178, 2009.

EKEN, C. et al. Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Ectosomes Interfere with the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 2, p. 817–824, 2008.

ERNST, J. D. Macrophage Receptors for Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1277–1281, 1998.

FANG, L. et al. TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in Staphylococcus aureus-stimulated RAW264.7 cells. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 4, p. 806–814, 2014.

FENTON, M. J.; VERMEULEN, M. W. Immunopathology of Tuberculosis : Roles of Macrophages and Monocytes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 683–690, 1996.

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

GERCKEN, J. et al. **Defective Antigen Presentation by Mycobacterium tuberculosis-Infected Monocytes** **INFECTION AND IMMUNITY**. [s.l: s.n.].

GIRI, P. K.; SCHOREY, J. S. Exosomes Derived from M . Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4 + and CD8 + T Cells In Vitro and In Vivo. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p. 1–10, 2008.

GRASSIN-DELYLE, S. et al. The Role of Toll-Like Receptors in the Production of Cytokines by Human Lung Macrophages. **Journal of Innate Immunity**, v. 12, n. 1, p. 63–73, 2020.

GRONERT, K. et al. A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 15267–15278, 2005.

GROSSET, J. **Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: An underestimated adversary.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3 mar. 2003.

GUARDA, G. et al. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity*, v. 34, n. 2, p. 213–223, 2011.

GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C. et al. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunological Reviews*, v. 251, n. 1, p. 125–142, 2013.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, v. 159, p. 635–643, 1997.

HOSSEINKHANI, B. et al. Extracellular vesicles work as a functional inflammatory mediator between vascular endothelial cells and immune cells. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. 1789, p. 1–13, 2018.

HU, G.; CHRISTMAN, J. W. **Alveolar macrophages in lung inflammation and resolution.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 1 set. 2019.

HUANG, K. H. et al. NF- κ B repressing factor downregulates basal expression and mycobacterium tuberculosis induced IP-10 and IL-8 synthesis via interference with NF- κ B in monocytes. *Journal of Biomedical Science*, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2014.

HUNTER, R. L. **The pathogenesis of tuberculosis: The early infiltrate of post-primary (adult pulmonary) tuberculosis: A distinct disease entity.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 19 set. 2018.

HUSSELL, T.; BELL, T. J. **Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context.** *Nature Reviews Immunology*, fev. 2014.

IFRIM, D. C. et al. Trained immunity or tolerance: Opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 4, p. 534–545, 2014.

JAMIE D. K. WILSON. **The lungs at the frontlines of immunity**. **Nature Immunology** Nature Publishing Group, , 18 dez. 2015.

JAMWAL, S. V. et al. Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

JAYARAMAN, P. et al. IL-1 β Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and caspase-3 activation. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 4196–4104, 2013.

Jl, D. X. et al. Type I interferon-driven susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by interleukin-1 receptor antagonist IL-1Ra. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2128–2135, 2019.

JIAO, X. et al. Dendritic Cells Are Host Cells for *Mycobacteria* In Vivo That Trigger Innate and Acquired Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 1294–1301, 2002.

JO, E. K. et al. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: Branching out from Toll-like receptors. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1087–1098, 2007.

JUAREZ, E. et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. **Respiratory Research**, v. 11, p. 1–13, 2010.

- JUNG, B. G. et al. Early Secreted Antigenic Target of 6-kDa of Mycobacterium tuberculosis Stimulates IL-6 Production by Macrophages through Activation of STAT3. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–14, 2017.
- KADER, M. et al. Interferon Type I Regulates Inflammasome Activation and High Mobility Group Box 1 Translocation in Hepatocytes During Ehrlichia -Induced Acute Liver Injury . **Hepatology Communications**, v. 5, n. 1, p. 33–51, 2021.
- KALRA, H.; DRUMMEN, G. P. C.; MATHIVANAN, S. Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 170, p. 1–30, 2016.
- KAUFMANN, S. H. E.; SCHAIBLE, U. E. **A dangerous liaison between two major killers: Mycobacterium tuberculosis and HIV target dendritic cells through DC-SIGN.** **Journal of Experimental Medicine**, jan. 2003.
- KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.
- KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. Virulent Mycobacterium tuberculosis Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 2016–2020, 2000.
- KHADER, S. A. et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1805–1815, 2006.
- KIM, S. H. et al. MHC Class II + Exosomes in Plasma Suppress Inflammation in an Antigen-Specific and Fas Ligand/Fas-Dependent Manner. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 2235–2241, 2007.

