

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

Ualter Guilherme Cipriano Rosa

Interação das células epiteliais alveolares tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* com populações de macrófagos infectados ou não.

Ribeirão Preto

2022

Ualter Guilherme Cipriano Rosa

Interação das células epiteliais alveolares tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* com populações de macrófagos infectados ou não.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Vânia Luiza Deperon Bonato

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cipriano, Ualter Guilherme

Interação das células epiteliais alveolares tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* com populações de macrófagos infectados ou não. Ribeirão Preto, 2022.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador (a): Vânia Luiza Deperon Bonato.

1. Macrófago 2. Célula epitelial alveolar 3. Tuberculose.

Nome: Ualter Guilherme Cipriano Rosa

Título: Interação das células epiteliais alveolares tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* com populações de macrófagos infectados ou não

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Brasil (FAPESP) – Processo 2019/24681-3”

“This study was financed in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Brazil (FAPESP) – Grant 2019/24681-3”

AGRADECIMENTOS

De coração, minha gratidão,

A Deus, por ter me dado forças para continuar e superar minhas adversidades.

À minha mãe, Suzimeire Cipriano e aos meus avôs Luzinete Moraes Cipriano e Walter Cipriano pelo apoio incondicional, por estarem presentes, mesmo à distância, nos momentos difíceis em que pensei que não conseguiria suportar as tribulações da vida.

Às pessoas que estavam envolvidas diretamente na realização desse projeto, como Thais Fraga, Giseli Furlan Corrêa e Ana Flávia Gembre, por terem me auxiliado e estarem à disposição quando eu precisei.

À Wendy Martin Rios e Izaíra Tincani Brandão por me ajudaram quando precisei, mesmo não sendo do laboratório.

Ao Diego Luis Costa que me auxiliou nos experimentos difíceis.

Aos amigos que fiz dentro do laboratório, Ana Flávia Gembre, Giseli Furlan Corrêa, Michael Boko, Sabrina Martins, Thais Fraga e Vinícius Apolloni.

À Daniela Dalpabel e Juliana Sakita, pelos ótimos finais de semana que passei tendo conversas maravilhosas e por cuidarem de mim como um filho.

Aos meus melhores amigos, Bruno Manfré e Yasmin Munhoz, de quem sinto saudades todos os dias.

Por fim, à minha orientadora, Professora Vânia Luiza Deperon Bonato, que confiou e acreditou em mim, me guiou, me incentivou, me ensinou e me recebeu com muito carinho em seu laboratório. Sou grato por tê-la como orientadora.

Por fim, às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Brasil (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

*“Tens, como Hamlet, o pavor do desconhecido?
Mas o que é conhecido? O que é que tu conheces,
Para que chames desconhecido a qualquer coisa em especial?”*

- Álvaro de Campos

RESUMO

Cipriano, UG. **Interação das células epiteliais alveolares tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* com populações de macrófagos infectados ou não.** 2022.

Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A tuberculose era a doença que causava o maior número de mortes no mundo decorrente do contato com um único agente infeccioso, até o surgimento da pandemia da COVID-19. Aproximadamente 5-10% de pessoas infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*, o bacilo causador desta doença, perfazem o número de mais de 10 milhões de pessoas sintomáticas e doentes. Os demais 90-95% de indivíduos infectados têm infecção latente/assintomática, e correspondem a ¼ da população mundial.

Acredita-se que a imunidade inata seja fundamental para indução da latência. Inseridos na imunidade inata, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais alveolares estão entre as primeiras células que interagem com *M. tuberculosis*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a interação de células epiteliais alveolares infectadas por *M. tuberculosis* com macrófagos, partindo-se da hipótese de que o microambiente gerado por células epiteliais alveolares infectadas irá afetar a resposta dos macrófagos.

Utilizamos a linhagem (MLE-15) de células epiteliais alveolares do tipo II, que foram infectadas por *M. tuberculosis* (MOI 10) e o sobrenadante dessa cultura celular, denominado meio condicionado de células infectadas (ICM), foi usado para tratar macrófagos derivados de precursores da medula óssea (BMDM). Como controles experimentais foram usados meio condicionado de células MLE-15 não infectadas (NICM), LPS ou apenas a infecção com *M. tuberculosis*.

Macrófagos tratados com ICM exibiram aumento na expressão de arginase 1 (Arg1), secretaram IL-1 β , TNF e IL-10. Macrófagos alveolares da linhagem AMJ2-C11, expostos ao ICM também apresentaram aumento na expressão de Arg1. BMDM expostos previamente ao ICM e, em seguida, infectados por *M. tuberculosis*, apresentaram redução da carga bacilar, secretaram concentrações significativas de IL-1 β e IL-6, além do aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), e morte por necrose quando comparado aos macrófagos não estimulados com ICM. Para avaliar a função desses macrófagos *in vivo*, transferimos BMDM previamente tratados com ICM para animais C57BL/6 *wild-type* (WT) e avaliamos o quadro pulmonar 10 dias após a infecção. Animais que receberam macrófagos expostos previamente ao ICM, apresentaram redução da carga bacilar e da inflamação nos pulmões, aumento de IL-1 β em células totais dos pulmões, e maior expressão de iNOS em macrófagos alveolares e intersticiais comparados com o grupo de animais que não receberam transferência. Células epiteliais dos pulmões dos animais infectados exibiram maior morte significativa por necrose, independente do tratamento feito nos macrófagos transferidos.

Em conclusão, a interface das células epiteliais do tipo II infectadas por *M. tuberculosis* com macrófagos é importante para ativar e regular a resposta inata, auxiliando na contenção da carga bacilar. A identificação das moléculas presentes no meio condicionado (ICM) poderá possibilitar o surgimento de novos alvos para terapias imunológicas contra a tuberculose.

Palavras chaves: macrófago, célula epitelial alveolar e tuberculose.

ABSTRACT

Cipriano, UG. **Interaction of type II alveolar epithelial cells infected by *Mycobacterium tuberculosis* with populations of infected or non-infected macrophage.** 2022. Master's dissertation – Basic and Applied Immunology Graduate School – Ribeirao Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Tuberculosis was the disease that caused the greatest number of deaths in the world from exposure to a single infectious agent, until the emergence of the COVID-19 pademia. Approximately 5-10% of people infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the bacillus that causes this disease, make up more than 10 million people who are symptomatic and ill. The remaining 90-95% of infected individuals have latent/symptomatic infection, and correspond to ¼ of the world's population.

Innate immunity is believed to be critical in inducing latency. As part of innate immunity, macrophages, dendritic cells, and alveolar epithelial cells are among the first cells that interact with *M. tuberculosis*.

The aim of the present study was to evaluate the interaction of *M. tuberculosis*-infected alveolar epithelial cells with macrophages, hypothesizing that the microenvironment generated by infected alveolar epithelial cells will affect the macrophage response.

We used the lineage (MLE-15) of type II alveolar epithelial cells that were infected with *M. tuberculosis* (MOI 10) and the supernatant of this cell culture, termed infected cell conditioned medium (ICM), was used to treat bone marrow precursor-derived macrophages (BMDM). Conditioned medium of uninfected MLE-15 cells (NICM), LPS or *M. tuberculosis* infection alone were used as experimental controls.

Macrophages treated with ICM exhibited increased expression of arginase 1 (Arg1), secreted IL-1 β , TNF and IL-10. Alveolar macrophages of the AMJ2-C11 lineage exposed to ICM also exhibited increased Arg1 expression. BMDM previously exposed to ICM and then infected with *M. tuberculosis* showed reduced bacillary load, secreted significant concentrations of IL-1 β and IL-6, increased expression of the enzyme induced nitric oxide synthase (iNOS), and death by necrosis when compared to macrophages not stimulated with ICM. To evaluate the function of these macrophages *in vivo*, we transferred BMDM previously treated with ICM to C57BL/6 wild-type (WT) animals and evaluated the lung condition 10 days after infection. Animals that received macrophages previously exposed to ICM showed reduced bacillary load and inflammation in the lungs, increased IL-1 β in total lung cells, and increased iNOS expression in alveolar and interstitial macrophages compared to the group of animals that did not receive transfer. Epithelial cells from the lungs of infected animals exhibited the highest significant death by necrosis, independent of the treatment done on the transferred macrophages.

In conclusion, the interface of *M. tuberculosis*-infected type II epithelial cells with macrophages is important for activating and regulating the innate response, helping to contain the bacillary load. The identification of molecules present in the conditioned medium (ICM) may enable the emergence of new targets for immune therapies against tuberculosis.

Palavras chaves: macrophage, alveolar epithelial cell and tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de análise de macrófagos expostos ao ICM.....	30
Figura 2. Interação de AEC-II MLE-15 com macrófagos BMDM.....	31
Figura 3. Avaliação da produção de citocinas por BMDM após a estimulação com NICM ou ICM.....	32
Figura 4. Interação dos meios condicionados NICM e ICM com macrófagos de linhagem AMJ2-C11.....	32
Figura 5. Estratégia de análise para a polarização e tipo de morte dos macrófagos após a infecção com H37Rv.....	33
Figura 6. Infecção com H37Rv MOI 10 de BMDM tratados com ICM.....	34
Figura 7. Expressão de Arg1 ou iNOS em BMDM pré tratados com ICM após a infecção com H37Rv MOI 10.....	36
Figura 8. Tipos de morte celular presente em BMDM pre tratados com ICM e infectados com H37Rv MOI 10.....	36
Figura 9. Delineamento de transferência de macrófagos BMDM tratados com NICM e ICM para animais infectados.....	37
Figura 10. Carga bacteriana dos animais após 10 dias de infecção.....	38
Figura 11. Avaliação do quadro histológico pulmonar.....	39
Figura 12. Estratégia de análise de células epiteliais.....	40
Figura 13. Caracterização do tipo de morte das células epiteliais pulmonares na infecção com H37Rv mCherry <i>ex vivo</i>	41
Figura 14. Estratégia de análise da expressão de Arg1 e iNOS em macrófagos alveolares e intersticiais.....	42
Figura 15. Expressão de Arg1 por diferentes tipos de macrófagos.....	43
Figura 16. Expressão de iNOS por diferentes tipos de macrófagos.....	44
Figura 17. Estratégia de análise para avaliar morte em macrófagos.....	45

Figura 18. Caracterização do tipo de morte de macrófagos alveolares e intersticiais de animais que receberam BMDM ou não tratados com NICM ou ICM e foram infectados com <i>M. tuberculosis</i>	46
Figura 19. Estratégia de análise para expressão de IL-1 β	47
Figura 20. Marcação de citocinas intracelulares nos pulmões de animais infectados com 1 x 10 ² CFU que receberam BMDM tratados com ICM ou NICM.....	47
Figura 21. Resumo.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
AEC	Células epiteliais alveolares
AEC-I	Células epiteliais alveolares do tipo I
AEC-II	Células epiteliais alveolares do tipo II
AIM2	Absent in melanoma 2
AM	Macrófago alveolar
Arg1	Arginase 1
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	B-cellCLL/lymphoma 2
BMDM	Macrófagos derivados da medula óssea
CFP10	Culture filtrate protein 10 kDa
CFU	Unidades formadoras de colônias
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMDP	Dichloromethylene diphosphonate
DP	Desvio padrão
ENaC	Canal de sódio epitelial
ESAT-6	6 kDa early secretory antigenic target
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FVS	Fixable Viability Stain
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Fator estimulador de granulócitos e macrófagos
H&E	Hematoxilina e Eosina

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBHA	Heparin-binding hemagglutinin
ICM	Infected Cell Medium
IFN	Interferons
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IM	Macrófagos intersticiais
Inos	Óxido nítrico sintase induzida
IRF3	Fator de transcrição 3 de resposta de interferon
IRF7	Fator de transcrição 7 de resposta de interferon
KGF	Fator de crescimento para queratinócitos
KO	Knockout
LD	Limite de detecção
LPM	Litro por minuto
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulador de macrófagos
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MLE-15	Murine Lung Epithelial 15
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like
MOI	Multiplicidade de infecção
MPT	Mitochondrial permeability transition
Mtor	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NICM	Non-Infected Cell Medium
NLR	NOD-Like Receptors
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PRR	Pattern Recognition Receptors
Rb	Retinoblastoma 1
RIG	Retinoic acid-inducible
RIPK1	Receptor interacting protein kinase 1
RIPK3	Receptor interacting protein kinase 3
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SPF	Specific Pathogen Free
STING	Stimulator of interferon genes
TAMs	Macrófagos associados a tumores
TGF-β	Fator do crescimento transformador beta
TLR	Toll-Like Receptors
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
WT	Wild-Type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Células Epiteliais e a resposta imune	1
1.1.1 Células epiteliais pulmonares: barreira física e química.....	1
1.1.2 Células epiteliais: ativação de resposta imunológica.....	2
1.2. Macrófagos e a resposta imune	4
1.2.1 Macrófagos alveolares	4
1.2.2 Macrófagos intersticiais	6
1.2.3 Polarização dos macrófagos e suas funções.....	7
1.3. Tuberculose	9
1.3.1 Aspectos gerais	9
1.3.2 Infecção de células epiteliais por <i>M. tuberculosis</i>	10
1.3.3 Infecção de macrófagos por <i>M. tuberculosis</i>	11
1.3.4 Tipo da morte do macrófago influencia na resposta imune	15
1.4. Células epiteliais e macrófagos na tuberculose	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVO	22
3.1 Objetivos gerais	22
3.1.2 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5. RESULTADOS	29
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células Epiteliais e a resposta imune

1.1.1 Células epiteliais pulmonares: barreira física e química

A função primordial das células epiteliais é a formação de uma barreira, que impede a entrada de microrganismos, de compostos químicos e físicos na pele ou que ultrapasse as mucosas, além de impedir a saída excessiva de fluidos intersticiais dos tecidos (JOHNSTON et al., 2021). O epitélio que reveste o corpo humano é especializado e desempenha diferentes funções baseadas em suas localidades específicas, como absorção de nutrientes pelo intestino, digestão do bolo alimentar pelo estômago, condução de líquidos pelo sistema urinário, desenvolvimento fetal no sistema genital feminino e trocas gasosas pelos pulmões. Os pulmões são divididos em duas porções, a porção condutora que inclui nasofaringe, orofaringe, laringofaringe, laringe, traqueia, brônquio e bronquíolos, que são responsáveis por conduzir o ar até a porção respiratória constituída por bronquíolos respiratórios e alvéolos, que é onde ocorrerão as trocas gasosas entre o lúmen pulmonar e os vasos sanguíneos, região que também realiza a manutenção da homeostase pulmonar, pela produção de surfactantes, por exemplo (HEWITT; LLOYD, 2021).

Os pulmões são revestidos internamente por um conjunto de células epiteliais especializadas que além de realizar as trocas gasosas, desempenham outras funções. A porção condutora tem o papel principal de fornecer gases quase completamente estéreis para os alvéolos realizarem as trocas gasosas (WHITSETT; ALENGHAT, 2015). Essa porção é constituída por células cuboides ciliadas que desempenham papel chave expelindo microrganismos, fragmentos celulares e depurando o muco através do batimento ciliar. Algumas doenças e síndromes associadas à disfunção do batimento ciliar podem predispor ao desenvolvimento de fibrose pulmonar, além de mutações gênicas que levam a um rápido declínio na função pulmonar (HORANI; FERKOL, 2021). As células caliciformes produtoras de muco também apresentam papel importante em conjunto com as células ciliadas, pois o muco contém fluidos, produtos metabólicos e antimicrobianos, além de mucinas que servem como pacotes que levam todos os componentes indesejados para fora do trato respiratório (DAVIS; WYPYCH, 2021). Roy e colaboradores mostraram que camundongos deficientes para o gene *Muc5* (*Muc5b*^{-/-}), um gene relacionado com a produção de muco, apresentaram maior complicação respiratória, com maior quadro inflamatório, infiltrado celular, acúmulo de

macrófagos apoptóticos e infecções recorrentes, principalmente por *Staphylococcus aureus* (ROY et al., 2014).

Na porção respiratória, bronquíolos terminais são constituídos por células que variam da morfologia cilíndrica à cubica simples. Podem ser ciliados ou não, não havendo mais células caliciformes nessa região. Os alvéolos são constituídos, principalmente, por células epiteliais alveolares (AEC) do tipo I e II, também chamadas de pneumócitos do tipo I e II (BASIL et al., 2020). As AEC-II são altamente ativas, apresentam morfologia cuboide, com núcleo proeminente e grande quantidade de mitocôndrias (RUARO et al., 2021). Essas células apresentam diferentes funções; uma delas é a produção de surfactantes, uma emulsão 90% lipídica e 10% proteica que tem a função de diminuir a tensão superficial dos pulmões, impedindo que o mesmo possa colabar e sofrer atelectasia; outra função é a reabsorção de água no interior do alvéolo, mantendo o lúmen relativamente seco por meio da utilização de mecanismos como o canal de sódio epitelial (ENaC), ATPases para sódio e potássio, e grande quantidade de mitocôndrias para gerar adenosina trifosfato (ATP) e permitir o transporte de líquido para o interstício (RUARO et al., 2021); a AEC-II também apresenta capacidade de produzir algumas citocinas inflamatórias, como interleucina (IL) 1 β (IL-1 β), IL-6, realizar quimiotaxia, produzir peptídios antimicrobianos, como β -defensinas, lipocalina e lisosimas; também consegue modular o sistema inato, pela produção de componentes como Fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que ativa macrófagos alveolares e induz o reparo tecidual e a remoção do excesso de surfactantes, evitando assim uma proteinose alveolar pulmonar (RÖSLER; HEROLD, 2016); por fim, as AEC-II também possuem a capacidade de auto renovação e em caso de injúria, renovam AEC-I adjacentes, mantendo assim a homeostase alveolar (WU; SONG, 2021).

1.1.2 Células epiteliais: ativação de resposta imunológica

Os pulmões possuem revestimento epitelial que corresponde a uma área aproximada de 70 m², tendo sua estrutura anatômica e composição físico-química feitas para manter sempre as vias aéreas abertas. Entretanto, a inalação de ar pode carrear microrganismos externos (BASIL et al., 2020), existindo a necessidade de constante vigilância imunológica nessas regiões. Westphalen e colaboradores mostraram que existe 1 macrófago alveolar (AM) para patrulhar e eliminar microrganismos a cada 3 alvéolos (WESTPHALEN et al., 2014), de modo que a vigilância imunológica necessita ser realizada também por outros tipos celulares.

Assim, as células epiteliais dos pulmões são capazes de induzir resposta imunológica contra patógenos, agindo em associação com leucócitos. Tzou e colaboradores mostraram pela primeira vez em drosófilas que o epitélio do sistema respiratório consegue formular resposta contra microrganismos. Eles utilizaram um sistema repórter “*green fluorescent protein*” (GFP), feito através da inserção em embriões de genes produtores de proteínas GFP adjacentes a diversos outros genes, produzindo assim diversas proteínas associadas a moléculas fluorescentes. Quando as larvas e moscas foram estimuladas com uma agulha embebida em bactérias, os autores encontraram a produção de drosocina-GFP pelo epitélio traqueal das larvas, uma proteína antibacteriana específica para bactérias Gram-positivas. Já na região orofaríngea das larvas, identificaram a produção de defensina-GFP (TZOU et al., 2000). Esses resultados mostraram que o epitélio auxilia na indução da resposta imunológica, produzindo proteínas antimicrobianas específicas para cada região. Toulmin e colaboradores evidenciaram o trabalho conjunto de células epiteliais e de leucócitos, quando avaliaram a capacidade da apresentação de antígenos pelas AEC-II na infecção pelo vírus influenza e pelo vírus Sendai em modelo experimental com camundongos C57BL/6. Utilizando camundongos *knockout* (KO) condicionais para o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) apenas nas AEC-II, descreveram menor indução de linfócitos de memória (CD44⁺) em comparação aos animais apenas flanqueados para o MHC-II (*MHC-II^{f/f}*). Isso resultou em taxa de mortalidade mais alta, mostrando que a falta da apresentação de antígenos pela AEC-II induzia menos linfócitos de memória e, por consequência, ocorria pior quadro clínico para o animal (TOULMIN et al., 2021).

As células epiteliais pulmonares por fazerem a interface do meio interno e externo expressam diversos “*Pattern Recognition Receptors*” (PRR), incluindo *Toll-Like Receptors* (TLR) e *NOD-Like Receptors* (NLR) (WHITSETT; ALENGHAT, 2015). As AEC-II expressam uma ampla variedade de TLR, incluindo TLR-2 e -4, sendo o TLR-4 responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS), além de ser ativado pela fumaça do cigarro (ARMSTRONG et al., 2004; PACE et al., 2008).

As AEC-II induzem resposta imunológica contra vírus, através da produção de interferons (IFN) do tipo I e III, bactérias, pela produção de citocinas inflamatórias e óxido nítrico e até helmintos, através da ação de citocinas associadas a ação parasitária, como a IL-13 (JOHNSTON et al., 2021). As células epiteliais também expressam PRR que permitem o reconhecimento de material genético de diversos microrganismos via TLR-3, -7, -8 e -9, além da ativação das vias STING (*Stimulator of interferon genes*) e RIG (*Retinoic acid-inducible*)

que culminam na ação dos fatores de transcrição 3 e 7 de resposta de interferon (IRF3 e IRF7), levando à produção de componentes antivirais como IFN do tipo I e III que auxiliam na resposta antiviral (JOHNSTON et al., 2021). Parte da resposta inata na infecção de células epiteliais pulmonares por *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) é elucidada no trabalho do nosso grupo de pesquisa (FRAGA-SILVA et al., 2022, submetido), que aborda a morte de células epiteliais humanas e como elas interagem com macrófagos nas fases iniciais da infecção por SARS-CoV-2. Blanco-Melo e colaboradores observaram que amostras de pulmão de indivíduos pós morte infectados com SARS-Cov2 não apresentavam produção de IFN do tipo I e III quando comparados a amostras obtidas de biopsia de doadores saudáveis, mas apresentavam níveis elevados de IL-6 e quimiocinas como CCL2, CXCL2, CXCL8 e CXCL9, sugerindo a capacidade de subversão viral da resposta induzida por células epiteliais (BLANCO-MELO et al., 2020).