KOCH, R. The etiology of tuberculosis. **The Germ Theory of Disease**, p. 116–118, 1884.

KÖSTER, S. et al. Mycobacterium tuberculosis is protected from NADPH oxidase and LC3-associated phagocytosis by the LCP protein CpsA. **PNAS**, v. 114, n. 41, p. E8711–E8720, 2017.

KUHN, H. et al. Cytokine-Dependent Expression Regulation of ALOX15. **Journal of Cytokine Biology**, v. 01, n. 02, p. 1–14, 2016.

KUMAR, V. **Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury**. **Frontiers in immunology**NLM (Medline), , 2020.

LAMBERT, L.; CULLEY, F. J. **Innate immunity to respiratory infection in early life**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 14 nov. 2017.

LARSEN, B. C. P. et al. Migration and Maturation of Langerhans Cells in Skin Transplants and Explants. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 1483–1493, 1990.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57–72, 2011.

LEEMANS, J. C. et al. Depletion of Alveolar Macrophages Exerts Protective Effects in Pulmonary Tuberculosis in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 4604–4611, 2001.

LILLEMEIER, F. et al. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. **Nature Immunology**, v. 7, n. 3, p. 247–255, 2006.

LIU, K.; NUSSENZWEIG, M. C. Origin and development of dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 234, p. 45–54, 2010.

LOYNES, C. A. et al. PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. **Science Advances**, v. 4, n. 9, 2018.

LÚCIA MOREIRA-TEIXEIRA et al. Type I interferons in tuberculosis: Foe and occasionally friend. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 5, p. 1273–1285, 2018.

LUGO-VILLARINO, G. et al. The C-type lectin receptor DC-SIGN has an anti-inflammatory role in Human M(IL-4) macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 12 jun. 2018.

MARTIN, F. P. et al. **Alveolar macrophages: Adaptation to their anatomic niche during and after inflammation.** *CellsMDPI*, , 1 out. 2021a.

MARTIN, F. P. et al. **Alveolar macrophages: Adaptation to their anatomic niche during and after inflammation.** *CellsMDPI*, , 1 out. 2021b.

MARTINEZ, A. N.; MEHRA, S.; KAUSHAL, D. Role of interleukin 6 in innate immunity to mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1253–1261, 2013.

MATHIEU, E. et al. **Paradigms of lung microbiota functions in health and disease, particularly, in asthma.** *Frontiers in Physiology*Frontiers Media S.A., , 21 ago. 2018.

MAUS, R. L. G. et al. Human Melanoma-Derived Extracellular Vesicles Regulate Dendritic Cell Maturation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 358, p. 1–12, 2017.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–826, 2007.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255–258, 2001.

MERSFELDER, E. L.; PARTHUN, M. R. The tale beyond the tail: Histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 9, p. 2653–2662, 2006.

MIHRET, A. **The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. Virulence** Taylor and Francis Inc., , 2012.

MOGUES, T. et al. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 3, p. 271–80, 2001.

MONTECALVO, A. et al. Exosomes As a Short-Range Mechanism to Spread Alloantigen between Dendritic Cells during T Cell Allorecognition. **Journal of Immunology**, v. 180, p. 3081–3090, 2008.

MUBIN, N. et al. Mycobacterium tuberculosis host cell interaction: Role of latency associated protein acr-1 in differential modulation of macrophages. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018.

NAGABHUSHANAM, V. et al. Innate Inhibition of Adaptive Immunity: Mycobacterium tuberculosis -Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4750–4757, 2003.

NETEA, M. G. et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 427, 2016a.

NETEA, M. G. et al. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 1–23, 2016b.

- NGUYEN, H.; GAZY, N.; VENKETARAMAN, V. A role of intracellular toll-like receptors (3, 7, and 9) in response to mycobacterium tuberculosis and co-infection with hiv. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–18, 2020.
- NITU, F. M. et al. Tuberculosis and its particularities in Romania and worldwide. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 58, n. 2, p. 385–392, 2017.
- NJOCK, M. S. et al. Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs. **Blood**, v. 125, n. 20, p. 3202–3212, 2015.
- NOSS, E. H. et al. Toll-Like Receptor 2-Dependent Inhibition of Macrophage Class II MHC Expression and Antigen Processing by 19-kDa Lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis . **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 910–918, 15 jul. 2001.
- O'DWYER, D. N.; DICKSON, R. P.; MOORE, B. B. The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 12, p. 4839–4847, 15 jun. 2016.
- ORME, I. M. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 138, n. 1, p. 293–8, 1987.
- ÖSTMAN, S.; TAUBE, M.; TELEMO, E. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. **Immunology**, v. 116, p. 464–476, 2005.
- PADHI, A. et al. Mycobacterium tuberculosis LprE Suppresses TLR2-Dependent Cathelicidin and Autophagy Expression to Enhance Bacterial Survival in Macrophages . **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 10, p. 2665–2678, 2019.

PANCHOLI, P. et al. Sequestration from Immune CD4 + T Cells of Mycobacteria Growing in Human Macrophages. **Science**, v. 260, p. 984–986, 1993.

PEYRON, P. et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. 1–14, 2008.

PIETERS, J. **Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance**. **Cell Host and Microbe**, 12 jun. 2008.

PUHM, F. et al. Mitochondria are a subset of extracellular vesicles released by activated monocytes and induce type I IFN and TNF responses in endothelial cells. **Circulation Research**, v. 125, n. 1, p. 43–52, 2019.

QIAN, Z. et al. The role of extracellular vesicles: An epigenetic view of the cancer microenvironment. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

QUEVAL, C. J.; BROSCH, R.; SIMEONE, R. **The macrophage: A disputed fortress in the battle against Mycobacterium tuberculosis**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 23 nov. 2017.

RAJARAM, M. V. S. et al. **Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis**. **Seminars in Immunology** Academic Press, , 1 dez. 2014.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles : Exosomes , microvesicles , and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

ROACH, D. R. et al. TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4620–4627, 2002.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 195–208, 2014.

RUEZ, R. et al. Dendritic Cell Migration Toward CCL21 Gradient Requires Functional. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. March, p. 1–12, 2018.

SAKA, H. A.; VALDIVIA, R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 411–437, 2012.

SÁNCHEZ, D. et al. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage death. **Cellular Immunology**, v. 260, n. 2, p. 128–136, 2010.

SAUNDERS, B. M. et al. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3322–3326, 2000.

SAUNDERS, B. M. et al. Transmembrane TNF Is Sufficient to Initiate Cell Migration and Granuloma Formation and Provide Acute, but Not Long-Term, Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 8, p. 4852–4859, 2005.

SCHIERA, G. et al. Oligodendroglioma cells synthesize the differentiation-specific linker histone H1^o and release it into the extracellular environment through shed vesicles. **International Journal of Oncology**, v. 43, p. 1771–1776, 2013.

SCHIERA, G. et al. Extracellular Membrane Vesicles as Vehicles for Brain Cell-to-Cell Interactions in Physiological as well as Pathological Conditions. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

- SHAFIANI, S. et al. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 7, p. 1409–1420, 5 jul. 2010.
- SHALER, C. R. et al. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- SKOKOS, D. et al. Mast Cell-Derived Exosomes Induce Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells and Elicit Specific Immune Responses In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3037–3045, 2003.
- SODENKAMP, J. et al. Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. **Immunobiology**, v. 217, n. 10, p. 996–1004, 2012.
- SOMMARIVA, M. et al. **The lung microbiota: role in maintaining pulmonary immune homeostasis and its implications in cancer development and therapy. Cellular and Molecular Life Sciences** Springer, , 1 jul. 2020.
- TORRALBA, D. et al. Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2018.
- TRAAG, B. A. et al. Do mycobacteria produce endospores? **PNAS**, v. 107, n. 2, p. 878–881, 2010.
- UPADHYAY, S.; MITTAL, E.; PHILIPS, J. A. **Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. Pathogens and Disease** Oxford University Press, , 1 jun. 2018.
- VARRIALE, A. DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges. **International Journal of Evolutionary Biology**, p. 1–7, 2014.

VINCENT-SCHNEIDER, H. et al. Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. **International Immunology**, v. 14, n. 7, p. 713–722, 2002.

WALTERS, S. B. et al. Microparticles from Mycobacteria-Infected Macrophages Promote Inflammation and Cellular Migration. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 669–677, 2013.

WAMPANDE, E. M. et al. Distribution and transmission of Mycobacterium tuberculosis complex lineages among children in peri-urban Kampala, Uganda. **BMC pediatrics**, v. 15, p. 140, 2015.