A resposta imune contra microrganismos extracelulares é mediada, geralmente, por TLR-4, que reconhece LPS, TLR-1, -2, -3 que reconhecem proteoglicanos de bactérias gram-positivas (ARMSTRONG et al., 2004), assim como uma outra variedade de PRR, que são os NLR, tendo sua função pouco explorada e pouco conhecida nas células epiteliais (WHITSETT; ALENGHAT, 2015). O início da resposta imunológica mediada pelas células epiteliais ocorre por meio da produção da alarmina S100A9 em conjunto com a produção de IL-6, INF- γ e óxido nítrico (RODRIGUES et al., 2020).

Além da imunidade contra vírus e patógenos extracelulares, há também a resposta imune na asma e contra infecções por helmintos, em que parte do seu ciclo de vida ocorre nos pulmões. As células epiteliais podem sofrer a ação de proteases, que caracterizam alguns alérgenos, e sob tais estímulos, a permeabilização do epitélio. A produção de IL-33 e de IL-25 promovem o recrutamento de basófilos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Esse conjunto de leucócitos contribuem para a diferenciação de resposta de perfil Th2, com a produção de IL-4, IL-9 e IL-13, que induzem a hiperresponsividade das vias aéreas e a produção de muco, além da presença de mediadores, como histamina, liberada por mastócitos (FREY et al., 2020; WEATHERHEAD et al., 2020).

1.2. Macrófagos e a resposta imune

1.2.1 Macrófagos alveolares

Os macrófagos alveolares (AM) são derivados do fígado fetal e povoam a região alveolar, onde se desenvolvem em pré-macrófagos alveolares no período de formação pulmonar e já são perceptíveis em apenas 3 dias após o nascimento, por uma onda de sinal mediada pelo aumento GM-CSF. Representam uma população de aproximadamente 3-5% de todas as células dos pulmões (CRAPO et al., 1983; CROWELL et al., 1992; HALEY et al., 1991; KROMBACH et al., 1997; LASKIN; MALAVIYA; LASKIN, 2015; LEHNERT; VALDEZ; HOLLAND, 1985; SEBRING; LEHNERT, 1992). Exibem fenótipo CD64⁺ CD11c^{hi} e SiglecF^{hi}. Em condições de homeostase, raramente, os AM são repostos por monócitos circulantes (GUILLIAMS et al., 2013; MCQUATTIE-PIMENTEL; BUDINGER; BALLINGER, 2018), mas apresentam renovação de aproximadamente 40% do seu *pool* em cerca de um ano. Em condições infecciosas, a renovação é de 85% em apenas dois meses (MAUS et al., 2006).

Os AM apresentam perfil anti-inflamatório que é regulado pelo microambiente alveolar. Por exemplo, as células epiteliais que expressam IL-10 e fator do crescimento transformador beta (TGF- β) na superfície luminal permitindo que essas moléculas se liguem aos receptores dos AM e induzam um perfil menos inflamatório (HUSSELL; BELL, 2014). Além desses mediadores, as células epiteliais também expressam CD200, que se liga ao receptor CD200R, expresso em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos algumas células B e células T periféricas. A conexão desse receptor com seu ligante induz um sinal unidirecional que regula negativamente as células que expressam CD200R (SNELGROVE et al., 2008). Macrófagos murinos que apresentavam perfil inflamatório induzido por INF- γ e LPS, quando tratados com anticorpos para CD200, aumentaram a expressão de marcadores anti-inflamatórios, como arginase 1 (Arg1) e TGF- β (HAYAKAWA; WANG; LO, 2016).

Holt e colaboradores mostraram que a presença de AM nos pulmões inibe a maturação de células dendríticas e por consequência, prejudica a ativação de linfócitos T. Os autores eliminaram farmacologicamente os AM utilizando *Dichloromethylene diphosphonate* (DMDP) e recuperaram as células dendríticas dos pulmões. Essas células foram colocadas em co-cultura com linfócitos T derivados de animais imunizados com ovalbumina, e foi observado que células dendríticas proveniente de animais que tiveram AM eliminados, conseguiram induzir maior ativação de linfócitos T quando comparado às células recuperadas dos pulmões de animais tratados apenas com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) (HOLT et al., 1993). Outro ponto interessante é que a apresentação de antígenos pelos AM induz uma taxa

muito baixa de replicação das células T e baixos níveis de produção de INF- γ , IL-10 e IL-4, quando comparados com células T estimuladas por células apresentadoras de antígenos derivadas de monócitos do sangue periférico, levando o linfócito T a um estado não responsivo e uma resposta mais branda (BLUMENTHAL et al., 2001). Esses resultados sugerem um mecanismo de tolerância periférica a antígenos na mucosa epitelial pulmonar (CHELEN et al., 1995).

1.2.2 Macrófagos intersticiais

Os macrófagos intersticiais (IM) representam aproximadamente 9% de todas as células mieloides do pulmão. Os IM podem ser identificados pelo seguinte fenótipo: SiglecF⁻ CD11b⁺ CD64⁺ Ly6C⁻, sendo positivos para MHC-II, CD11c⁺ e CD169, além de apresentarem baixos níveis de CCR2 (GIBBINGS et al., 2017; MCQUATTIE-PIMENTEL; BUDINGER; BALLINGER, 2018; SABATEL et al., 2017). Gibbings e colaboradores, ao utilizarem camundongos C57BL/6, conseguiram subdividir a população de macrófagos intersticiais em três grupos pela expressão de CD11c e MHC-II, sendo o primeiro grupo IM-1 classificado como CD11c^{lo} MHCII^{lo}, o grupo IM-2 foi classificado como CD11c^{lo} MHCII^{hi} e por fim, o grupo IM-3 era CD11c^{hi} MHCII^{hi}. Os autores ainda descreveram que todos os subgrupos de IM estão localizados no interstício brônquico e não no interstício alveolar (GIBBINGS et al., 2017).

A ontogenia dos IM é mais complexa e menos clara quando comparada com os AM. Acredita-se que os IM sejam de origem mista, sendo parte derivada do saco vitelino durante o desenvolvimento fetal e outra parte proveniente da medula óssea após o nascimento (TAN; KRASNOW, 2016). O estudo de Gibbings e colaboradores enfatizou essa ideia quando realizam um experimento com transferência celular de medula. Inicialmente, eles incidiram radiação γ em camundongos CD45.1, mas mantiveram a região dos pulmões protegida por chapas de chumbo, protegendo assim os AM e os IM. Posteriormente, as células da medula foram repostas por um doador CD45.2, quando observaram que em 5 semanas após a irradiação, o camundongo apresentava células CD45.2 nos pulmões. Os autores constataram que o subgrupo IM-3 apresentava taxas de renovação mais alta quando comparado aos subgrupos IM-1 e IM-2, indicando que parte dos IM é reabastecida por células provenientes da medula óssea enquanto que a outra parte é independente (GIBBINGS et al., 2017). Outro estudo também descreveu o mesmo fenômeno ao realizar a parabiose de camundongo *Wild-Type* (WT) com outro camundongo que expressava proteína fluorescente GFP. Por 4 meses,

17% dos IM expressavam a proteína GFP nos pulmões do camundongo WT, sugerindo que a circulação consegue repor parte dos macrófagos intersticiais presentes nos pulmões (TAN; KRASNOW, 2016).

1.2.3 Polarização dos macrófagos e suas funções

Inicialmente, os macrófagos foram divididos de acordo com o seu estado de ativação, chamados de classicamente ativados ou de alternativamente ativados, sendo associados à ativação com IFN- γ e LPS, ou IL-4, respectivamente (MURRAY et al., 2014). Posteriormente, sugeriu-se o termo M1/M2 para os macrófagos associados ao perfil Th1 ou Th2, respectivamente (MILLS et al., 2000). Os macrófagos ativados de forma clássica ou denominados de M1 estão associados à produção de TNF, IL-1 β , IL-12, aumento da capacidade de apresentação de antígenos, aumento da expressão de RNS (espécies reativas de nitrogênio) e ROS (espécies reativas de oxigênio), exercendo assim atividade microbicida e citotóxica, além de ampliar a indução do perfil Th1 nos linfócitos pela produção de IL-12. Já os macrófagos ativados de forma alternativa ou M2 são caracterizados como anti-inflamatórios, suprimindo a resposta imune e tendo funções associadas ao perfil Th2, como angiogênese, remodelação e reparo tecidual. Algumas citocinas são relacionadas a sua estimulação, como IL-4, IL-10 e IL-13 (ARORA et al., 2018).

Os macrófagos M1 e M2 apresentam ainda subdivisões, que foram correlacionadas mais especificamente com suas funções. Macrófagos M1 ou clássicos ativados por IFN- γ e LPS, como descrito anteriormente, foram chamados de M1a; os macrófagos ativados apenas por LPS foram chamados de M1b. Em relação aos macrófagos M2, o primeiro subgrupo foi denominado de M2a, diferenciados por IL-4 e IL-13 e dotados de papel anti-inflamatório e capazes de produzir superóxidos. O segundo subgrupo, denominado de M2b, reconhece complexos imunes e expressam receptores para LPS ou IL-1 e apresentam como característica a baixa produção de IL-12 (IL-12^{lo}) e alta produção de IL-10 (IL-10^{hi}). O subgrupo M2c é estimulado por glicocorticoides, IL-10 e TGF- β ; apresentam funções como remodelação e reparo tecidual, maior capacidade de fagocitar corpos apoptóticos, além de expressarem altos níveis de CD163, uma proteína associada à migração precoce para os locais que possuem feridas nas fases iniciais, cerca de 1 a 2 dias (ARORA et al., 2018; LURIER et al., 2017; MURRAY et al., 2014). Existe ainda um outro subgrupo, denominado de M2d, associado a neoplasias. São os macrófagos associados a tumores (TAMs) e secretam IL-6 (WANG et al., 2010).

Outro marcador importante na diferenciação entre os perfis de macrófagos é a expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e Arg1 nos perfis M1 e M2, respectivamente. Essas enzimas competem com o substrato L-arginina, um aminoácido não essencial para a formação de seus produtos. A iNOS metaboliza a L-arginina para formar os produtos óxido nítrico (NO) e citrulina, enquanto a Arg1 promove hidrólise desse mesmo aminoácido para formar ornitina e uréia. Pelo fato de ambas as enzimas utilizarem o mesmo substrato, acabam se tornando excludentes e por consequência, iNOS e Arg1 representam bons marcadores para os macrófagos M1 e M2, respectivamente (RATH et al., 2014). Vale lembrar que expressão de Arg1 não é utilizada em macrófagos humanos, sendo mais predominante em macrófagos murinos, pois no primeiro caso, a expressão dessa enzima é muito baixa, não sendo confiável para um marcador M2 (CHU et al., 2020).

Macrófagos M1 apresentam alta atividade microbicida e são responsáveis por eliminar microrganismos via fagocitose. Após a formação do fagossomo, a enzima *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase*, integrada na membrana fagossomal, remove um elétron da molécula NADPH (resultando em NADP^+) e doa para uma molécula de oxigênio, formando um anion superóxido (O_2^-). Esse processo é chamado de “*respiratory burst*”, devido ao aumento do consumo de oxigênio. O superóxido no interior do fagossomo é utilizado como precursor para a geração de ROS, formando, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MINAKAMI; SUMIMOTO, 2006).

Em paralelo, mesmo que macrófagos M2 apresentem produção de citocinas anti-inflamatórias e atividade de reparo tecidual, há trabalhos que identificaram a capacidade microbicida desses macrófagos no combate de algumas infecções. Um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa mostrou a capacidade microbicida de macrófagos M2 utilizando um modelo infecção e alergia. Os autores infectaram animais BALB/c com a cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* e, posteriormente, induziram alergia à OVA-albumina. Animais alérgicos (TB/OVA) apresentaram melhor controle da infecção quando comparados apenas ao grupo infectado (TB). Posteriormente, realizaram uma infecção *in vitro* de macrófagos M2 na presença ou ausência de $\text{IFN-}\gamma$ e observaram capacidade microbicida aumentada, comparável à de macrófagos M1 (PIÑEROS et al., 2017).

1.3. Tuberculose

1.3.1 Aspectos gerais

A tuberculose, doença causada por um único agente infeccioso, matou aproximadamente 1 pessoa a cada 24 segundos no ano de 2020, totalizando cerca de 1,3 milhões de mortes no decorrer do ano (WHO, 2021). Representou a segunda doença de maior morbimortalidade em 2020 e a foi a primeira até 2019, perdendo apenas para a COVID-19 e superando o HIV (WHO, 2021). Descoberto em 1882 por Robert Koch, *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch, é o agente etiológico da tuberculose (KOCH, 1882), sendo tido como patógeno mais bem sucedido da humanidade, considerando os achados compatíveis com infecções em seres humanos há mais de 10 mil anos (GAGNEUX, 2012). No mesmo ano da identificação do bacilo da tuberculose por Robert Koch, Elie Metchnikoff, considerado o pai da imunologia celular, constatou que células de larvas de estrelas do mar circundavam espinhos de rosas usados para perfurar essas mesmas larvas, descrevendo, originalmente, o processo da fagocitose (CAVAILLON, 2011; METCHNIKOFF, 1883), um dos mais importantes mecanismos microbicidas e de homeostase da imunidade inata, e fundamental para a eliminação de *M. tuberculosis*.

Aproximadamente $\frac{1}{4}$ da população mundial já entrou em contato com *M. tuberculosis*. Cerca de 90-95% da população apresenta a forma latente ou assintomática, enquanto os demais 5-10% desenvolvem a forma ativa ou sintomática, que afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas (WHO, 2021). Transmitidos por meio de aerossóis, os bacilos de Koch alojam-se nos pulmões, e causam predominantemente a doença pulmonar, embora outros órgãos possam ser afetados (FURIN; COX; PAI, 2019).

Após a infecção pelas vias aéreas superiores, *M. tuberculosis* é fagocitado por macrófagos alveolares, e posteriormente, por macrófagos do parênquima pulmonar, descritos como macrófagos do interstício pulmonar. Dependendo do *background* genético, do estado de ativação dos macrófagos, do tipo de macrófago, do número de bacilos nos pulmões e da cepa de micobactéria, os bacilos encontram nos macrófagos seu nicho de replicação, causando a tuberculose ativa, ou são eliminados pelos mesmos, esterilizando a infecção ou causando a tuberculose latente. Quase 140 anos depois da descoberta de *M. tuberculosis* e da fagocitose, é evidente o progresso no entendimento da interação dos macrófagos com *M. tuberculosis*, embora muitas lacunas no conhecimento permanecem a ser esclarecidas.

1.3.2 Infecção de células epiteliais por *M. tuberculosis*

Como já descrito, as células epiteliais apresentam capacidade de induzir resposta imunológica contra diversos tipos de microrganismos, como vírus, bactérias e helmintos. *M. tuberculosis* replica-se nas células epiteliais (GUO et al., 2013; MVUBU et al., 2017; RYNDIAK et al., 2015; RYNDIAK; LAAL, 2019), sendo a replicação 50 vezes superior nessas células quando comparada à células fagocitárias, como macrófagos (CASTRO-GARZA et al., 2002).

Acredita-se que a infecção das células epiteliais por *M. tuberculosis* ocorra de duas formas distintas. Estima-se que na inalação, aproximadamente 1-3 bacilos alcancem os sacos alveolares, podendo entrar em contato com células epiteliais ou macrófagos alveolares. Caso a bactéria entre em contato com a célula epitelial, ocorrerá a infecção com baixa carga bacteriana (1-3 bacilos). Em contrapartida, caso o bacilo entre em contato com macrófagos alveolares, a bactéria usará o macrófago como nicho para multiplicação, que resultará em morte e por consequência, liberação de uma alta carga bacteriana que entrará em contato com as células epiteliais (SCORDO; KNOELL; TORRELLES, 2016). Castro-Garza e colaboradores demonstraram através da cultura *in vitro* de células epiteliais alveolares denominada A549 que a infecção por *M. tuberculosis* espalha-se de forma adjacente entre as AEC, ou seja, uma célula epitelial é infectada e o bacilo multiplica-se, lisa a célula hospedeira e espalha-se para células epiteliais adjacentes (CASTRO-GARZA et al., 2002). A entrada do bacilo na célula epitelial pode ser benéfica para o patógeno, pois fornece um nicho de multiplicação pelo fato das AEC não serem fagócitos profissionais, impedindo assim que macrófagos e outros leucócitos fagocitem o bacilo e controlem a infecção (DOBOS et al., 2000).

Além da replicação intracelular, Pethe e colaboradores descobriram uma associação entre a infecção das células epiteliais por *M. tuberculosis* e sua disseminação para outros órgãos. Os autores utilizaram cepas de tuberculose, *M. tuberculosis* e *M. bovis*, depletadas para uma proteína chamada “*heparin-binding hemagglutinin*” (HBHA) que é capaz de mediar a adesão do bacilo a fagócitos não profissionais, como células epiteliais. As cepas mutantes apresentaram menor capacidade de invadir células epiteliais e não apresentaram crescimento prejudicado, quando comparadas às cepas selvagens. Os autores, então, infectaram animais C57BL/6 e observaram que as cargas bacterianas nos pulmões eram idênticas quando comparadas ambas as cepas; no entanto, as cepas mutantes apresentaram uma diminuição

significativa na colonização extrapulmonar, como no baço, quando comparadas às cepas selvagens, mostrando que a infecção era predominantemente nos pulmões. Para comprovar que isso era causado por uma disseminação prejudicada e não por defeito no crescimento, os autores realizaram uma infecção intraperitoneal e todas as cepas apresentaram crescimento similar no baço (PETHE et al., 2001).

A morte de células epiteliais também é outro fator relacionado com a disseminação da infecção por *M. tuberculosis*. Dobos e colaboradores demonstraram que cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Erdman) infectam células epiteliais A549 e induzem morte por necrose, enquanto as cepas avirulentas (H37Ra) induzem morte por apoptose (DOBOS et al., 2000). As cepas virulentas além de induzirem o aumento da expressão de genes antiapoptóticos, como genes da família *bcl-2* (B-cellCLL/lymphoma 2) e *Rb* (Retinoblastoma 1), também previnem a morte por apoptose e estimularam a morte da célula epitelial por necrose (DANELISHVILI et al., 2003). Um fato interessante, é que a taxa de crescimento bacteriano e a citotoxicidade que ocorreu nas células epiteliais não estão correlacionadas, ou seja, a necrose não era mediada por uma alta taxa de multiplicação bacteriana, já que ambas as cepas virulentas e avirulentas apresentaram crescimento semelhante (DOBOS et al., 2000).

1.3.3 Infecção de macrófagos por *M. tuberculosis*

Quando os bacilos atingem a região onde ocorrem as trocas gasosas, inicialmente, são reconhecidos por macrófagos alveolares que exibem perfil anti-inflamatório e não exibem mecanismos microbicidas suficientes (HUSSELL; BELL, 2014). Leemans e colaboradores realizaram a depleção farmacológica de macrófagos alveolares em camundongos BALB/c infectados com H37Rv e observaram um efeito protetor no controle da infecção e na sobrevivência dos animais (LEEMANS et al., 2001), indicando que na falta de mecanismos essenciais para a eliminação de patógenos, os AM servem como nicho de replicação, sendo a ausência dos mesmos um efeito benéfico no controle da infecção.

Cohen e colaboradores mostraram que o macrófago alveolar permite que os bacilos multipliquem-se e disseminem-se pelos pulmões. Utilizando a cepa H37Rv, os autores mostraram que o bacilo multiplica-se no interior dos AM de camundongos C57BL/6. Os AM migram do lúmen para o interstício do órgão, começam a se multiplicar e acabam levando à infecção de IM e de macrófagos derivados de monócitos, formando agregados celulares que dão origem aos granulomas. Esse processo de migração é mediado por uma resposta imunológica do próprio hospedeiro pela sinalização do receptor de IL-1. Uma parte dos

macrófagos alveolares infectados produzem IL-1 β por meio da ativação do inflamassoma pelo sistema de secreção ESX-1. A IL-1 β age nas células epiteliais pelo receptor IL-1R, desencadeando assim, a migração dos AM entre as células epiteliais até o interstício, possibilitando a disseminação dos bacilos (COHEN et al., 2018).

M. tuberculosis manipula o metabolismo de lipídios na célula hospedeira, sendo dependente de ácidos graxos e colesterol como suas fontes principais de carbono. Os AM de camundongos C57BL/6 infectados com *M. tuberculosis* Erdman apresentaram maior captação de ácidos graxos quando comparados aos IM também infectados. Isso resultou em maior taxa de replicação dos bacilos, menor taxa de mortalidade da bactéria, menor expressão de iNOS quando comparados aos IM. Inibindo de forma farmacológica a oxidação de ácidos graxos, ocorreu diminuição no número de bacilos quando comparados aos macrófagos não tratados. Isso indica que os AM utilizam a via de oxidação de ácidos graxos no contexto de infecção e que sua inibição reduz a replicação de *M. tuberculosis* (HUANG et al., 2018).