WASSERMANN, R. et al. Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 6, p. 799–810, 2015.

WAYNE, L. G. Synchronized replication of Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 17, n. 3, p. 528–530, 1977.

WEIBEL, G. L. et al. 15(S)-lipoxygenase-1 associates with neutral lipid droplets in macrophage foam cells: Evidence of lipid droplet metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 12, p. 2371–2376, 2009.

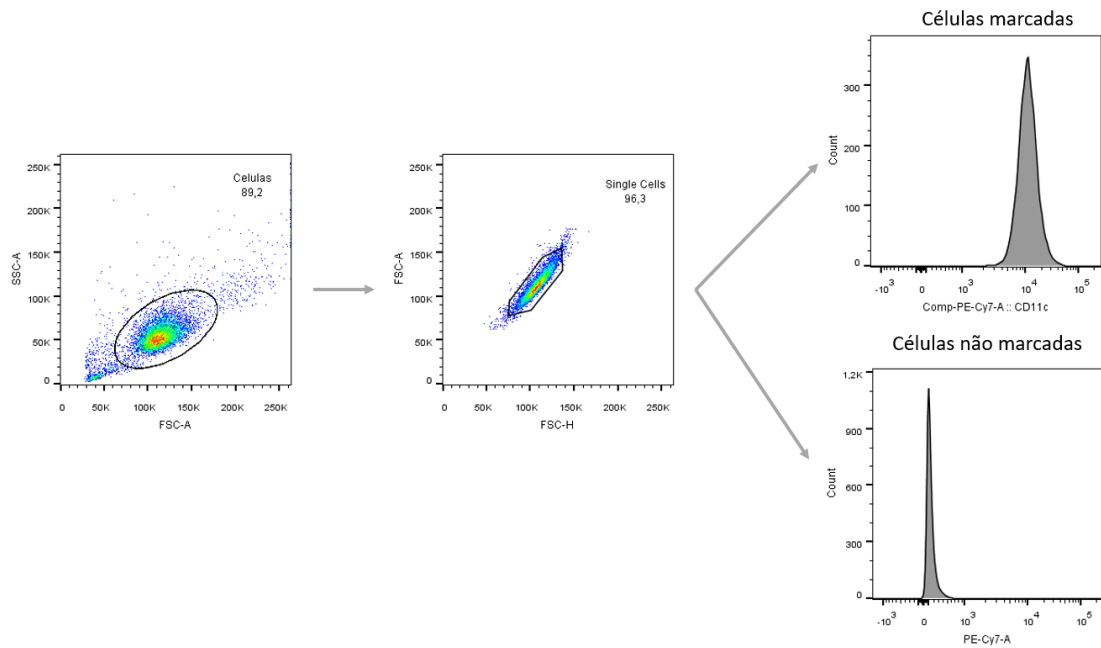
WINSLOW, G. M. et al. Early T-cell responses in tuberculosis immunity. **Immunological Reviews**, v. 225, 2008.

WOLF, A. J. et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, p. 105–115, 2008.

- WOUT, J. W. V.; POELL, R.; FURTH, R. VAN. The Role of BCG / PPD-Activated Macrophages in Resistance against Systemic Candidiasis in Mice. **Scand J Immunol**, v. 36, p. 713–719, 1992.
- XIA, A. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv0927c Inhibits NF- κ B Pathway by Downregulating the Phosphorylation Level of I κ B α and Enhances Mycobacterial Survival. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 31 ago. 2021.
- YAMADA, H. et al. Relative importance of NF- κ B p50 in mycobacterial infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 7100–7105, 2001.
- YANG, C. Y. et al. **New insights into the immune molecular regulation of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 16 fev. 2018.
- YANG, L.; PANG, Y.; MOSES, H. L. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 6, p. 220–227, 2010.
- YEN, J.-H.; KONG, W.; GANEA, D. IFN- β Inhibits Dendritic Cell Migration through STAT-1-Mediated Transcriptional Suppression of CCR7 and Matrix Metalloproteinase 9. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3478–3486, 1 abr. 2010.
- ZENG, G.; ZHANG, G.; CHEN, X. **Th1 cytokines, true functional signatures for protective immunity against TB? Cellular and Molecular Immunology** Chinese Soc Immunology, , 1 mar. 2018.
- ZHOU, X. et al. The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 4, p. 323–334, 2020.