Um pouco da relação de IM com *M. tuberculosis* é exemplificada no trabalho onde Huang e colaboradores, ao descreverem que camundongos C57BL/6 infectados com *M. tuberculosis* Erdman apresentaram aumento de IM derivados de monócitos do sangue periférico, distintos da população de AM residente. Os autores também constataram maior controle da infecção pelos IM quando comparados aos AM. Os IM produziram mais NO. A capacidade protetora dos IM foi provada pelo experimento no qual a depleção de IM resultou em aumento de cerca de 10 vezes da carga bacteriana nos pulmões. Os IM utilizam, principalmente, a via glicolítica como fonte de energia; assim a inibição da glicólise resultou em diminuição no número de IM e aumento da carga bacteriana nos pulmões, sem alterar o número de AM (HUANG et al., 2018).

A realização de RNA-Seq de macrófagos AM e IM isolados dos pulmões de camundongos C57BL/6J infectados com *M. tuberculosis* Erdman revelou expressão gênica diferencial. IM apresentaram regulação positiva para genes associados à restrição de crescimento dos bacilos pelo sequestro de ferro. O transportador de ferro intracelular *Nramp1* foi fortemente expresso nos IM, sendo associado ao controle da infecção por restringir a disponibilidade de ferro no fagossoma. Em contraste, os AM apresentaram regulação positiva de genes que estavam associados ao crescimento de *M. tuberculosis*, como o aumento da expressão do fator de transcrição *Myc*, que induz uma polarização M2 no macrófago, sendo associado à liberação de ferro. Por fim, o RNA-Seq realizado na cepa Erdman mostrou que a

bactéria derivada de AM apresentava regulação positiva para genes associados ao armazenamento de ferro, sugerindo um ambiente rico em ferro, enquanto que a bactéria derivada do IM apresentava regulação de genes associados à baixa disponibilidade de ferro (PISU et al., 2020).

A polarização de macrófagos na infecção por *M. tuberculosis* foi observada por Redente e colaboradores, que descreveram no lavado brônquio alveolar (BAL), macrófagos F4/80 de perfil M1 (iNOS^{hi} e Arg1^{lo}) no 21º dia de infecção com a cepa Erdman via aerossol, correlacionando com os níveis mais altos de IFN- γ . Nos dias 35-60 de infecção, esses macrófagos advindos do BAL apresentaram perfil inverso, expressando mais Arg1^{high} e iNOS^{low}, caracterizando um perfil M2 associado a IL-4 (REDENTE et al., 2010). Então, sabendo como se comportam os macrófagos no BAL, os autores investigaram como se dava a polarização no interior do granuloma. Para isso, foi usada a imunohistoquímica para avaliar a expressão de iNOS e de Arg1 na região granulomatosa dos pulmões. Os autores descreveram que macrófagos mantinham a polarização para M1 nos tempos de 21 e 60 dias no interior do granuloma, enquanto os macrófagos da periferia, ou seja, macrófagos que estavam ao redor do granuloma apresentavam perfil M1 no dia 21, porém tiveram alteração para M2 no dia 60 de infecção (REDENTE et al., 2010).

Em comparação ao modelo murinho, Huang e colaboradores avaliaram a região pulmonar granulomatosa de pacientes de tuberculose que sofreram pneumonectomia e marcaram os macrófagos para a expressão de iNOS e CD206, um marcador para perfil de macrófagos M2. Os autores observaram que no interior do granuloma, houve a expressão média de iNOS (iNOS^{med}) e alta expressão de CD206 (CD206^{hi}), enquanto na periferia, os macrófagos expressavam um perfil misto, caracterizado por iNOS^{high} e CD206^{high} (HUANG et al., 2015a).

Um outro trabalho descreveu que pacientes com tuberculose ativa apresentavam níveis mais altos de IL-37, níveis esses correlacionados com a produção de outras citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10. Após o início do tratamento, a redução de IL-37 era acompanhada de aumento de IL-12 e IFN- γ . Os autores realizaram ainda a infecção de macrófagos THP-1 com H37Rv e observaram a produção de citocinas inflamatórias, indicando que a infecção induzia um perfil de macrófagos M1. No entanto, o tratamento da cultura celular com IL-37 exógeno alterou a polaridade dos macrófagos para M2, aumentando a expressão de CD206 em comparação ao CD86, um marcador para M1 (HUANG et al.,

2015b). O perfil de macrófagos M2 também foi observado em pacientes com tuberculose Multidroga-Resistente (MDR-TB). Um trabalho avaliou a prevalência de M1/M2 nos pulmões desses indivíduos por imunohistoquímica, e encontrou que o uso pirazinamida por 4 a 6 semanas promoveu maior prevalência de M2 em comparação aos indivíduos que receberam tratamento sem pirazinamida (CHO et al., 2020).

M. tuberculosis, como forma de evadir dos mecanismos microbicidas, rompe a membrana fagossomal secretando *6 kDa early secretory antigenic target* (ESAT-6) e *culture filtrate protein 10 kDa* (CFP10) pelo sistema de secreção ESX-1, inibindo mecanismos da imunidade inata (WONG, 2017). A ruptura da membrana do fagossomo permite os bacilos evadirem da contenção e chegarem no citosol, onde há maior disponibilidade de nutrientes e, por consequência, aumento da virulência (HOUBEN et al., 2012; MYRVIK; LEAKE; WRIGHT, 1984). Um trabalho mostrou que a cepa H37Rv sem o sistema de secreção ESX-1 ativava cerca de 30% menos receptores citosólicos, como NLRP3, em comparação com a cepa WT (BECKWITH et al., 2020), sugerindo que sem o sistema ESX-1, o bacilo permanece mais nos fagossomas.

Além do escape para o citosol, *M. tuberculosis* também evade da ativação de receptores citosólicos e evita a produção de citocinas inflamatórias (DONADO et al., 2020). Um trabalho isolou cepas de pacientes com tuberculose e classificou-as como virulentas e avirulentas, baseado nos sinais clínicos e imaginologia. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram infectados com essas cepas virulentas e avirulentas isoladas e foi possível observar que as cepas virulentas induziram menor produção de IL-1 β nos sobrenadantes em comparação com as cepas avirulentas. Essa menor produção foi associada à diminuição de mecanismos que ativam receptores citosólicos, como menor liberação de catepsina B e do efluxo de K⁺, e redução na ativação de AIM2 (*Absent in melanoma 2*) (SOUSA et al., 2020).

Utilizando amostras de pacientes, Franco e colaboradores mostraram que a efusão pleural proveniente de pacientes com tuberculose prejudicou a função de macrófagos M1 humanos derivados de monócitos. O contato desses macrófagos com a efusão pleural alterou a capacidade metabólica dessas células no momento da infecção com *M. tuberculosis*, induzindo assim um metabolismo mais associado a fosforilação oxidativa quando comparado a macrófagos que não entraram em contato com a efusão pleural, que apresentaram metabolismo mais associado a glicólise. Essa alteração metabólica resultou em aumento

interno da carga bacteriana nesses macrófagos em comparação aos macrófagos não tratados com efusão pleural, sugerindo pior resultado da infecção. Vale lembrar que os autores testaram efusões pleurais provenientes de outras patologias, como câncer, insuficiência cardíaca e efusão pleural parapneumônica, mas não resultou em alteração metabólica nos macrófagos (MARÍN FRANCO et al., 2020).

1.3.4 Tipo da morte do macrófago influencia na resposta imune

A persistência do macrófago pulmonar nos locais de inflamação está associada à destruição de tecido e desenvolvimento de fibrose, além de representar um marcador do caráter crônico da inflamação; conseqüentemente, a eliminação do macrófago do sítio de injúria auxilia na resolução da inflamação crônica (JANSSEN et al., 2011). Os precursores de macrófagos migram da medula óssea aumentando o *pool* após 35 horas de injúria, retornando aos níveis basais após 30 dias de infecção através da morte por apoptose. Muitas infecções persistentes evoluem para estado crônico, como a infecção por *M. tuberculosis*, que além de utilizar o macrófago como nicho, inibe ou altera a forma de morte celular para permitir a progressão da doença (JANSSEN et al., 2011; KELLY et al., 2008).

Os macrófagos infectados por *M. tuberculosis* podem morrer de diferentes formas, sendo as melhores descritas como apoptose e necrose (MICHELET et al., 2018). A apoptose é um mecanismo de defesa do hospedeiro que contribui para a imunidade inata e adaptativa contra *M. tuberculosis*. A apoptose limita o crescimento e disseminação do microrganismo por meio do sequestro dos bacilos em corpos apoptóticos, eliminando seu nicho celular e protegendo o tecido ao redor dos efeitos prejudiciais da resposta inflamatória (DHIMAN; RAJE; MAJUMDAR, 2007; ESPINOSA-CUETO et al., 2017; KELLY et al., 2008; MUSTAFA et al., 2007; SLY et al., 2003).

Em contrapartida, a morte por necrose permite a disseminação dos bacilos e evasão da resposta imune adaptativa, impedindo a apresentação de antígenos intracelulares e aumentando a infecção de células vizinhas (MICHELET et al., 2018; ZHAO et al., 2017). Quando os macrófagos morrem por necrose, não há diminuição na viabilidade dos bacilos como na apoptose, em que ocorre diminuição de cerca de 3 vezes na carga dos bacilos. Desse modo, é possível dizer que o tipo de morte afeta o controle e o crescimento de *M. tuberculosis*, sendo associado à virulência do microrganismo (ESPINOSA-CUETO et al., 2017; MOLLOY; LAOCHUMROONVORAPON; KAPLAN, 1994; SLY et al., 2003; ZHAO et al., 2017).

Cepas mais virulentas induzem morte necrótica em macrófagos, enquanto cepas menos virulentas induzem morte por apoptose (CHEN; GAN; REMOLD, 2006). Outra relação encontrada é com a multiplicidade de infecção (MOI); trabalhos mostram que macrófagos infectados com alta carga bacteriana são induzidos mais rapidamente à morte por necrose, enquanto macrófagos infectados com baixa carga bacteriana morrem mais lentamente e por apoptose. Lee e colaboradores mostraram que 90% dos BMDM infectados com *M. tuberculosis* Erdman (MOI 25) sofreram necrose em 20 horas após a infecção (LEE et al., 2006); em comparação, a infecção de macrófagos com H37Ra no MOI ≤ 10 levou ao pico da morte por apoptose em 3 a 4 dias após a infecção (KEANE et al., 1997).

Corroborando as informações descritas, Sly e colaboradores mostraram que macrófagos THP-1 infectados com H37Rv expressaram níveis mais altos da proteína MCL-1, uma proteína antiapoptótica membro da família BCL-2. A redução farmacológica dessa proteína aumentou os níveis de apoptose dos macrófagos THP-1 infectados com cepa virulenta em comparação com macrófagos não inibidos farmacologicamente (SLY et al., 2003).

M. tuberculosis utiliza o macrófago como nicho para replicação, aumentando assim a carga intracelular de bacilos, e quando atinge o seu potencial, descarta o macrófago através de diferentes formas de morte celular, que são dependentes da virulência da cepa. Quando o macrófago já possui um MOI alto na infecção, é observada uma rápida indução de morte, que possibilita maior e mais rápida disseminação de *M. tuberculosis* quando comparado com MOI menores (AMARAL et al., 2019), além do bacilo aumentar sua replicação após o rompimento da membrana plasmática (LERNER et al., 2017).

A morte celular é regulada por sinais internos ou externos que desencadeiam uma cascata de mecanismos subsequentes que levam ao colapso celular. A mitocôndria é um componente essencial nesse processo, sendo a morte por apoptose um mecanismo que ocorre de forma intrínseca ou extrínseca. A via intrínseca é dada pela permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, ocorrendo um desbalanço entre as proteínas antiapoptóticas, BCL-2, e proapoptóticas, BAX, induzindo a liberação de componentes como citocromo c e ativação da caspase 9. A via extrínseca envolve a estimulação de receptores de morte celular, como receptores da família do TNF, podendo levar ao aumento da permeabilidade da membrana interna da mitocôndria e ocorrendo a “*mitochondrial permeability transition*” (MPT) que

diminui a integridade da membrana, levando à morte por apoptose com a participação da caspase 8 (MUSTAFA et al., 2007; ZHAO et al., 2017).

A inibição da apoptose na infecção com cepas virulentas, como H37Rv, desencadeia a formação de complexos chamados “*Receptor interacting protein kinase 1 e 3*” (RIPK1 e RIPK3). A inibição da apoptose pode acontecer através de proteínas antiapoptóticas como sTNFR2, BCL-X_L, supressão de caspases e entre outros mecanismos que podem levar à formação desses complexos em macrófagos humanos e murinos infectados com H37Rv. Quando isso ocorre, desencadeia-se a necroptose, que é uma morte celular do tipo necrótica, mas estimulada por sinais apoptóticos que, no entanto, sofreram inibição no momento da execução. A apoptose normalmente inicia-se com a ativação do receptor Fas/CD95 ou do receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1), juntamente com a ativação de caspase 8, que interage com RIPK1 levando à morte celular apoptótica. Quando ocorre a inibição de caspase 8, RIPK1 se liga então ao RIPK3 e ambos se autofosforilam, RIPK3 fosforila a proteína “*mixed lineage kinase domain-like*” (MLKL) que migra para a membrana plasmática e forma poros na membrana, levando a necroptose (BUTLER et al., 2017; STUTZ et al., 2018).

Os macrófagos infectados por *M. tuberculosis* que morrem por apoptose e têm seus corpos apoptóticos fagocitados por células adjacentes, como macrófagos e células dendríticas, um processo conhecido como eferocitose, auxiliam no desenvolvimento de uma resposta adaptativa mediada por linfócitos T citotóxicos. Espinosa-Cueto e colaboradores observaram que células dendríticas provenientes da medula óssea conseguiram fagocitar corpos apoptóticos de BMDM infectados com *M. smegmatis* e estimulavam a proliferação de células TCD8⁺, auxiliando assim na indução da imunidade adaptativa por apresentação cruzada (*cross-priming* ou *cross-presentation*) (ESPINOSA-CUETO et al., 2017). Esses dados são corroborados com as observações de Divangahi e colaboradores, que observaram que sem a apoptose não ocorreria a formação precoce de uma imunidade adaptativa específica mediada por células TCD8⁺ (DIVANGAHI et al., 2010).

Winau e colaboradores também mostraram isso de forma elegante *in vivo*. Os autores infectaram macrófagos murinos com cepas BCG associadas à ovalbumina (BCG-OVA) e observaram a formação de corpos apoptóticos. Em seguida, esses corpos apoptóticos contendo a bactéria BCG-OVA foram transferidos para animais, juntamente com linfócitos TCD8⁺ marcados com CFSE (marcador de proliferação) específicos para ovalbumina (OT-I). Os autores encontraram proliferação de linfócitos TCD8⁺ OT-I em animais que receberam corpos

apoptóticos infectados com BCG-OVA quando comparado aos animais que receberam as vesículas infectadas apenas com BCG, indicando que ocorre apresentação cruzada e ativação de linfócitos T citotóxicos a partir de células que estão em apoptose. Os autores mostraram ainda que essas vesículas sozinhas não induzem a resposta imune, mas necessitam de células dendríticas que migram até o linfonodo e fazem o *cross-priming* para linfócitos TCD8⁺ (WINAU et al., 2006).

Stutz e colaboradores demonstraram o papel da apoptose pela primeira vez *in vivo*, utilizando uma correlação entre morte por necrose e apoptose. Inicialmente, os autores infectaram animais *MLKL*^{-/-} com a cepa H37Rv e não observaram diferença no controle bacteriano. Posteriormente, infectaram animais deficientes para caspase 8 (*Casp8*^{-/-}*MLKL*^{-/-}) e observaram que havia um aumento bacteriano após 4 semanas de infecção. Vale lembrar que o animal apenas deficiente para caspase 8 é inviável, sendo necessário ser um duplo KO. Os autores então quantificaram as células nos pulmões desses animais duplos KO e observaram um aumento na prevalência de macrófagos em comparação ao animal WT, sugerindo que sem a apoptose o macrófago permanece vivo sendo um nicho para a multiplicação bacteriana. Para finalizar, calcularam a porcentagem de linfócitos específicos para *M. tuberculosis* nos pulmões dos animais infectados e encontraram diminuição no número de TCD4⁺ nos animais *Casp8*^{-/-}*MLKL*^{-/-} quando comparados aos WT, realçando a importância da morte por apoptose para uma indução adequada da imunidade adaptativa (STUTZ et al., 2021).

Quando *M. tuberculosis* é fagocitado pelo macrófago, libera componentes como ESAT-6, como já citado anteriormente, que danifica a membrana plasmática e desencadeia mecanismos que induzem à morte do macrófago (BANKS et al., 2019; BECKWITH et al., 2020). O dano causado na membrana plasmática por cepas virulentas não é reparado eficientemente pelas vesículas lisossomais, levando a necrose, enquanto que o dano causado por cepas menos virulentas permite o reparo por lisossomos e induz apoptose (MICHELET et al., 2018).

Beckwith e colaboradores mostraram que o dano causado na membrana plasmática de macrófagos THP-1 infectados com H37Rv, ativa o inflamassoma NLRP3 pelo efluxo de potássio, gerando caspase-1 ativa que cliva gasdermina D, que por sua vez migra para a membrana plasmática, formando diversos poros e permitindo a evasão de *M. tuberculosis*. Os macrófagos, nesse caso, sofrem outro tipo de morte por necrose, chamada piroptose (BECKWITH et al., 2020).

Pagán e colaboradores mostraram em modelo experimental com peixe-zebra e em células humanas que não expressavam “*mammalian target of rapamycin*” (mTOR), o aumento na susceptibilidade dos macrófagos à infecção por *M. marinum*. mTOR age na mitocôndria e a deixa mais ativa através da geração de energia pela fosforilação oxidativa durante a infecção, protegendo-a contra o dano causado pelo ESAT-6 e evitando, assim, que macrófagos sucumbam rapidamente após a infecção (PAGÁN et al., 2022).

1.4. Células epiteliais e macrófagos na tuberculose

A interface da célula epitelial com o macrófago na infecção por *M. tuberculosis* é pouco explorada. Ainda menos explorada quando a primeira célula infectada, ou o ponto de início da infecção é a célula epitelial. Pasula e colaboradores demonstraram como AEC podem influenciar macrófagos alveolares a controlar a infecção pela cepa *M. tuberculosis* Erdman. Os autores utilizaram um modelo de co-cultura, no qual na porção inferior, plaquearam uma linhagem murina de célula epitelial alveolar chamada MLE-15 e a trataram com salina ou fator de crescimento para queratinócitos (KGF) durante a noite. Na porção superior, os autores plaquearam macrófagos murinos chamados RAW 264.7 com uma multiplicidade de infecção de 10:1 e deixaram em co-cultura durante 5 dias. Após esse período, foi observada uma diminuição na carga bacteriana de 2,5 vezes nas culturas estimuladas com KGF em comparação àquelas em presença apenas de salina. Os autores comprovaram que o KGF induzia a produção de GM-CSF por células epiteliais, e o GM-CSF aumentava os mecanismos microbicidas dos macrófagos (PASULA et al., 2015).

Outro trabalho que mostra esse papel central da célula epitelial na infecção por *M. tuberculosis* foi feito por Sato e colaboradores, que realizaram co-cultura independente de contato de células epiteliais com monócitos humanos. Os autores infectaram ou não células epiteliais alveolares de linhagem chamadas A549 e colocaram em cultura com monócitos de linhagem chamados Mono-Mac-6 também infectados com *M. tuberculosis*. A co-cultura com ambas as células infectadas resultou em redução da carga bacteriana no interior dos monócitos em comparação com a co-cultura em que apenas o monócito estava infectado, ou seja, a infecção da célula epitelial induziu a produção de componentes que medeiam o controle bacteriano. Os autores utilizaram anticorpos monoclonais para investigar qual componente estaria induzindo esse fenômeno. A adição de anticorpo contra GM-CSF na cultura aumentou excessivamente a carga bacteriana no interior dos monócitos, sugerindo um papel importante dessa citocina na relação de AEC com macrófagos (SATO et al., 2002).

Além de citocinas, Chuquimia e colaboradores mostraram alteração na expressão de receptores de superfície em macrófagos murinos após o contato com células epiteliais. As células epiteliais primárias foram estimuladas previamente com LPS por 24 horas; o sobrenadante foi coletado e colocado em contato com macrófagos por 24 horas. Macrófagos pré-tratados com esse sobrenadante apresentaram maior expressão do receptor de manose quando comparado a macrófagos tratados com sobrenadante de célula epitelial não estimulada. Quando em contato com *M. tuberculosis*, esses macrófagos apresentaram maior capacidade de fagocitose, além de maior controle bacteriano após 48 horas de infecção, quando comparados aos macrófagos estimulados com sobrenadantes de células epiteliais não tratadas com LPS (CHUQUIMIA et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A resposta imune contra a tuberculose é heterogênea e varia entre indivíduos e populações, pois apresenta diferentes fatores intrínsecos, como o *background* genético nos polimorfismos gênicos e modificações epigenéticas, e fatores extrínsecos como a virulência do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, comorbidades, coinfeções, fatores socioeconômicos, como desnutrição, tabagismo e consumo de álcool, que no fim resultam em diferentes desfechos clínicos. Esses desfechos são a eliminação completa do bacilo pela imunidade inata, controle bacteriano pela imunidade adaptativa ou ainda a falha na ação conjunta de ambas as respostas imunes que culminam no desenvolvimento de tuberculose ativa.

A ação de uma resposta imune efetora é mediada por um conjunto de interações diferentes, principalmente as interações celulares. Essas interações medeiam a maturação e a ação de leucócitos contra patógenos, secreção de mediadores inflamatórios e aumento na atividade microbicida por fagócitos. Nos momentos iniciais da infecção por *M. tuberculosis*, a interação da célula epitelial com macrófagos e a consequência disso para o desfecho da infecção, ainda é pouco investigado. A ideia de descobrir mecanismo moleculares iniciais que guiam a infecção é de extrema importância, ainda mais considerando o papel central que a célula epitelial exerce em outras infecções, como na pandemia da COVID-19 (Fraga-Silva et al., 2022, submetido). Além de esclarecer o conhecimento básico do assunto, o entendimento da interface da célula epitelial com macrófago permitirá o conhecimento do controle ou progressão da infecção, e a identificação de possíveis alvos que poderão modular a imunidade inata *in vivo*, e poderão auxiliar em melhor prognóstico clínico e manejo da doença.

Tendo isso em mente e os mecanismos de ação da célula epitelial que foram descritos anteriormente, juntamente ao fato de que a resposta imune é heterogênea na tuberculose, podendo as AEC serem responsáveis pelo desfecho clínico inicial, a hipótese desse trabalho é que a resposta das células epiteliais nos momentos iniciais da infecção por *M. tuberculosis* guie a resposta inata do hospedeiro, principalmente, a ação dos macrófagos para a eliminação precoce dos bacilos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a interação de AEC-II infectadas por *M. tuberculosis* com macrófagos.

3.1.2 Objetivos específicos

- Entender se AEC-II atuam na polarização de macrófagos;
- Avaliar o tipo de morte celular que ocorre nos macrófagos infectados após a interação com as AEC;
- Avaliar se a transferência de macrófagos tratados com sobrenadantes de células epiteliais infectadas é protetora ou não seguindo-se do desafio *in vivo* com os bacilos;
- Avaliar o tipo de morte celular das células epiteliais pulmonares após a infecção com *M. tuberculosis in vivo*.
- Avaliar o perfil e a ativação de macrófagos dos animais receptores após transferência de macrófagos tratados com sobrenadantes de células epiteliais infectadas seguida de infecção com *M. tuberculosis in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Células epiteliais alveolares: Células epiteliais alveolares imortalizadas de pulmões de camundongo (linhagem *Murine Lung Epithelial* 15 [MLE-15]) foram cultivadas em meio HITES, meio contendo RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 5 mg/L de insulina, 10 µg/mL de transferrina, 3 ng/mL de selenito de sódio, 10 nM de hidrocortisona, 10 nM de β-estradiol e 1% de penicilina/estreptomicina (RPMI completo). Atmosfera: 95% ar; 5% CO₂. Temperatura: 37°C.

2. *Mycobacterium tuberculosis*: A cepa H37Rv (American Type Culture Collection 27294, Rockville, MD, USA) foi crescida em meio 7H9 (Sigma, M0178-500G), contendo glicerol, Tween 80 e OADC, até atingir uma densidade óptica (D.O.) entre 0,6 e 0,8. O meio 7H9 foi retirado através de centrifugação em tubos de centrífuga de 50 mL na rotação de 3000 x g por 10 minutos, posteriormente lavados com 7H9 e novamente centrifugado nas mesmas condições. Em seguida, foram feitas alíquotas em microtubos no volume de 0,5 mL com a D.O. ajustada para 1. Em paralelo, 100 µL de meio 7H9 contendo a bactéria H37Rv foi diluído na escala de 10⁻⁸ e as quatro últimas diluições foram plaqueadas em 7H11 para ajustar a concentração. Após o período de 3-4 semanas, foi feita a contagem das colônias. Em seguida, as alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

3. Preparação do inóculo de *Mycobacterium tuberculosis* e infecção das células MLE-15 e BMDM: O microtubo com concentração pré-definida contendo a cepa H37Rv foi descongelado em temperatura ambiente e a quantidade de bactéria a ser utilizada foi calculada tendo em vista a multiplicidade de infecção (MOI). Essa quantidade foi passada para um tubo de centrifuga de 15 mL e completada para 1 mL com PBS 1x e centrifugado a 4700 x g por 10 minutos. Após esse processo, as micobactérias foram ressuspensas em meio RPMI sem estreptomicina para infecção das células MLE-15 ou BMDM na concentração de 1 x 10⁸ bactérias por mL. As células MLE-15 e BMDM foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁶ células por poço em placa de 24 poços (Corning, Costar 3526). O plaqueamento foi feito no dia anterior, *overnight*, para que as células aderissem. No dia da infecção, o inóculo de *M. tuberculosis* foi preparado como descrito, e as células tiveram seu meio trocado por um novo no volume final de 400 µL por poço. As bactérias foram adicionadas no volume de 100 µL. A placa incubada por 4 horas na atmosfera de 95% ar, 5% CO₂ e temperatura de 37°C. Após esse período, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e lisadas com saponina 0,05%, seguindo-se a realização de diluições até 1 x 10⁻⁷. Para a realização do ensaio de fagocitose, as

últimas 4 diluições foram plaqueadas em placas de 7H11, durante 3 a 4 semanas, a 37°C e 5% de CO₂. Para gerar os sobrenadantes oriundos das culturas de células epiteliais infectadas ou não, descrito como meio condicionado, ou os sobrenadantes de BMDM para detecção de citocinas, as culturas celulares foram lavadas com PBS 1x após 4 horas, seguindo-se a troca de meio de cultura e incubação por 24, 48 ou 72 horas, dependendo do delineamento experimental.

4. Obtenção dos meios condicionados: Após a infecção das células MLE-15, para obtenção do meio condicionado oriundo das células infectadas, as mesmas foram lavadas após 4 horas com PBS 1x como descrito anteriormente e foram completadas para 1 mL de meio HITES por poço. As células ficaram na estufa por 48 horas na condição de 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados em tubos de centrifuga de 50 mL e centrifugados a 1700 x g por 10 minutos para remover fragmentos celulares. O meio condicionado ou sobrenadantes das células infectadas foi descrito como ICM (*Infected Cell Medium*), enquanto o sobrenadante de células não infectadas foi descrito como NICM (*Non-Infected Cell Medium*). Os sobrenadantes foram filtrados em filtros de 0,22 µM, aliquotados e armazenados em freezer à -20°C.

5. Animais: Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 SPF (*Specific Pathogen Free*) selvagens (WT - *Wild Type*), de 6-8 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos em microisoladores em laboratório nível II com livre acesso à água e ração. Os procedimentos de manutenção de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo n° 249/2019) de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Para eutanásia, os camundongos receberam dose excessiva de anestésicos, administrados por via intraperitoneal (quetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg).

6. Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM): Retiramos a medula óssea dos fêmures e das tíbias, lavamos o canal medular para retirada de precursores celulares. Centrifugamos as células à 423 x g por 10 minutos e lisamos as hemácias em tampão ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*). Posteriormente, as suspensões celulares foram ressuspensas em meio RPMI contendo 20% SFB, 1% antibiótico-antimicótico 100x

(Gibco) (RMPI completo) acrescentando 40% de sobrenadante derivado da cultura de L929, contendo Fator estimulador de macrófagos (M-CSF), em volume final de 8 mL. No 3º ou 4º dia de diferenciação, foram adicionados mais 8 mL de meio com todos esses constituintes novamente. No 7º dia, as células aderentes foram coletadas utilizando PBS 1x gelado.

7. Tratamento de BMDM: Os macrófagos foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células por poço em placa de 24 poços (Corning, Costar 3526), e incubados *overnight* para aderência. Posteriormente, os macrófagos foram cultivados por 24 horas como segue: apenas meio (500 μ L), LPS (500 ng/mL), IFN+LPS (200 ng/mL e 100 ng/mL, respectivamente) ICM (500 μ L) ou NICM (500 μ L).

8 Detecção de citocinas: As citocinas IL-1 β (limite de detecção [LD]: 15,6 pg/mL), TNF (LD: 31,3 pg/mL), IL-6 (LD: 15,6 pg/mL), e IL-10 (LD: 31,3 pg/mL) foram determinadas nos sobrenadantes das culturas de células MLE-15 e ou de BMDM nos tempos de 24, 48 ou 72 horas por ensaio imunoenzimático utilizando *kits Opteia* (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) ou *DuoSet* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), seguindo-se as instruções do fabricante.

9. Produção de NO: A produção de NO foi mensurada indiretamente através da concentração de NO₂- (nitrito) produzido pelas células MLE-15 infectadas ou por BMDM, utilizando o ensaio colorimétrico de Griess com posterior leitura por espectrofotômetro, conforme previamente descrito (ROY et al., 2004).

10. Processamento do pulmão e suspensão de células: Os lóbulos dos pulmões foram separados, fragmentados e incubados em solução contendo DNase (0,055 mg/mL) e colagenase (2,2 mg/mL) por 50 minutos, 37°C. A digestão foi interrompida com a adição de EDTA 10 mM. A suspensão de células foi passada por *cell strainer* de 40 μ m e centrifugada a 320 x g por 6 minutos. As células foram resuspensas em 1 mL de PBS 1x, e separadas para a realização do ensaio de CFU e para a marcação por citometria de fluxo como descrita no tópico 14 de materiais e métodos.

11. Infecção e transferência de BMDM pela via Orofaríngea: Antes da transferência, BMDM nas condições experimentais de NICM e ICM foram corados com PKH67 (Invitrogen). Os animais foram anestesiados através da via inalatória utilizando Isoforina (Isoflurano, 1 mL/mL) em uma atmosfera contendo 5% de isofluorano, com fluxo de 1 litro por minuto (LPM) pelo equipamento de anestesia inalatória por infusão (Bonther).

Após os procedimentos descritos, o animal teve sua língua condicionada para fora da região bucal e foram administrados 30 µL do inóculo contendo 1×10^2 ou 1×10^5 bactérias ou 0,5 a 1×10^6 de BMDM na sua porção orofaríngea, permitindo assim que essa solução chegue nas vias aéreas e não seja deglutida. Os animais foram acompanhados até o retorno da anestesia.

12. Homogenato de pulmões: O homogenato foi obtido como descrito anteriormente (MARTINS et al., 2021). Os lóbulos esquerdos dos animais foram macerados em microtubos contendo inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e centrifugados a 3220 x g durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e mantidos à -20°C .

13. Histopatologia: O processamento do material histopatológico foi realizado como descrito por Prado e colaboradores (PRADO et al., 2015). Os lóbulos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação do infiltrado inflamatório. A análise foi feita pelos critérios de Dormans e colaboradores, baseada nos parâmetros de perivasculite, peribronqueolite, alveolite e ocupação do tecido. Para cada parâmetro uma pontuação de 1 a 5 determinava o *score* final, somando-se todos esses pontos, podendo ter pontuação máxima de 20, e quanto mais alto o valor, maior a inflamação presente no tecido. O critério “ocupação do tecido” se refere à parte do tecido que perdeu a estrutura do parênquima, sendo todo preenchido por células (DORMANS et al., 2004).

14. Marcação para citometria: Os BMDM foram marcados com anticorpos monoclonais contra CD64 APC (X54-5/7.1), CD11b BB515 (M1/70), Arg1 PE (A1exFS), NOS2 PerCP-eFluor 710 (CXNFT), Anexina V APC. Os macrófagos (1×10^6) foram lavados com PBS 1x e, posteriormente, marcados com a sonda de viabilidade *Fixable Viability Stain* (FVS) (BD Horizon) por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram lavados novamente com tampão de marcação constituído por PBS EDTA (*autoMACS Rinsing Solution*, Miltenyi Biotec) com 0,5% de *MACS BSA Stock Solution* (Miltenyi Biotec) e incubados com os anticorpos extracelulares por 30 minutos a 4°C protegido da luz. As amostras foram lavadas com tampão de marcação e fixadas com *Cytofix/Cytopern* (BD Biosciences Pharmingen) por 20 minutos. As amostras foram então lavadas com *buffer Perma/Wash* diluídos 10x (BD Biosciences). Os anticorpos para marcação intracelular contra Arg1 PE (A1exFS) e contra NOS2 PerCP-eFluor 710 (CXNFT) foram adicionados e as amostras foram deixadas a 4°C protegido da luz. Após 30 minutos foram lavados novamente com *buffer Perma/Wash* diluídos 10x (BD Biosciences). Para a marcação com Anexina V, as amostras foram primeiramente incubadas com os anticorpos para a marcação extracelular, e em seguida foram

lavadas com *Annexin V Binding Buffer* (Invitrogen), e marcadas com Anexina V diluída em *Annexin V Binding Buffer* por 15 minutos a 4°C protegido da luz. Em seguida, essas amostras foram fixadas com *Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set* (eBioscience). Posteriormente, as amostras seguiram o protocolo de marcação intracelular já descrito. Para a marcação de amostras de pulmões, o tecido sofreu digestão como descrito no tópico 10 dos materiais e métodos. Foram realizadas marcações para painéis de células epiteliais, sendo *Live Dead* (Invitrogen), anticorpo contra CD45 PE-Cy7 (30-F11), CD31 PE-Cy7 (390), Epcam PE (G88.8) e MHC-II PerCP (M5/114.15.2) e painel para macrófagos, *Live Dead* (Invitrogen), anticorpo contra CD64 PE (X54-5/7.1), Siglec-F PerCP-eFLuor 710 (1RNM44N), PKH67 (Sigma-Aldrich, USA), Arg1 PE-Cy7 (A1exFS), iNOS PE-Cy7 (CXNFT), IL-6, IL-1 β e Anexina V. Para cada amostra, 1 x 10⁶ de células foram marcadas. As análises foram feitas utilizando o software FlowJo versão 10 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram adquiridos 200 mil eventos para painéis que avaliaram macrófagos e 500 mil eventos para painéis que avaliaram células epiteliais.

15. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias (CFU).

Após a digestão dos fragmentos pulmonares ou a lise das células *in vitro* com saponina 0,05%, uma alíquota no volume de 100 μ L foi retirada e submetida à diluição seriada em PBS 1x estéril. Em seguida, o volume de 100 μ L das diluições 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴, (para o tecido pulmonar infectado com CFU de 1 x 10²), 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶, (para o tecido pulmonar infectado com CFU de 1 x 10⁵) e 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ (para as células *in vitro*) foi plaqueado em meio sólido 7H11 (Sigma, M0428-500G). As placas foram incubadas à 37°C por 3 a 4 semanas.

16. Cultura de células pulmonares para marcação de citocinas intracelular: após a digestão dos pulmões, como descrito no tópico 10 dos materiais e métodos, 1 x 10⁶ células foram distribuídas em placas de 96 poços (Corning, Costar 3799) em RPMI com 10% de SFB, LPS (100 μ g/mL), monensina (0,667 μ L/mL, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), brefeldina (1 μ L/mL, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e incubadas por 4 horas à 37°C. Posteriormente, as células foram marcadas para citometria.

17. Análise estatística: O software GraphPad Prism Versão 8.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado para fazer as análises estatísticas. Todos os resultados passaram pelo teste de normalidade e todo valor atípico foi removido pelo teste de *outlier* para que as amostras não estejam fora dos parâmetros normais. As comparações de

dois grupos foram analisadas pelo teste t paramétrico ou não paramétrico e as comparações de três ou mais grupos foram calculadas por ANOVA *Two* ou *one-way* paramétrico ou não paramétrico. Os dados foram apresentados como média de valores individuais \pm desvio padrão (DP), e os resultados foram considerados significativos quando o valor de p fosse menor ou igual a 0,05. Para as análises de citometria, foi utilizado o software FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences).

5. RESULTADOS

Para avaliar a interação das células epiteliais com macrófagos, as células MLE-15 foram infectadas ou não com H37Rv MOI 10 por 48 horas e os sobrenadantes foram coletados e descritos como meio condicionado derivado de células infectadas (*Infected Cell Medium* - ICM) ou meio condicionado derivado de células não infectadas (*Non-Infected Cell Medium* - NICM). O meio condicionado foi usado para dosagem de IL-10, TNF, IL-6, GM-CSF e produção de óxido nítrico. As células MLE-15 foram avaliadas em relação a carga bacteriana no tempo de 4, 24 e 48 horas. E para avaliar a interação celular, macrófagos derivados de precursores da medula óssea (BMDM – *Bone Marrow Derived Macrophages*) foram deixados em contato com NICM ou ICM por 24 horas para posterior avaliação de parâmetros, como a polarização e a produção de citocinas (**Figura 2A**). A estratégia de análise usada para avaliar a polarização de BMDM por citometria de fluxo, após o tratamento com ICM e NICM, é apresentada na **Figura 1A**.

Após a infecção, as células epiteliais secretaram concentrações significativas de IL-6 e de óxido nítrico, avaliado pela quantificação de nitrito (NO₂⁻) nos sobrenadantes, resultados que serão apresentados mais à frente. A infecção também aumentou significativamente a produção de GM-CSF pelas células epiteliais, quando comparado às células não infectadas (**Figura 2C**). As células MLE-15 não produziram IL-10 e TNF após 48 horas de infecção *in vitro*, como já reportado por nosso grupo (RODRIGUES et al., 2020). A contagem de CFU das culturas de células epiteliais mostraram que a célula é permissiva à infecção por *M. tuberculosis* H37Rv (**Figura 2B**). Para avaliar a polarização dos macrófagos para M1 ou M2, após as 24 horas, os BMDM foram marcados com iNOS (M1) e Arg1 (M2), de modo que os fenótipos finais de interesse eram: CD64⁺CD11b⁺iNOS⁺Arg1⁻ ou CD64⁺CD11b⁺iNOS⁻Arg1⁺. A estimulação com LPS induziu grande aumento na expressão de iNOS, no grupo controle LPS, sugerindo polarização para M1 (**Figura 2D**), enquanto o contato com ICM promoveu maior expressão de Arg1, sugerindo um perfil associado à resposta imune do tipo 2, chamando assim essas células de M2-like (**Figura 2E**). Também quantificamos o número de células que apresentaram aumento de Arg1 (**Figura 2F**). A **Figura 2G** ilustra a análise representativa de citometria das diferentes condições de tratamento para a expressão de Arg1 e iNOS.

A **Figura 3A-3E** mostra a produção de citocinas por BMDM não tratados (controle negativo, meio de cultura apenas) ou estimulados com LPS (controle positivo). Os BMDM

tratados por 24 horas com ICM produziram níveis significativos de IL-10 (**Figura 3F**), IL-1 β (**Figura 3G**) e TNF (**Figura 3H**) quando comparados ao tratamento com NICM. Os macrófagos não produziram IL-6 (**Figura 3I**) ou óxido nítrico (**Figura 3J**), sendo os valores encontrados provenientes do sobrenadante gerado pelas células epiteliais infectadas, como indicado pela linha tracejada. As células epiteliais não infectadas não produziram IL-6 ou óxido nítrico (**Figura 3I e 3J**).

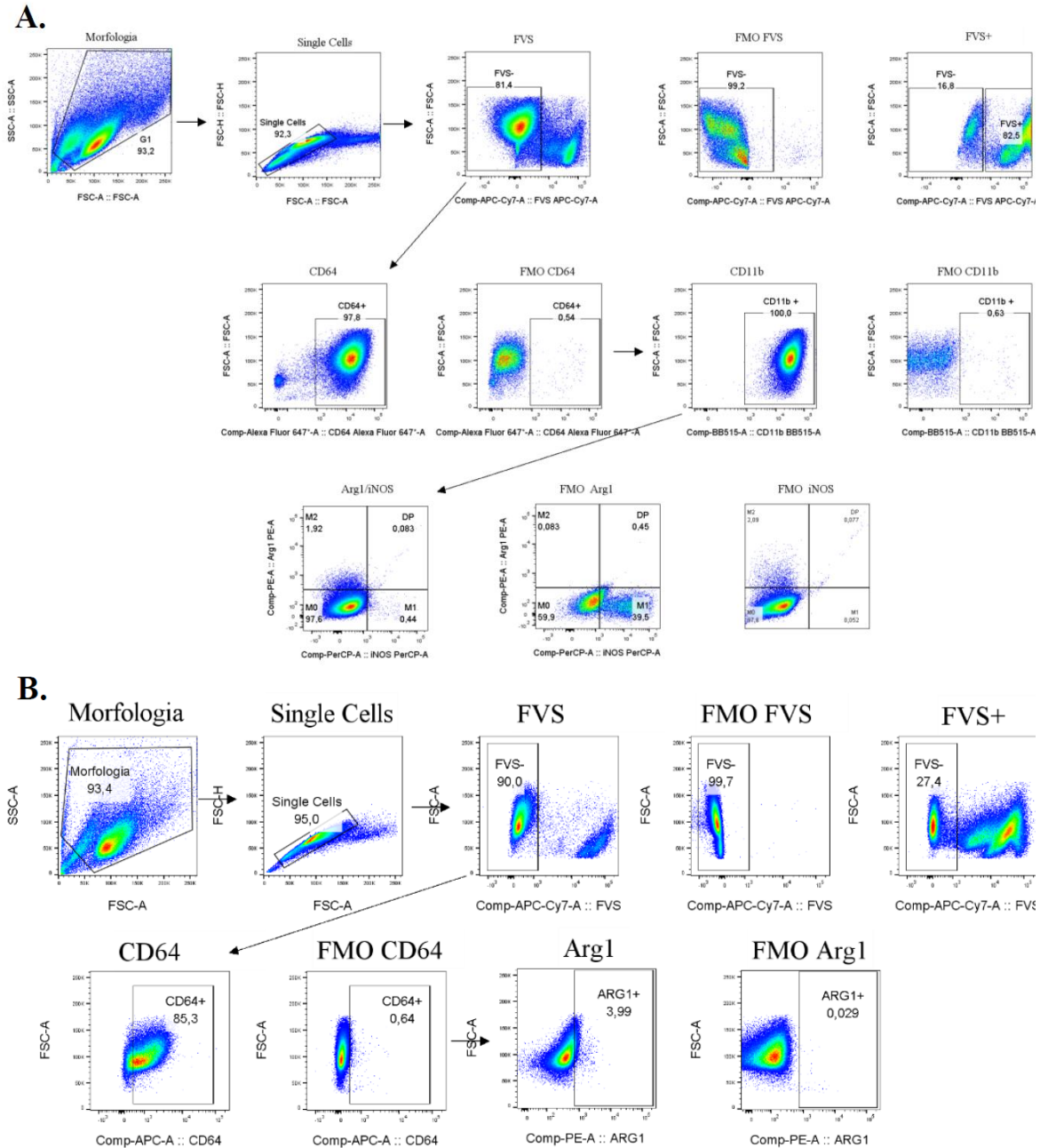


Figura 1. Estratégia de análise de macrófagos expostos ao ICM. A. Estratégia de análise de BMDM exposto por 24 horas ao ICM. **B.** Estratégia de análise de AMJ2-C11 exposto por 24 horas ao ICM.