Anexo I

Figura 15 Estratégia de gates para identificação das células dendríticas



Estratégia de gates utilizada para selecionar a população de células dendríticas nos experimentos de citometria de fluxo. A primeira gate separa as células em tamanho de granulosidade, depois disso foram separadas as “single cells” e por último foram selecionadas as células marcadas com CD11c.

Anexo II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: " **O papel das vesículas extracelulares no training de células dendríticas humanas durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis***".

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof^ª. Dr^ª. Fabiani Gai Frantz, Ms. Patrick Fernandes da Silva.

Gostaríamos de convidá-lo a participar desta pesquisa que é desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. Este trabalho tem como objetivo avaliar, de participantes saudáveis, a modulação em monócitos e células dendríticas, que são as células do sangue essenciais para a defesa do corpo durante a infecção por micróbios. A sua participação é **voluntária** e não obrigatória. Para participar, é necessário ler com atenção este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento em duas vias, uma para você e outra para nós pesquisadores.

O que são células dendríticas e monócitos?

As células dendríticas e os monócitos são células do sistema imune que atuam na defesa contra micróbios invasores. O estudo da função dessas células é importante porque elas ajudam na defesa do organismo contra micróbios invasores, e o entendimento do funcionamento dessas células poderia ajudar no diagnóstico e até no tratamento de diversas doenças.

Como você vai participar da pesquisa?

Sua participação é **voluntária** e acontecerá através da doação de um componente especial presente na máquina que faz a coleta de plaquetas, chamada “câmara de leucorredução. Esse componente, “câmara de leucorredução”, acumula células de defesa do corpo (os leucócitos) e normalmente é descartado. Caso concorde em participar, o (a) senhor(a) permitirá, que a câmara

seja destinada à pesquisa, para isolamento de células de defesa. Essa coleta não interferirá no procedimento de doação de sangue e não comprometerá sua segurança.

Os participantes do grupo controle serão de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos, que **NÃO ESTEJAM APRESENTANDO SINTOMAS DE INFECÇÕES** por vírus, fungos ou bactérias. Como parte da triagem para doação, o sangue será testado para HIV e outras doenças infecciosas pelo Hemocentro. Caso o resultado seja positivo para alguma delas, as amostras do participante serão excluídas da pesquisa e não serão armazenadas para pesquisas futuras. Esta pesquisa não trará benefício direto para os participantes, contudo auxiliará para a melhor compreensão do funcionamento de células dendríticas e monócitos em modelos de infecção.

Somente os resultados da pesquisa serão divulgados em congressos e trabalhos científicos, o seu nome nunca será divulgado sendo guardado em sigilo e privacidade. A sua participação é voluntária e você não terá despesas nem ganhará dinheiro para participar dessa pesquisa. Você poderá tirar dúvidas, conhecer os resultados da pesquisa e terá toda a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Basta avisar os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa em um dos endereços e contatos que aparecem no final desse documento. O Comitê de Ética em Pesquisa é responsável por defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Como participante da pesquisa, você tem o direito de procurar obter indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Se ao final da leitura desse documento você estiver sem qualquer dúvida e concordar em participar da pesquisa, você e o pesquisador responsável deverão assinar esse documento em duas vias. Uma das vias será sua e a outra do(a) pesquisador(a).

Ribeirão Preto, _____ de 202__.

Nome do pesquisador responsável e assinatura: _____

Eu, _____, li e concordo em participar dessa pesquisa.

Ribeirão Preto, _____ de 202__.

Assinatura do participante da pesquisa

Endereços e contatos:

Professora Dra. Fabiani Gai Frantz; Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP; Av. do Café, sem número, bairro Monte Alegre, Campus USP Ribeirão Preto - Bloco S - 3º andar – sala 96; CEP 14040-903 - Ribeirão Preto – SP. Telefones: Profª. Drª. Fabiani Gai Frantz (16) 3315-0241 (frantz@usp.br); Ms. Patrick Fernandes da Silva (31) 9 9914-7628 (patrickfs@usp.br)

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Avenida do Café, sem número, bairro Monte Alegre, Campus USP Ribeirão Preto - Bloco H - Sala 116; CEP 14040-903 - Ribeirão Preto – SP. Telefone: (16) 3315-4213; Fax: (16) 3315-4892; E-mail: cep@fcfrp.usp.br