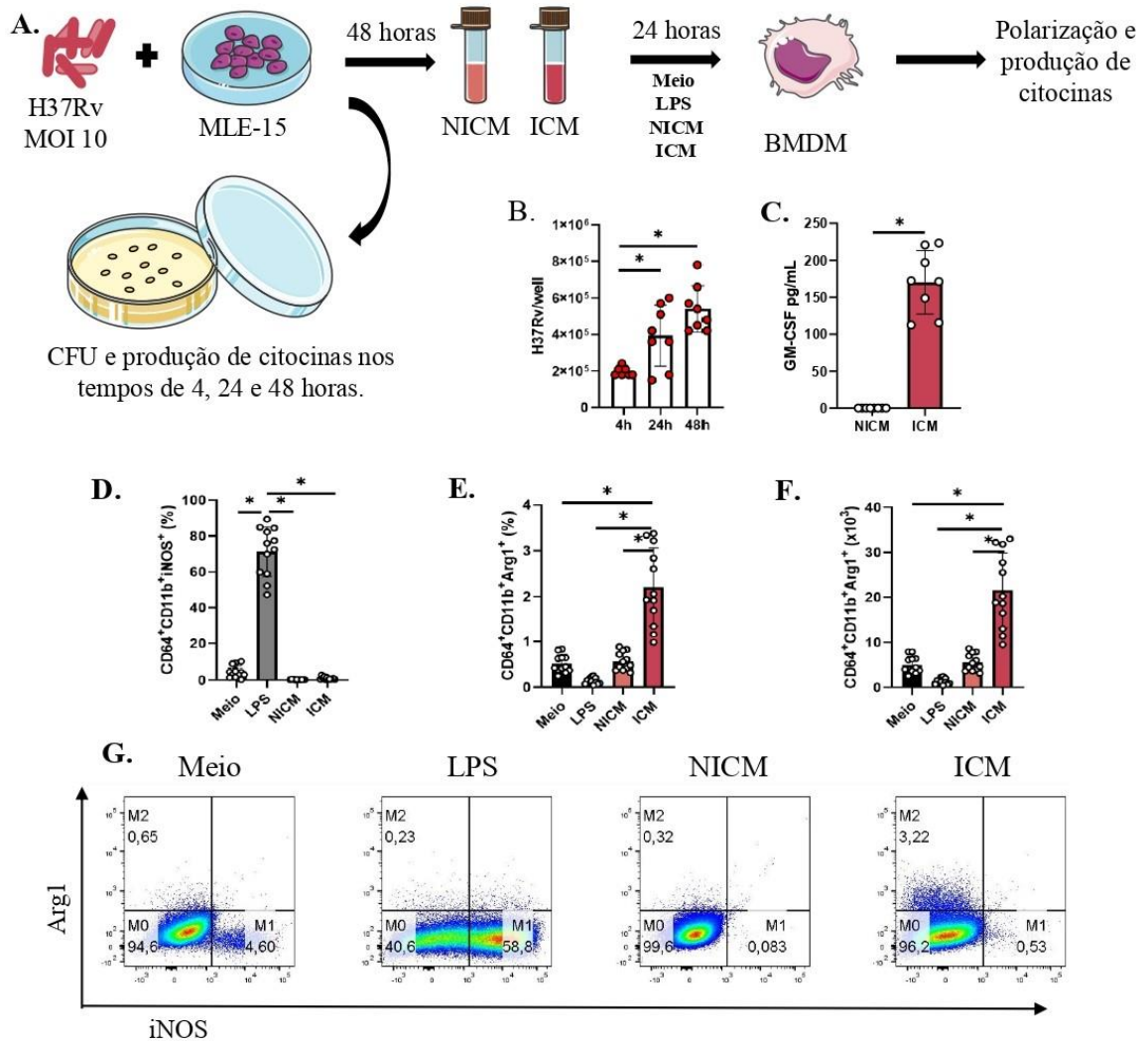


Figura 2. Interação de AEC-II MLE-15 com macrófagos BMDM. **A.** Infecção das células epiteliares alveolares MLE-15 com H37Rv MOI 10, coleta do meio condicionado infectado (ICM) e não infectado (NICM) 48 horas após infecção. O número de CFU foi avaliado nas culturas de células epiteliares nos tempos de 4, 24 e 48 horas. Os meios foram colocados em contato com macrófagos diferenciados da medula óssea (BMDM) por 24 horas e avaliados quanto à polarização e produção de citocinas. **B.** Número de CFU. **C.** Produção de GM-CSF pelas células epiteliares após 48 horas de infecção. **D. e E.** Expressão de iNOS e Arg1, respectivamente por BMDM estimulados apenas com meio, LPS, NICM e ICM. **F.** Número de BMDM que expressavam Arg1. **G.** Representativo por *dot-plot* da expressão de Arg1 e iNOS por BMDM. Resultados de 3 experimentos independentes com n de 12. * P < 0.05.

Para comprovar o fenótipo encontrado, nós alteramos o modelo celular utilizado, substituindo os BMDM por macrófagos alveolares murinos de linhagem denominada AMJ2-C11. Realizamos os mesmos procedimentos descritos anteriormente e reproduzimos os resultados encontrados com BMDM. Utilizamos a estratégia de análise da **Figura 1B** para avaliar a expressão de iNOS e Arg1. Macrófagos AMJ2-C11 tratados com ICM por 24 horas não apresentaram aumento da expressão de iNOS (**Figura 4A**), mas apresentaram aumento

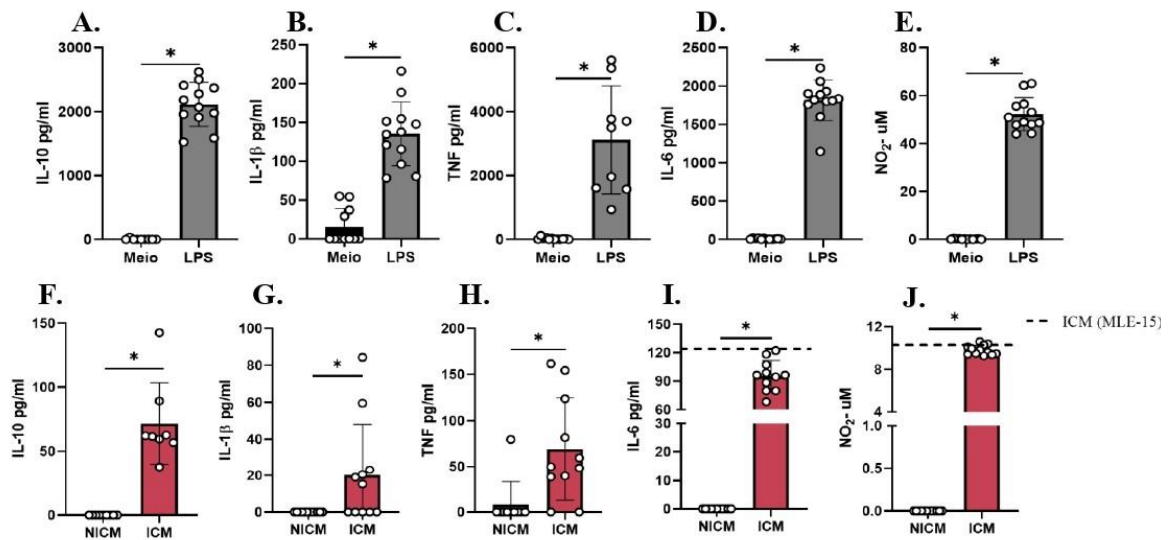


Figura 3. Avaliação da produção de citocinas por BMDM após a estimulação com NICM ou ICM. A - E. Produção por BMDM após a estimulação com controles, sendo não estimulado (Meio) ou LPS das citocinas IL-10, IL-1 β , TNF, IL-6 e óxido nítrico, respectivamente. **F - J.** Produção por BMDM após a estimulação com NICM ou ICM das citocinas IL-10, IL-1 β , TNF, IL-6 e óxido nítrico, respectivamente. As linhas tracejadas nos gráficos I e J representam os níveis de citocinas produzidas pela célula MLE-15. Resultados de 3 experimentos independentes com n de 12. * P < 0.05.

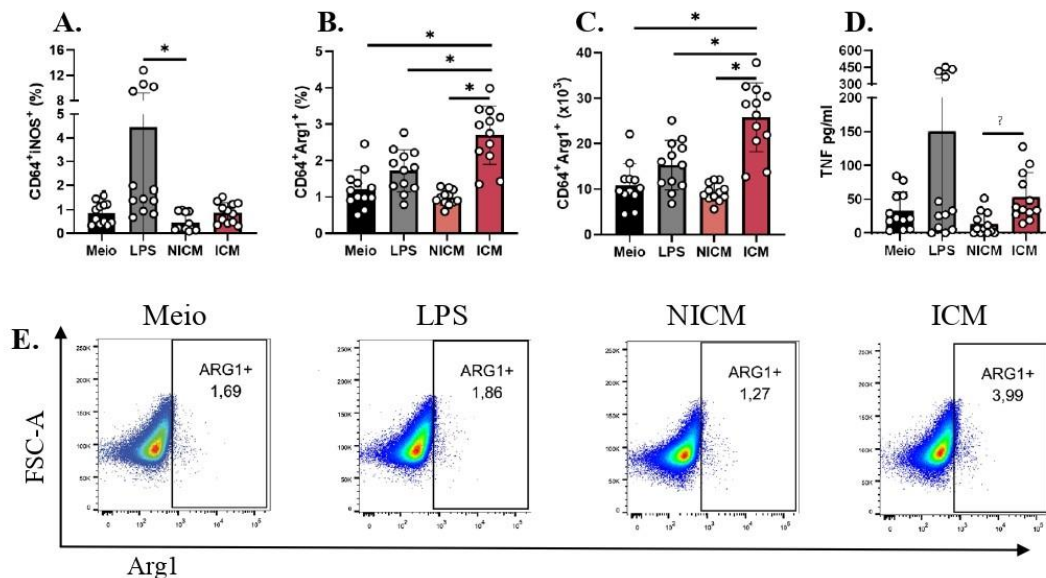


Figura 4. Interação dos meios condicionados NICM e ICM com macrófagos de linhagem AMJ2-C11. A e B. Expressão de iNOS e Arg1, respectivamente por AMJ2-C11 estimulado apenas com meio, LPS, NICM e ICM por 24 horas. **C.** Número de AMJ2-C11 BMDM que expressam Arg1 estimulado apenas com meio, LPS, NICM e ICM. **D.** Produção de TNF por macrófagos AMJ2-C11 após a estimulação com meio, LPS, NICM e ICM. **E.** Representativo por *dot-plot* da expressão de Arg1 de AMJ2-C11 estimulados com meio, LPS, NICM e ICM. Resultados de 3 experimentos independentes com n de 12. * P < 0.05.

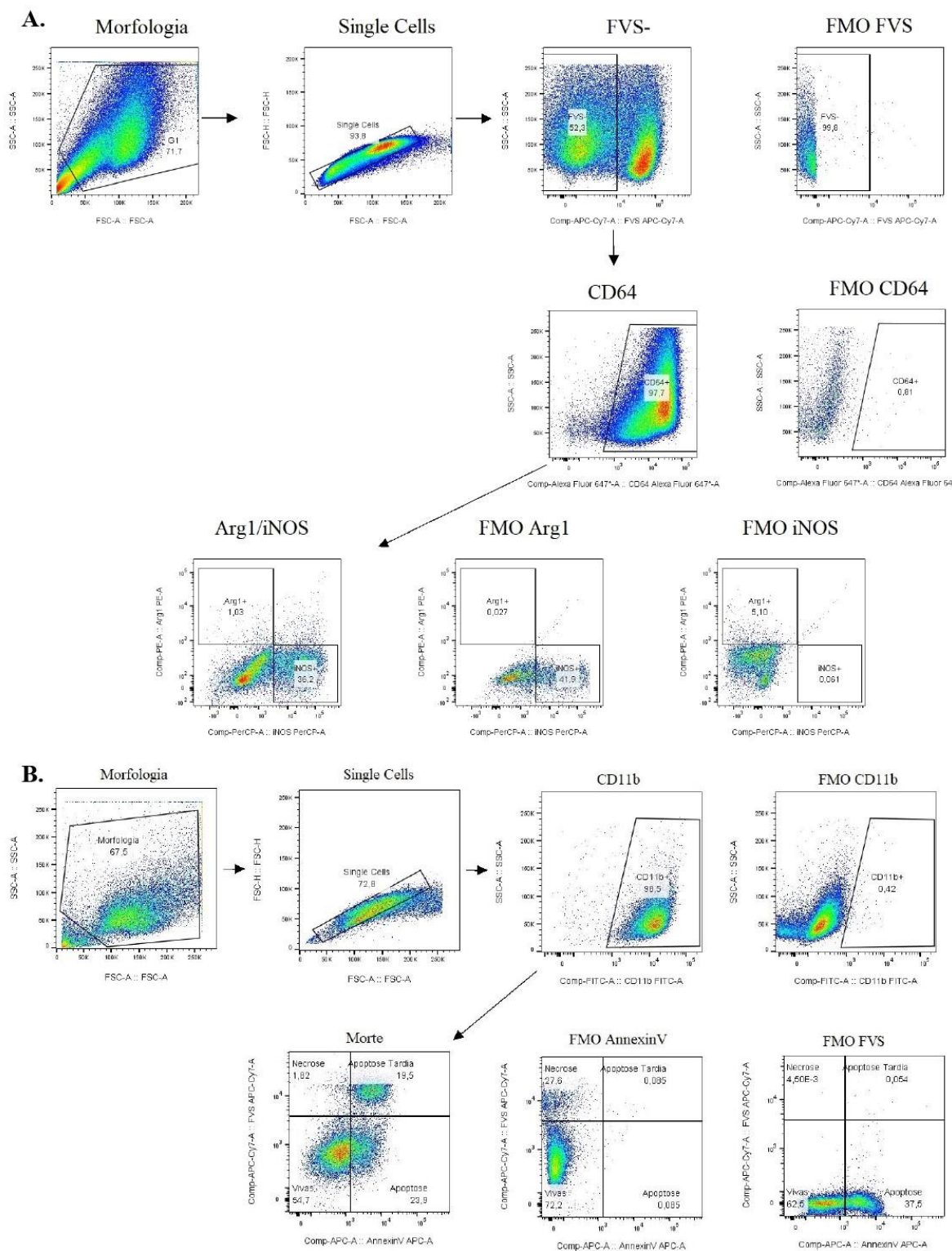


Figura 5. Estratégia de análise para a polarização e tipo de morte dos macrófagos após a infecção com H37Rv. A. Estratégia de análise para a expressão de Arg1 e iNOS. B. Estratégia de análise para a marcação com FVS e AnnexinV.

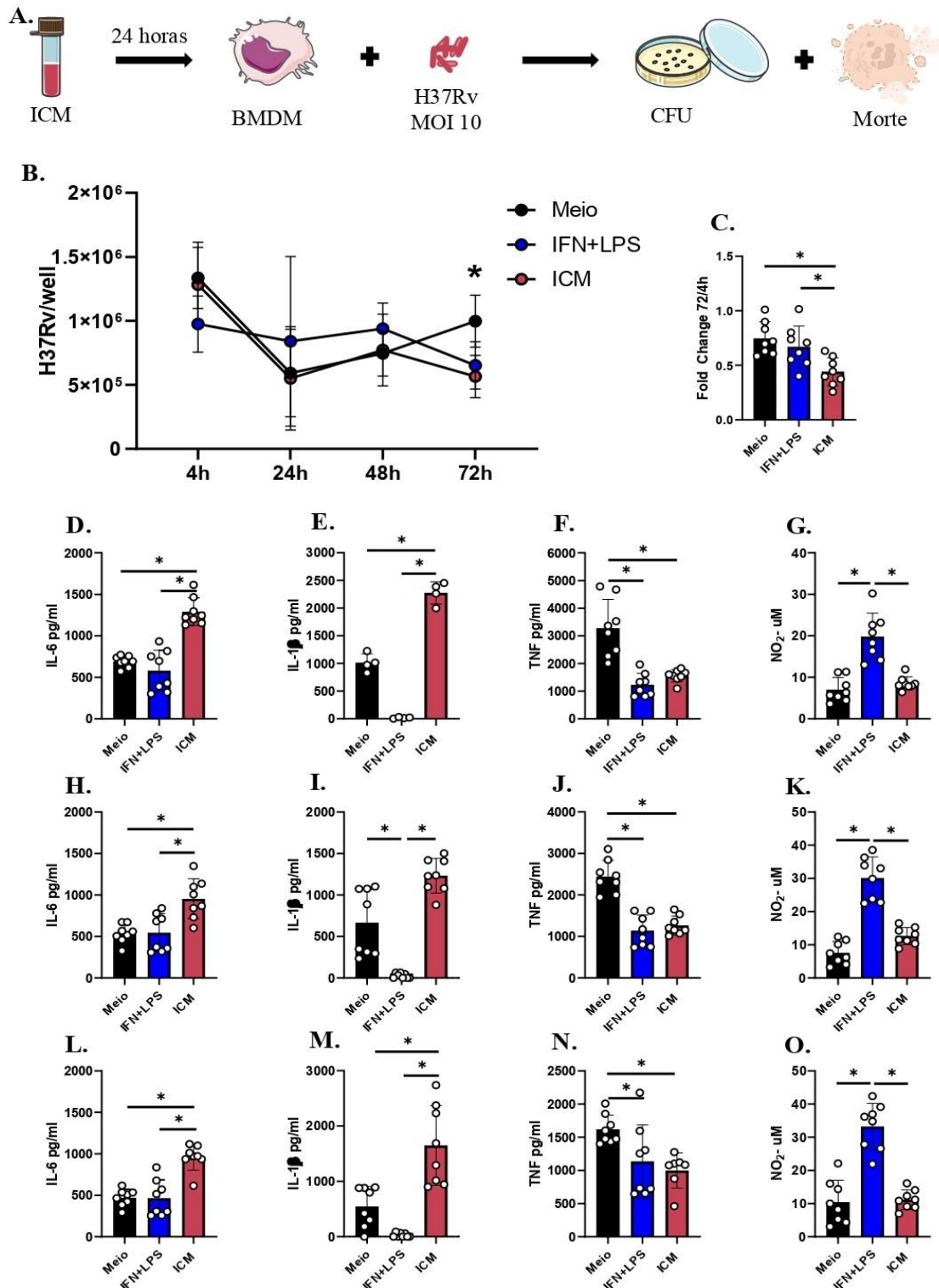


Figura 6. Infecção com H37Rv MOI 10 de BMDM tratados com ICM. **A.** BMDM pré-tratados com meio, IFN+LPS ou ICM por 24 horas foram infectados com H37Rv MOI 10 e avaliados quanto à carga bacteriana, produção de citocinas, expressão de iNOS ou Arg1 e tipo de morte celular. **B.** Contagem de CFU nos tempos de 4, 24 e 72 horas após infecção. **C.** Razão da carga bacteriana final (72 horas) pela carga bacteriana inicial (4 horas). Produção de citocinas no tempo de 24 horas, sendo IL-6 (**D**), IL-1β (**E**), TNF (**F**) e produção de óxido nítrico (**G**). Produção de citocinas no tempo de 48 horas, sendo IL-6 (**H**), IL-1β (**I**), TNF (**J**) e produção de óxido nítrico (**K**). Produção de citocinas no tempo de 72 horas, sendo IL-6 (**L**), IL-1β (**M**), TNF (**N**) e produção de óxido nítrico (**O**). Resultados de 2 experimentos independentes com n de 7 ou 8. * P < 0.05.

significativo da expressão de Arg1 quando comparado ao grupo tratado com NICM e aos controles experimentais, LPS e apenas meio de cultura (**Figura 4B**), confirmando o perfil *M2-like*. Resultado que também foi possível observar pelo número de células (**Figura 4C**). Os macrófagos também foram avaliados quanto à produção de TNF, IL-1 β , IL-10 e IL-6. AMJ2-C11 tratados com ICM produziram TNF quando comparados ao tratamento com NICM (**Figura 4D**), mas não produziram IL-1 β , IL-10 e IL-6. A **Figura 4E** mostra a análise representativa da expressão de Arg1 por AMJ2-C11.

Após esses resultados, reformulamos nossa hipótese e consideramos que a interação de células epiteliais infectadas com macrófagos seria prejudicial para o hospedeiro, pois macrófagos M1 apresentam papel chave no controle da infecção por *M. tuberculosis* (KHAN et al., 2019). Avaliamos então, a capacidade microbicida de macrófagos tratados com ICM ou não tratados da seguinte forma. Infectamos macrófagos previamente tratados ou não com ICM com *M. tuberculosis* (MOI 10) e dispusemos das seguintes replicatas: macrófagos na condição só meio (não tratados), tratados com IFN+LPS (perfil M1) e tratados com ICM (**Figura 6A**) e avaliamos a expressão de iNOS e Arg1 após a infecção. A **Figura 5A** mostra a estratégia de análise de citometria utilizada para avaliar a expressão de Arg1 e iNOS, e a **Figura 5B** mostra a estratégia de citometria utilizada para avaliar o tipo de morte celular.

Os macrófagos tratados com ICM apresentaram controle bacteriano equivalente aos tratados com IFN+LPS em 72 horas, tendo ambos carga menor que a cultura de BMDM não estimulada/não tratada (meio) (**Figura 6B**). Resultado que também pôde ser visto pela razão da carga bacteriana final (72 horas) pela carga bacteriana inicial (4 horas) (**Figura 6C**). Em relação às citocinas, os gráficos referentes a mesma citocina foram dispostos na vertical, sendo por exemplo, IL-6 24 horas (**Figura 6D**), 48 horas (**Figura 6H**) e 72 horas (**Figura 6I**). O padrão se manteve nos três tempos avaliados, em todas as citocinas. A IL-6 (**Figura 6D, 6H e 6I**) foi produzida principalmente pelo grupo ICM nos três tempos avaliados. A IL-1 β (**Figura 6E, 6I e 6M**) também foi produzida majoritariamente pelo grupo ICM. O TNF também apresentou o mesmo padrão nos três tempos, mas foi produzido principalmente pelo grupo meio (**Figura 6F, 6J e 6N**) em relação aos demais. Quanto à produção de NO, o grupo majoritário foi IFN+LPS, caracterizado por um macrófago mais microbicida (**Figura 6G, 6K e 6O**).

Em seguida, nós avaliamos a expressão de Arg1 e iNOS por esses macrófagos em 24 e 72 horas após infecção. A expressão de iNOS foi maior no grupo IFN+LPS como esperado,

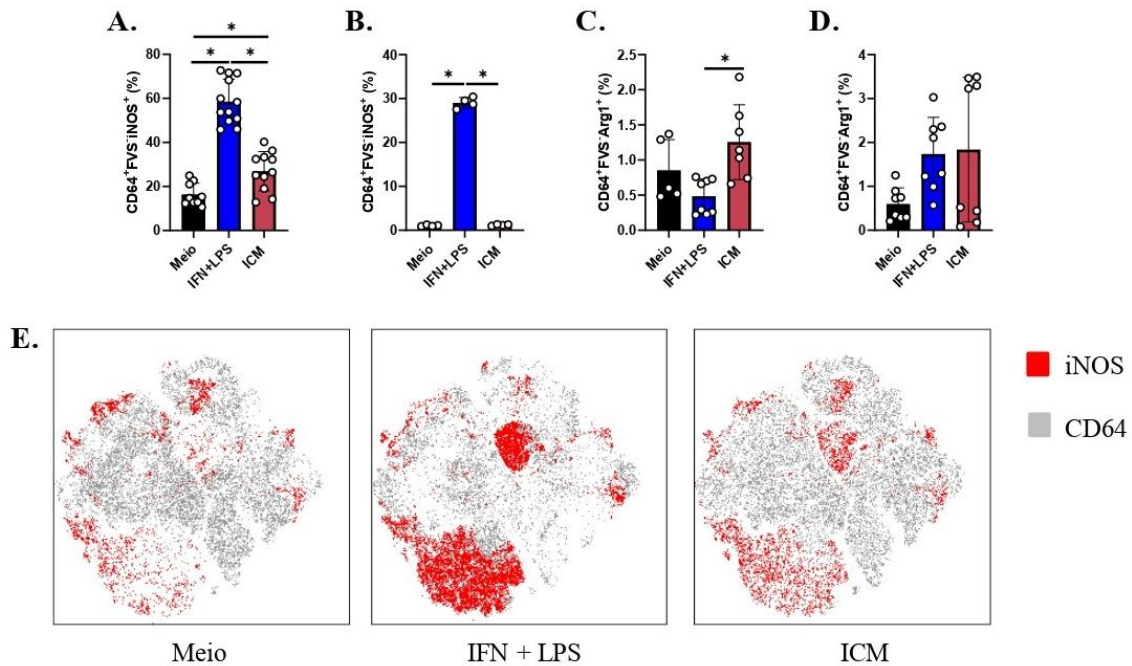


Figura 7. Expressão de Arg1 ou iNOS em BMDM pré tratados com ICM após a infecção com H37Rv MOI 10. Expressão de iNOS em BMDM em 24 horas (A) e 72 horas (B) após a infecção. Expressão de Arg1 em BMDM em 24 horas (C) e 72 horas (D) após a infecção. **E.** Representação por t-SNE da expressão de iNOS em BMDM após 24 horas de infecção com H37Rv MOI 10. Resultados de 2 experimentos independentes com n de 7 ou 8. B. Representativo de 2 experimentos independentes. * P < 0.05.

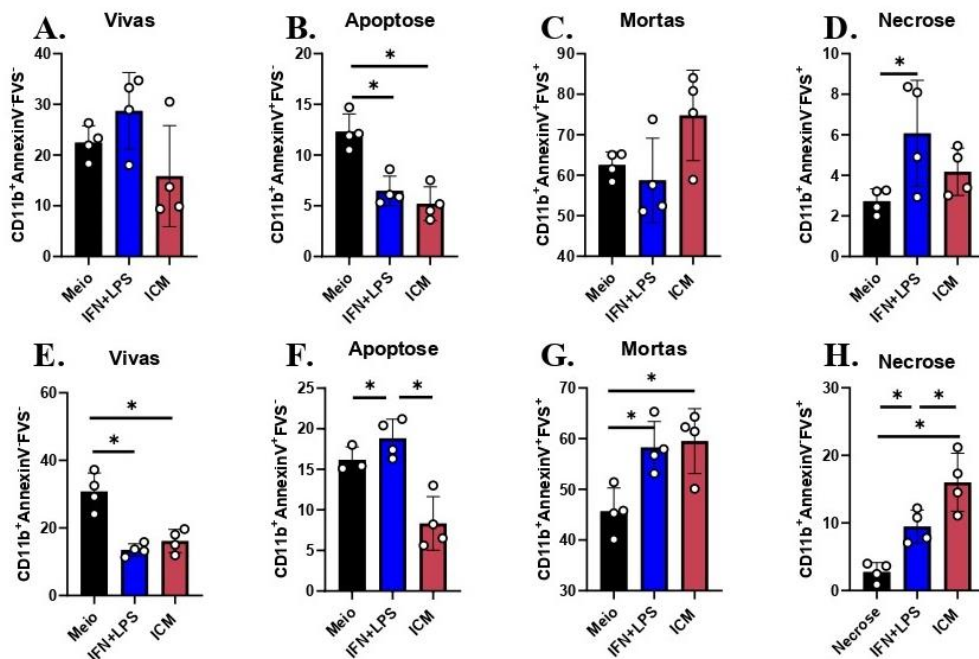


Figura 8. Tipos de morte celular presente em BMDM pre tratados com ICM e infectados com H37Rv MOI 10. A-D. Avaliação do tipo de morte no tempo de 24 horas, sendo células vivas (A), apoptose (B), mortas (C) e necrose (D). E-H. Avaliação do tipo de morte no tempo de 72 horas, sendo células vivas (E), células em apoptose (F), células mortas (G) e células em necrose (H). Resultados de 2 experimentos independentes com n de 7 ou 8. * P < 0.05.

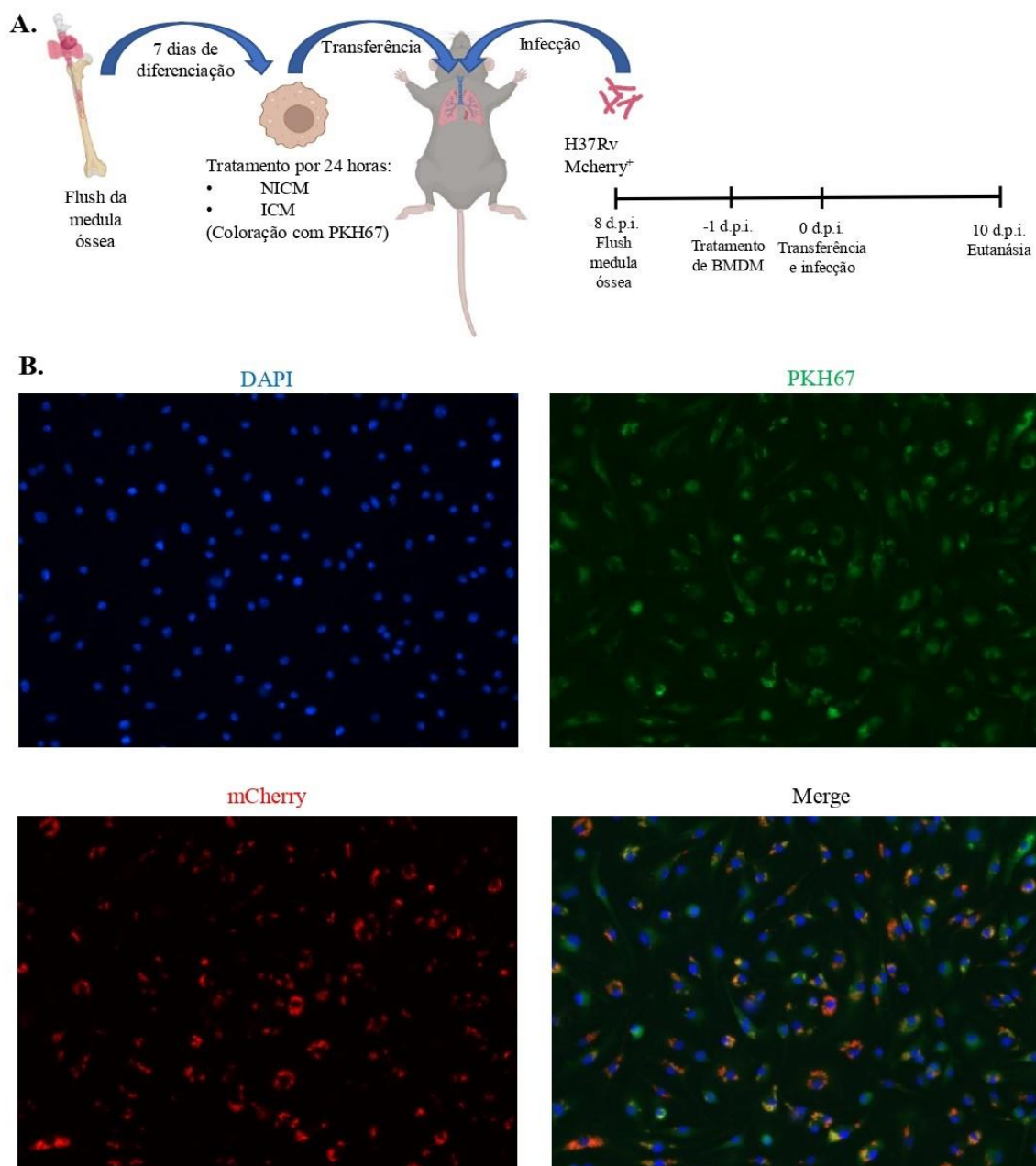


Figura 9. Delineamento de transferência de macrófagos BMDM tratados com NICM e ICM para animais infectados. **A.** Após a diferenciação de macrófagos BMDM, o meio condicionado NICM e ICM foi colocado em contato com BMDM por 24 horas. Esses macrófagos foram corados com PKH67 e transferidos via orofaríngea para animais C57BL/6 *Wild-Type*. Em seguida, esses animais foram infectados com H37Rv mCherry 1×10^2 ou 1×10^5 CFU e eutanasiados 10 dias após a infecção (d.p.i). **B.** Controle da transferência: macrófagos foram infectados *in vitro* com H37Rv mCherry e corados posteriormente com PKH67 e observados no microscópio de fluorescência.

mas o grupo experimental ICM teve expressão mais alta quando comparado ao grupo meio (**Figura 7A**) em 24 horas. Em 72 horas a expressão permaneceu maior no grupo IFN+LPS, mas foi praticamente zerada nos grupos ICM e meio (**Figura 7B**). Em relação à Arg1, a expressão foi maior no grupo ICM 24 horas após a infecção (**Figura 7C**), mas não houve diferença no tempo de 72 horas (**Figura 7D**).

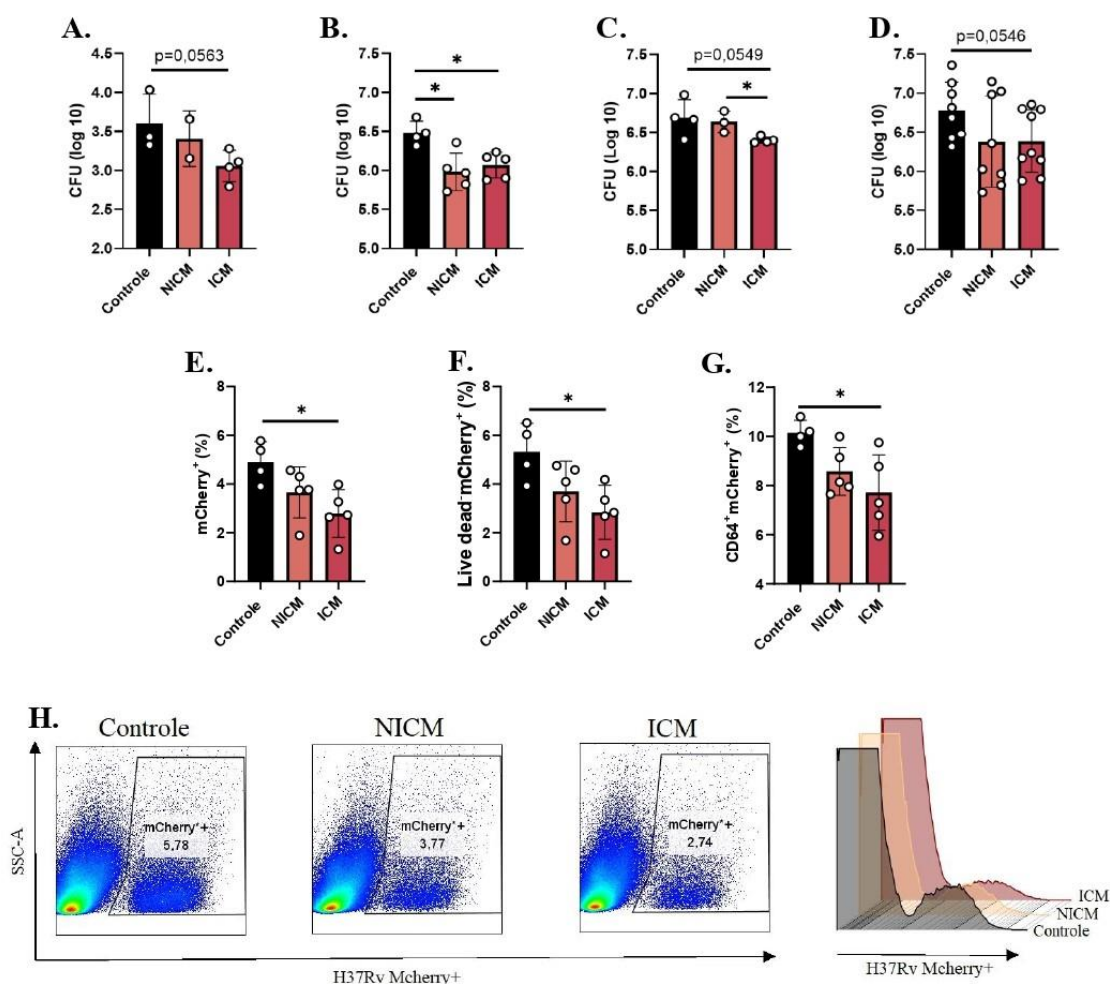


Figura 10. Carga bacteriana dos animais após 10 dias de infecção. **A.** CFU dos animais infectados com H37Rv mCherry 1×10^2 CFU. CFU dos animais infectados com H37Rv mCherry 1×10^5 CFU referentes à replicata 1 (**B**) e 2 (**C**), respectivamente. **D.** Junção das duas replicatas de CFU dos animais infectados com H37Rv mCherry 1×10^5 CFU. **E.** Avaliação da fluorescência emitida por mCherry dentro das células gerais nos pulmões de animais infectados com H37Rv mCherry 1×10^5 CFU. **F.** Avaliação da fluorescência emitida por mCherry dentro das células vivas nos pulmões de animais infectados com H37Rv mCherry 1×10^5 CFU. **G.** Avaliação da fluorescência emitida por mCherry dentro dos macrófagos totais nos pulmões (**G**) provenientes de animais infectados com H37Rv mCherry 1×10^5 CFU. **H.** Representativo de células totais infectadas com H37Rv mCherry 1×10^5 CFU nos diferentes grupos, representação por *dot-plot* e histograma. Resultados referentes a 2 experimentos com n de 6 a 8 ou 1 experimento com n de 2 até 5. * P < 0.05.

O tipo de morte em 24 horas (**Figura 8A-8D**) foi similar em ambos os grupos IFN+LPS e ICM, caracterizada por redução na morte por apoptose quando comparado ao controle (meio). Em 72 horas (**Figura 8E-8H**), esses mesmos grupos apresentaram níveis diminuídos de células vivas (**Figura 8E**) e aumentados na frequência de células mortas (**Figura 8G**) em comparação com o grupo meio. O grupo ICM apresentou os níveis mais altos de necrose em relação às outras condições experimentais (**Figura 8H**).

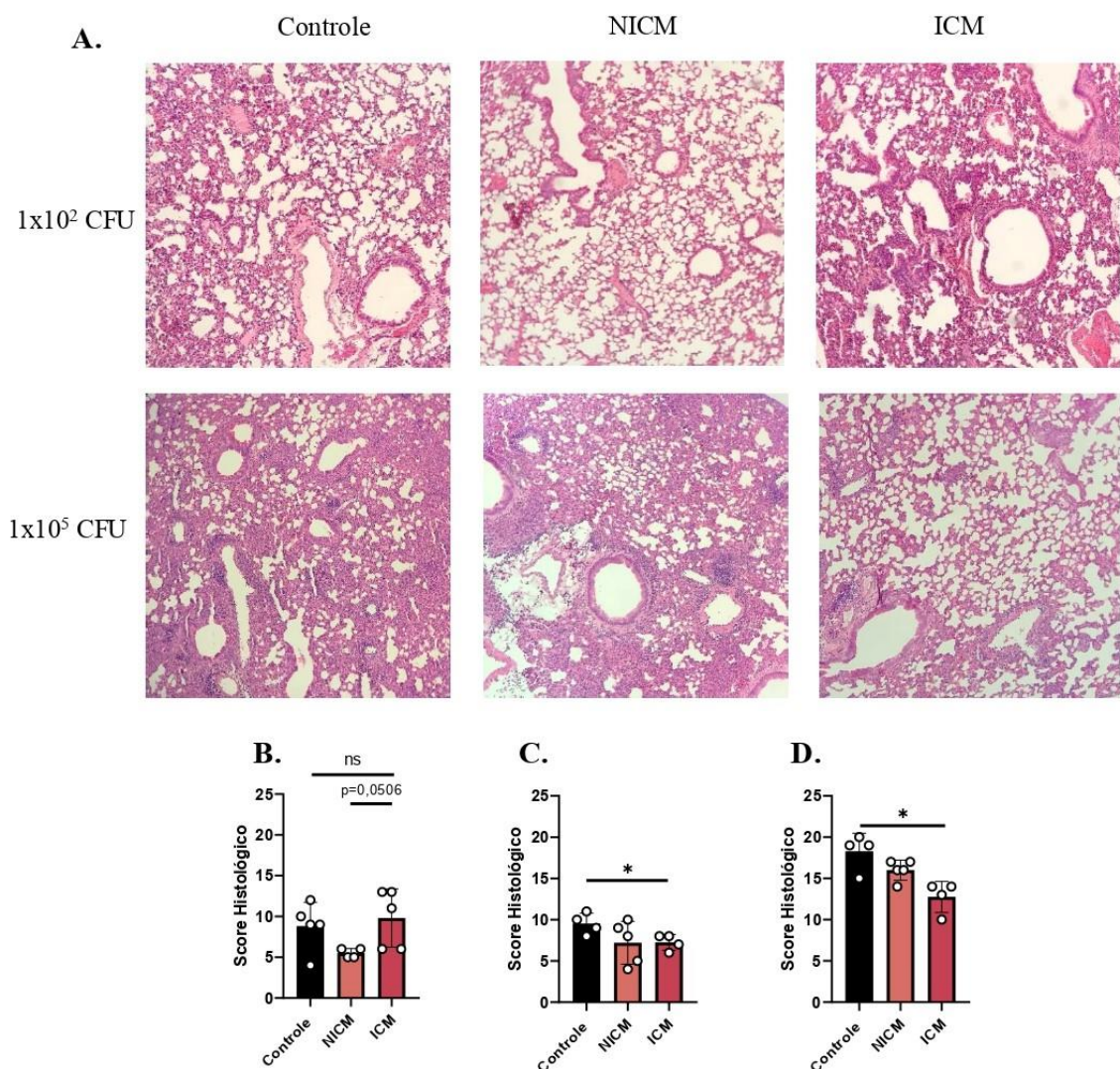


Figura 11. Avaliação do quadro histológico pulmonar. Animais infectados com 1×10^2 ou 1×10^5 CFU de H37Rv mCherry foram avaliados 10 dias após a infecção. A transferência de BMDM tratados com NICM ou ICM foi por via orofaríngea. **A.** Imagens histológicas de pulmões provenientes de animais infectados com 1×10^2 ou 1×10^5 CFU. **B.** Score da inflamação na infecção com 1×10^2 CFU. Score da inflamação na infecção com 1×10^5 CFU, sendo referente às replicatas experimentais 1 (C) e 2 (D). Resultados referentes a 2 experimentos com n de 6 a 8 ou 1 experimento com n de 4 ou 5. * $P < 0.05$.

Após a obtenção desses resultados, nós objetivamos avaliar a interface das células epiteliais e dos macrófagos *in vivo*. Para isso transferimos BMDM tratados de diferentes maneiras para animais C57BL/6, que foram infectados com 1×10^2 ou 1×10^5 CFU, e avaliados 10 dias pós-infecção. Nós optamos por avaliar nos períodos iniciais devido à imunidade inata, pois nosso foco é a interação das células epiteliais com macrófagos. Transferimos BMDM estimulados com NICM ou estimulados com ICM e como controle utilizamos animais que não receberam transferência. Após o tratamento e antes da transferência, nós coramos esses macrófagos com PKH67 e logo após a transferência, os

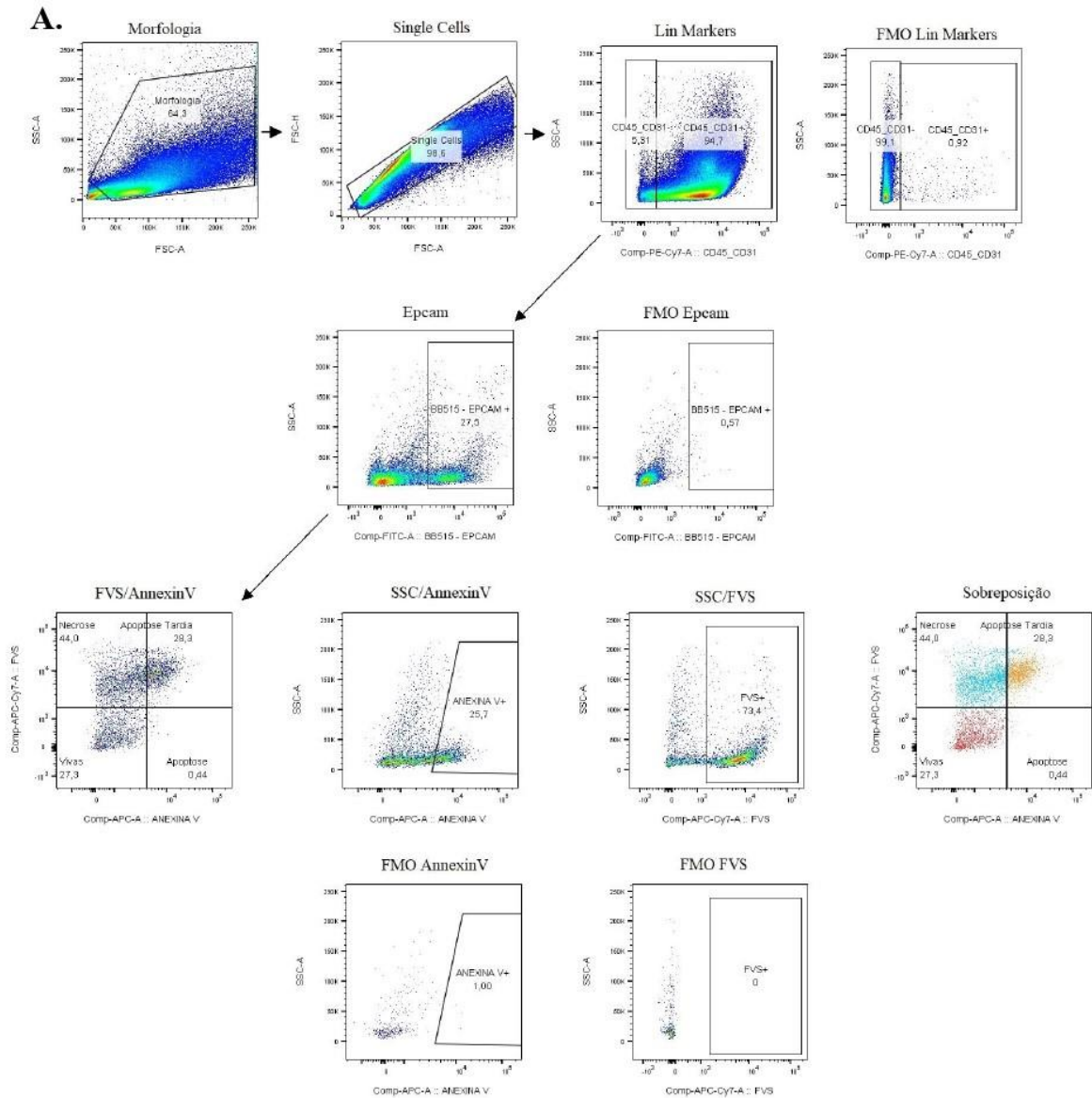


Figura 12. Estratégia de análise de células epiteliais. A. Estratégia de análise de citometria utilizada para avaliar a morte de células epiteliais *ex vivo* através da marcação com *FVS* e *AnnexinV*. animais foram infectados com diferentes cargas bacterianas de *M. tuberculosis* H37Rv mCherry (**Figura 9A**).

Para confirmar a fluorescência do macrófago e do bacilo, em paralelo com a transferência realizamos uma infecção *in vitro* com esses macrófagos corados com PKH67 e com a bactéria H37Rv mCherry e observamos ao microscópio (**Figura 9B**).

Na infecção com 1×10^2 , os animais que receberam BMDM tratados com ICM apresentaram diminuição significativa na carga bacteriana em relação ao grupo controle (não transferido) (**Figura 10A**). O resultado foi similar nos experimentos com inóculo de 1×10^5

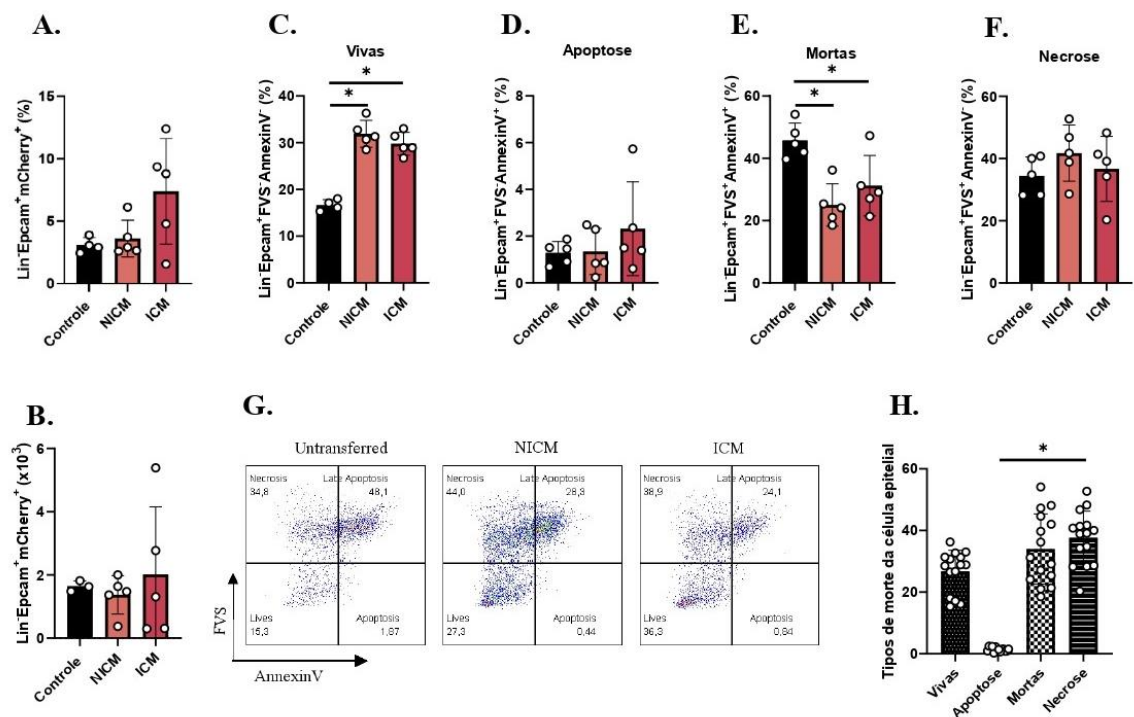


Figura 13. Caracterização do tipo de morte das células epiteliais pulmonares na infecção com H37Rv mCherry *ex vivo*. Animais que receberam transferência de BMDM tratados com NICM ou ICM por via orofaríngea, foram infectados com 1×10^5 CFU de H37Rv mCherry, e foram avaliados 10 dias após a infecção. As células epiteliais pulmonares foram marcadas com FVS e AnnexinV, e avaliadas quanto ao tipo de morte celular. Porcentagem (A) e número (B) de células epiteliais infectadas. Foram avaliadas células vivas (C), células em apoptose (D), células mortas (E) e células em necrose (F). G. Representativo de citometria referente ao tipo de morte celular das células epiteliais entre os grupos. H. Tipos majoritários de morte celular das células epiteliais *in vivo*. Resultados de 1 experimento com n de 3 até 5. * P < 0,05.

CFU (Figura 10B e 10C), que mostraram redução da carga bacteriana nos pulmões de animais que receberam macrófagos tratados com ICM. Entretanto, a comparação entre os grupos ICM e NICM foi ainda inconclusiva. Quando juntamos ambas as replicatas experimentais (Figura 10B, C), vemos a tendência à redução na carga bacilar nos grupos ICM e NICM comparado ao grupo não transferido (Controle) ao grupo controle (Figura 10D).

Ainda no inóculo de 1×10^5 , avaliamos por citometria as células totais dos pulmões que estavam infectadas, o grupo ICM apresentou diminuição na frequência em relação ao controle, resultados que se assemelhou com CFU (Figura 10E), frequência que também estava diminuída no grupo ICM em células totais vivas e infectadas (Figura 10F) e células CD64⁺ infectadas (Figura 10G). É possível ver o resultado representativo de citometria e histograma para as células totais dos pulmões (Figura 10H).

A transferência de BMDM tratados com ICM interferiu no quadro histológico pulmonar, que é exibido no representativo de histologia (Figura 11A). Quando realizamos a

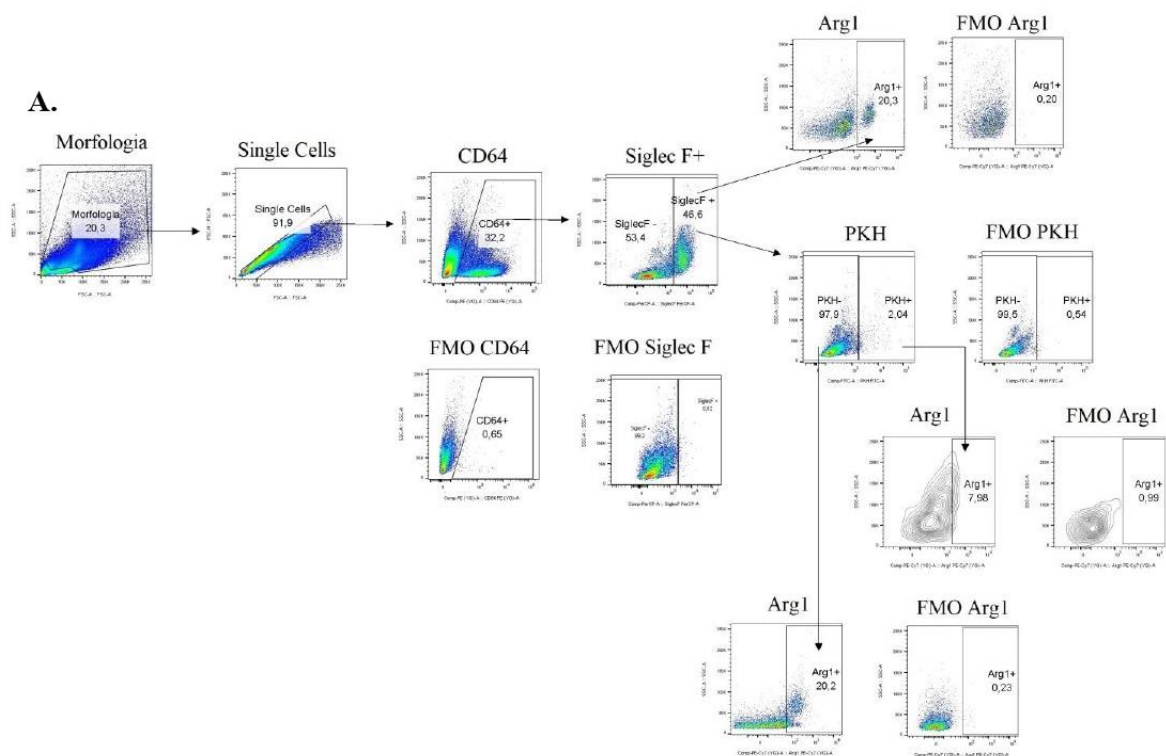


Figura 14. Estratégia de análise da expressão de Arg1 e iNOS em macrófagos alveolares e intersticiais.
A. Estratégia de análise de citometria utilizada para avaliar a expressão de Arg1 e iNOS em macrófagos. Macrófagos alveolares foram caracterizados como CD64⁺SiglecF⁺; macrófagos transferidos foram caracterizados como CD64⁺SiglecF⁻PKH⁺; macrófagos intersticiais foram caracterizados como CD64⁺SiglecF⁻PKH⁻.

infecção com 1×10^2 CFU, observamos que os animais que receberam macrófagos tratados com ICM não apresentaram diferença no *score* inflamatório quando comparado ao grupo Controle (**Figura 11A e 11B**). Em contrapartida, quando infectamos com 1×10^5 CFU, o grupo ICM apresentou *score* inflamatório menor quando comparado ao grupo não transferido (Controle), tanto na replicada experimental 1 (**Figura 11C**) como na 2 (**Figura 11D**), divergindo apenas na intensidade do *score*.

Dando sequência aos resultados, avaliamos o nível de infecção e o tipo de morte das células epiteliais. A **Figura 12** mostra a estratégia de análise usada para avaliar a infecção e morte de células epiteliais *ex vivo*. Ao avaliar a fluorescência emitida pelo bacilo nas células epiteliais na infecção com 1×10^5 CFU, não houve diferença na frequência de células positivas entre os grupos (**Figura 13A**) assim como no número de células (**Figura 13B**). Mesmo não havendo diferença no nível da infecção, as células epiteliais provenientes de animais que receberam macrófagos tratados com NICM ou ICM estavam mais viáveis (**Figura 13C**) e menos mortas (**Figura 13E**) quando comparadas ao grupo Controle. A frequência de células epiteliais em apoptose não diferiu entre os grupos (**Figura 13D**). Por

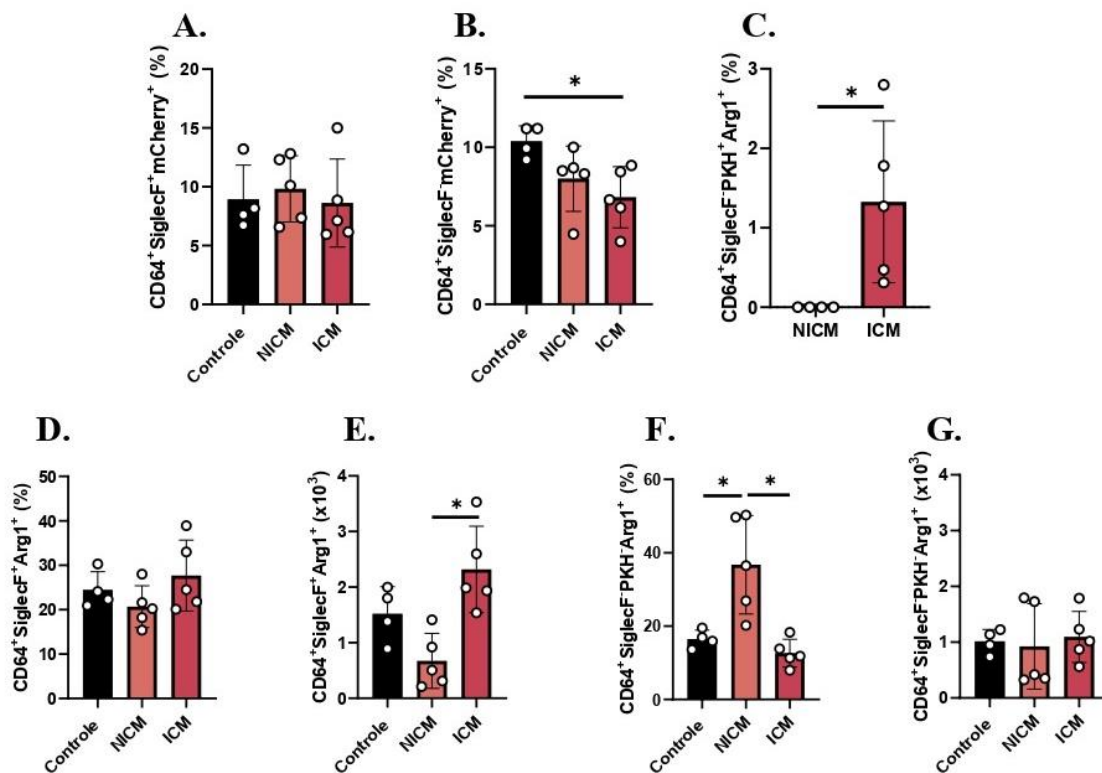


Figura 15. Expressão de Arg1 por diferentes tipos de macrófagos. Frequência de macrófagos alveolares (A) e intersticiais (B) positivos para mCherry na infecção com 1×10^5 CFU. Frequência de macrófagos PKH⁺ Arg1⁺ na infecção com 1×10^2 (C). Frequência (D) e número (E) de macrófagos alveolares expressando Arg1 na infecção com 1×10^2 CFU. Frequência (F) e número (G) de macrófagos intersticiais expressando Arg1 na infecção com 1×10^2 CFU. Resultados de 1 experimento com n de 3 até 5. $P < 0.05$.

fim, a detecção de necrose entre os grupos foi semelhante (Figura 13F). Um representativo de citometria dos resultados apresentados é exibido, evidenciando a uniformidade do tipo de morte entre os grupos (Figura 13G).

Além disso, também focamos em avaliar o tipo de morte que a célula epitelial sofre *in vivo* na infecção por *M. tuberculosis*, pois o que está descrito na literatura é que a célula epitelial morre por necrose *in vitro* (DANELISHVILI et al., 2003; DOBOS et al., 2000). Para isso, nós juntamos todos os grupos experimentais e separamos pelo tipo de morte celular (Figura 13H), já que não houve diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo tipo de morte celular. Foi possível observar que independente do grupo experimental (Controle, NICM, ICM) (Figura 13G), a célula epitelial morre mais por necrose quando comparado à apoptose *ex vivo* (Figura 13H).

Com relação aos macrófagos, avaliamos a expressão de Arg1 e iNOS na infecção com 1×10^2 CFU, de acordo com a estratégia de análise apresentada (Figura 14A). Avaliamos, em paralelo, a frequência de macrófagos alveolares e intersticiais positivos para a fluorescência do bacilo na infecção com 1×10^5 CFU.

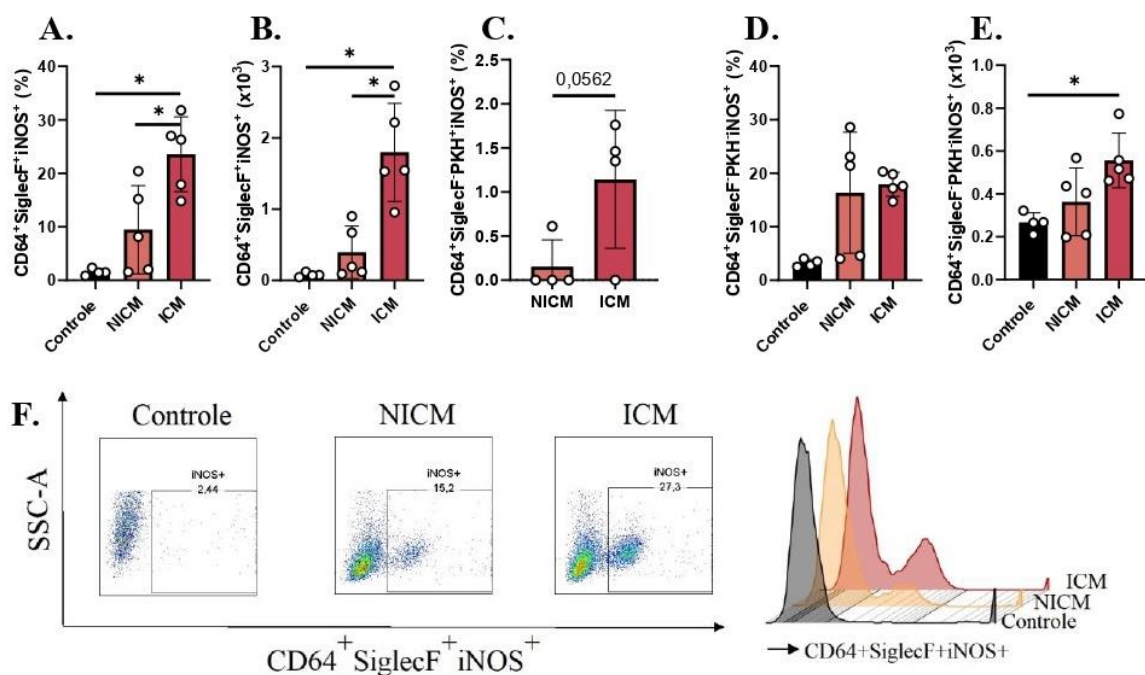


Figura 16. Expressão de iNOS por diferentes tipos de macrófagos. Frequência (A) e número (B) de macrófagos alveolares expressando iNOS na infecção com 1×10^2 CFU. Frequência da expressão de iNOS em macrófagos PKH⁺ na infecção com 1×10^2 (C). Frequência (D) e número (E) de macrófagos intersticiais expressando iNOS na infecção com 1×10^2 CFU. F. Representativo de citometria da expressão de iNOS por macrófagos alveolares na infecção com 1×10^2 CFU, referente à Figura 16A. Resultados de 1 experimento com n de 3 até 5. $P < 0.05$.

Macrófagos alveolares (**Figura 15A**) não apresentaram diferença nas células positivas para o bacilo entre os grupos. Já os macrófagos intersticiais (**Figura 15B**) apresentavam menor frequência de células positivas para os bacilos no grupo ICM em comparação com o Controle, indicando menos células infectadas. A avaliação da MFI não apresentou diferença entre os grupos em ambos os tipos celulares (**dados não mostrados**), indicando que a carga bacteriana no interior das células era igual, apenas a porcentagem de células infectadas que diferiam.

Na infecção com 1×10^2 CFU, macrófagos PKH⁺ transferidos foram avaliados para a expressão de Arg1. Observamos que mesmo após a transferência, o grupo ICM apresentou maior expressão de macrófagos Arg1⁺ (**Figura 15C**). Ao analisar a expressão de Arg1 em macrófagos alveolares, foi possível ver que não houve diferença na frequência de macrófagos alveolares que expressavam Arg1 (**Figura 15D**), mas sim no número (**Figura 15E**). Analisando os macrófagos intersticiais, foi possível observar maior expressão de Arg1 no grupo NICM em relação aos demais grupos (**Figura 15F**), mas sem diferença no número de células (**Figura 15G**).

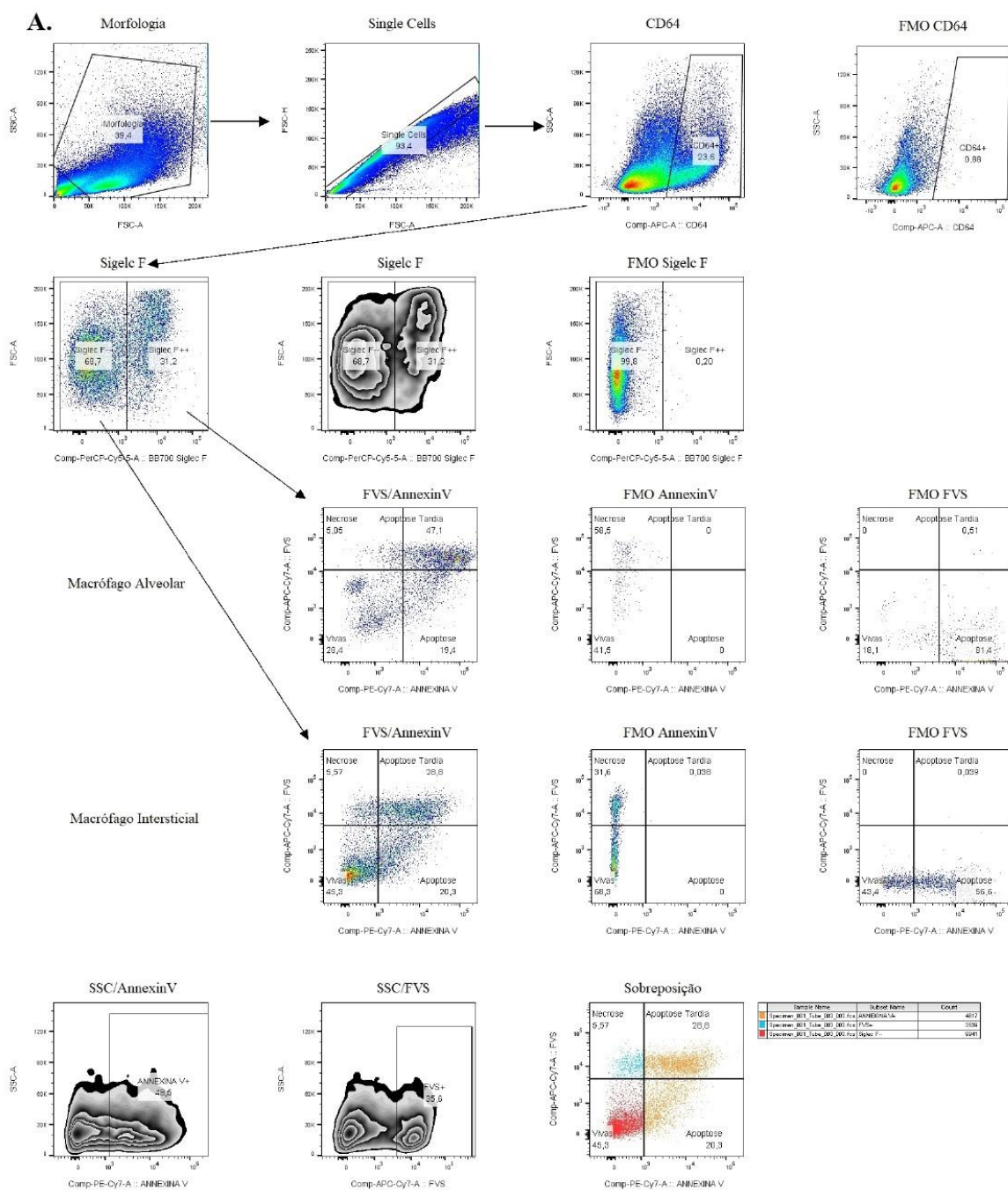


Figura 17. Estratégia de análise para avaliar morte em macrófagos. A. Estratégia de análise de citometria utilizada para avaliar a morte de macrófagos alveolares e intersticiais *ex vivo* através da marcação com *FVS* e *AnnexinV*.

Em relação à expressão de iNOS, na infecção com 1×10^2 CFU, macrófagos alveolares do grupo ICM apresentaram aumento significativo na frequência (**Figura 16A**) e número (**Figura 16B**) de células iNOS⁺ em relação aos outros grupos experimentais. Macrófagos PKH⁺ do grupo ICM apresentaram MFI maior na expressão de iNOS na infecção (**Figura 16C**), mas com valor de $p=0,0562$ quando comparados ao grupo NICM. Os

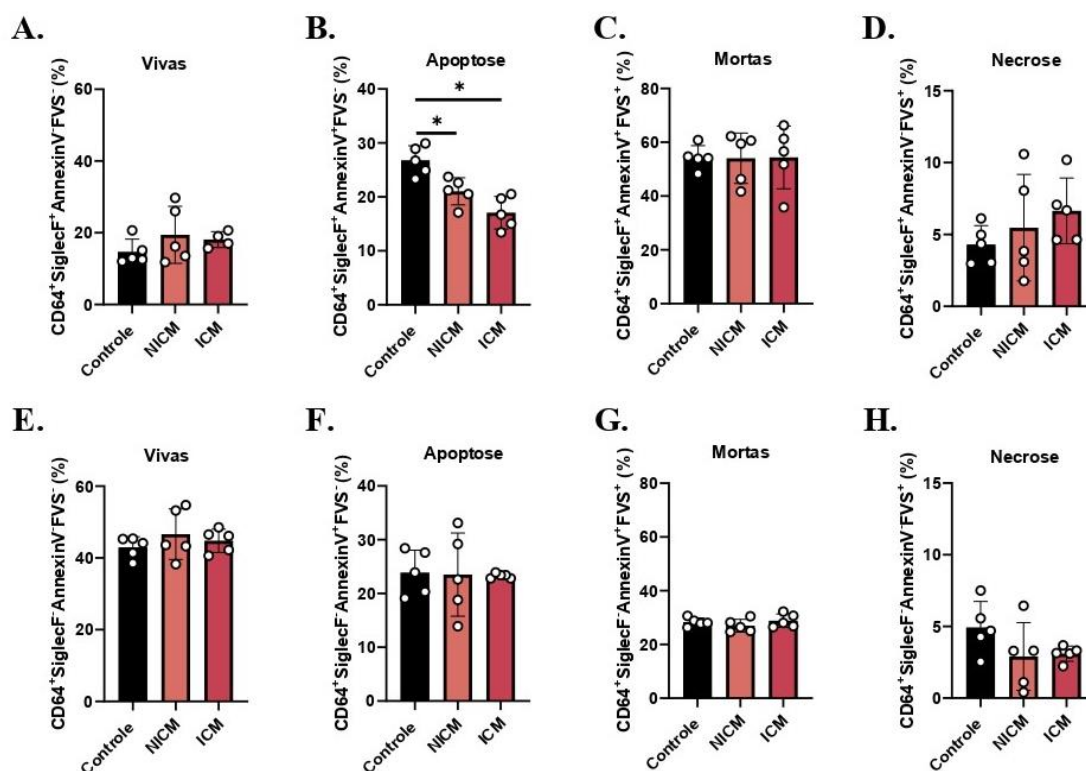


Figura 18. Caracterização do tipo de morte de macrófagos alveolares e intersticiais de animais que receberam BMDM ou não tratados com NICM ou ICM e foram infectados com *M. tuberculosis*. Animais infectados com 1×10^5 CFU de H37Rv mCherry foram avaliados 10 dias após a infecção e a transferência de BMDM tratados com NICM ou ICM por via orofaríngea. Os macrófagos pulmonares foram marcados com *FVS* e *AnnexinV* e avaliados quanto ao tipo de morte celular. Os macrófagos alveolares foram avaliados em células vivas (A), células em apoptose (B), células mortas (C) e células em necrose (D). Os macrófagos intersticiais foram avaliados em células vivas (E), células em apoptose (F), células mortas (G) e células em necrose (H). Resultados de 1 experimento com n de 3 até 5. $P < 0.05$.

macrófagos intersticiais dos grupos NICM e ICM apresentaram frequências similares de células *iNOS*⁺ (Figura 16D), mas com número aumentado no grupo ICM (Figura 16E). A Figura 16F mostra o representativo de citometria e histogramas da expressão de *iNOS* em macrófagos alveolares infectados com 1×10^2 CFU.

Em seguida, avaliamos o tipo de morte presente em macrófagos alveolares e intersticiais. Utilizamos a estratégia de análise apresentada na Figura 17A. Macrófagos alveolares provenientes de animais infectados com 1×10^5 CFU que receberam ou não macrófagos tratados com NICM ou ICM não apresentaram diferença na porcentagem de células vivas (Figura 18A), em células mortas (Figura 18C) ou em necrose (Figura 18D), mas tiveram frequência de apoptose diminuída quando comparados ao controle (Figura 18B). Quanto aos macrófagos intersticiais, não houve diferença na frequência de células vivas (Figura 18E) ou mortas (Figura 18G) entre os tipos de morte celular (Figura 18F e 18H).

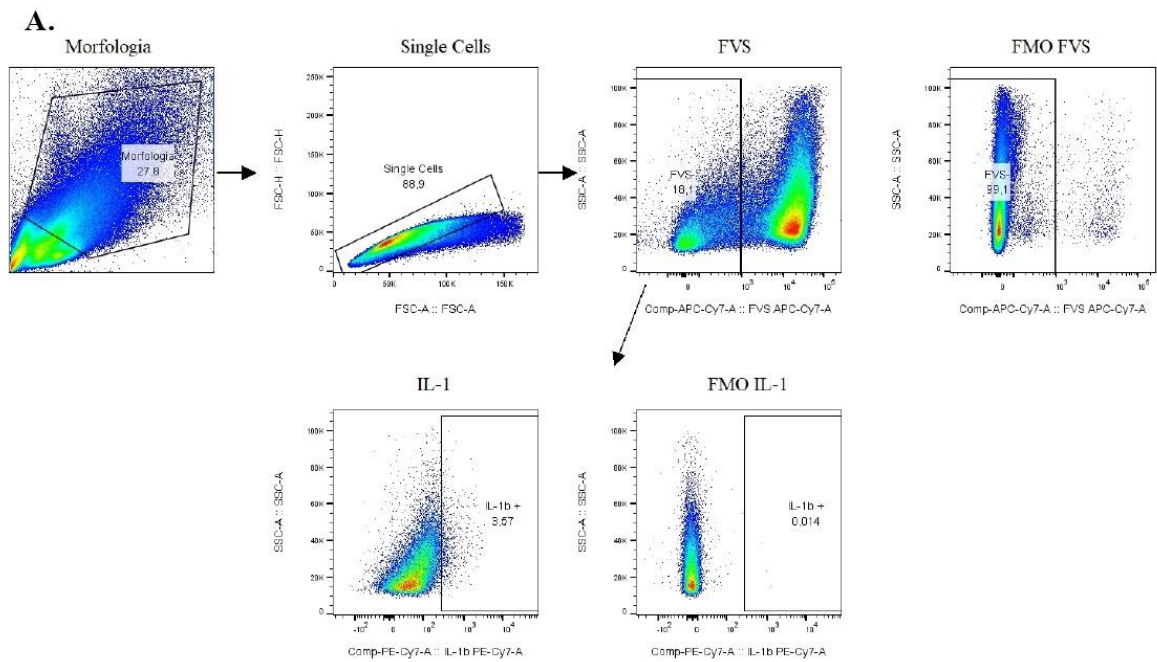


Figura 19. Estratégia de análise para expressão de IL-1 β . A. Estratégia de análise de citometria utilizada para avaliar a expressão de IL-1 β nas totais células provenientes dos pulmões dos animais que receberam BMDM tratados com ICM ou NICM, e foram infectados com 1×10^2 CFU.

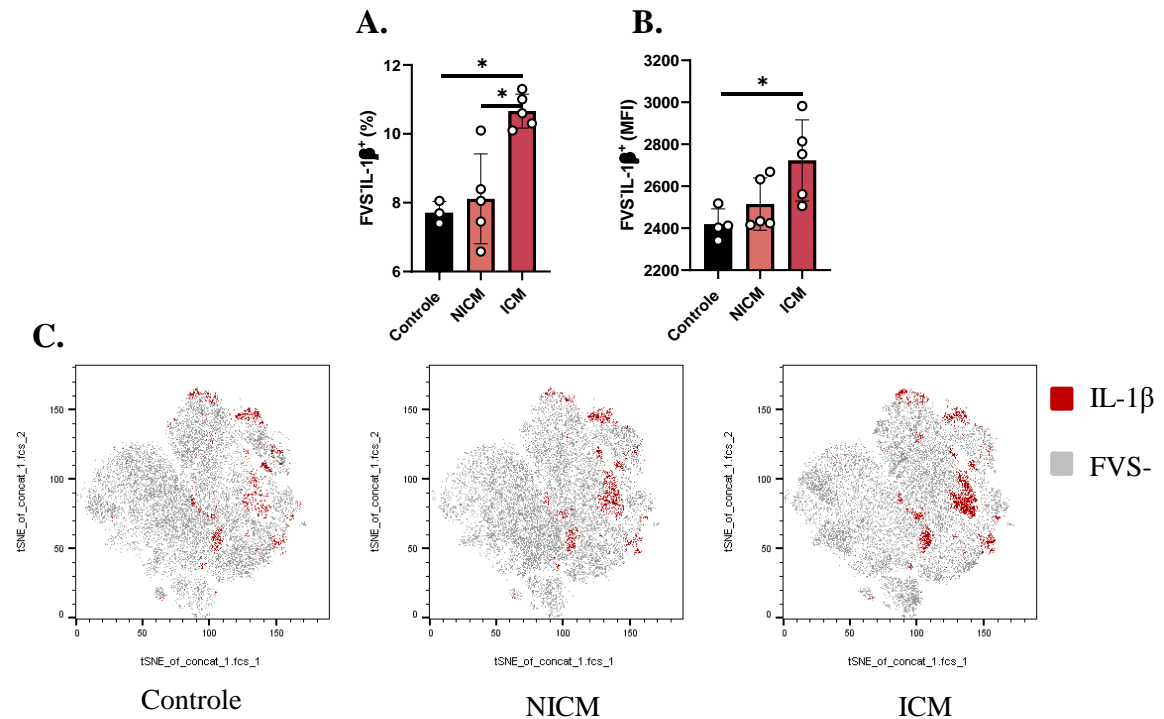


Figura 20. Marcação de citocinas intracelulares nos pulmões de animais infectados com 1×10^2 CFU que receberam BMDM tratados com ICM ou NICM. Frequência (A) e MFI (B) de células totais dos pulmões expressando IL-1 β , provenientes de animais infectados com 1×10^2 CFU. C. Representação por t-SNE da frequência de IL-1 β de células totais dos pulmões, provenientes de animais infectados com 1×10^2 CFU. Resultados de 1 experimento com n de 3 até 5. $P < 0.05$.

Por fim, avaliamos a produção intracelular de IL-1 β nos pulmões de animais infectados com 1×10^2 CFU através da estratégia de análise apresentada na **Figura 19A**. A IL-1 β foi expressa majoritariamente pelas células totais dos pulmões pelo grupo ICM (**Figura 20A**), juntamente com os maiores valores de MFI no grupo ICM (**Figura 20B**), sugerindo maior produção de IL-1 β individualmente por célula. A **Figura 20C** ilustra a representação por t-SNE da frequência de células totais dos pulmões positivas para IL-1 β nas diferentes condições experimentais.

DISCUSSÃO

A resposta imune na infecção por *M. tuberculosis* é heterogênea, variando de indivíduo para indivíduo. Existem pessoas que eliminam os bacilos utilizando apenas os mecanismos da imunidade inata, não apresentando sintomas de infecção, enquanto existem outras pessoas que necessitam do auxílio da resposta imune adaptativa, culminando em tuberculose latente ou tuberculose ativa. A existência de pessoas que controlam e esterilizam a infecção utilizando apenas a imunidade inata prova que os momentos iniciais da infecção são críticos para o desfecho da infecção. Ao chegar nos sacos alveolares, os bacilos infectam preferencialmente os macrófagos alveolares (COHEN et al., 2018), quando se inicia a resposta inata. No entanto, célula epiteliais do tipo II também são infectadas, e a interface destas com os macrófagos é ainda pouco explorada (SCORDO; KNOELL; TORRELLES, 2016). Animais deficientes para macrófagos alveolares são mais resistentes à infecção (LEEMANS et al., 2001), seja pelo papel deletério dessa célula na infecção ou que a infecção inicial de células epiteliais no lugar de macrófagos alveolares seja mais protetora ao hospedeiro. O fato de indivíduos poderem apresentar respostas inatas distintas, que culminam ou não na esterilização da infecção, pode ser decorrente da carga bacilar nos diferentes tipos celulares, como os macrófagos e as células epiteliais. Desse modo, a interação da célula epitelial, gerando uma resposta imunológica inicial, com macrófagos pode ser um fator chave no controle da infecção.

Pensando nisso, nós avaliamos a infecção por *M. tuberculosis* nas células epiteliais e a resposta imunológica gerada por macrófagos a partir dessa interface. As células epiteliais produziram IL-6, óxido nítrico e GM-CSF após infecção com *M. tuberculosis*. Esse meio condicionado em contato com macrófagos induziu maior expressão de Arg1, e posteriormente, esses macrófagos ao serem infectados controlaram a infecção tão bem quanto macrófagos inflamatórios do tipo M1, expressando níveis significativos de iNOS, e secreção de TNF e IL-1 β .

A produção de GM-CSF pelas células epiteliais já era esperada, pois Pasula e colaboradores mostraram que o GM-CSF produzido pela célula epitelial através da estimulação com KGF possui a capacidade de modular a atividade dos macrófagos e auxiliar no controle da infecção. Os autores infectaram macrófagos murinos com *M. tuberculosis* GFP e deixaram em contato com o sobrenadante da célula epitelial que possuía GM-CSF (estimulado com KGF). Observaram que esses macrófagos apresentavam maior fusão de fagossomos com lisossomos através da marcação da molécula LAMP-1, um marcador das

vesículas lisossomais. Os macrófagos tratados com o sobrenadante da célula epitelial que possuía GM-CSF apresentaram maior co-localização da molécula LAMP-1 com o bacilo, visualizado pela fluorescência, quando comparado a macrófagos tratados com sobrenadante de célula epitelial tratada apenas com PBS (PASULA et al., 2015).

Após a infecção das células epiteliais, colocamos os meios condicionados em contato com macrófagos e investigamos como ICM poderia modular essas células de acordo com as funções das mesmas: capacidade microbicida, secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, expressão de iNOS/Arg1, tipo de morte celular (apoptose/necrose). Encontramos aumento na expressão de Arg1, caracterizando um perfil anti-inflamatório, que denominamos *M2-like*, devido ao perfil misto de citocinas secretadas após a exposição ao ICM: IL-10, TNF e IL-1 β .

A infecção de macrófagos tratados com ICM, que possuíam aumento significativo de Arg1 e perfil misto de citocinas, resultou no controle bacteriano, com níveis mais altos de iNOS e produção elevada de citocinas, como IL-1 β e IL-6. Nosso grupo de pesquisa já descreveu a atividade microbicida de macrófagos M2 na infecção com *M. tuberculosis* (PIÑEROS et al., 2017). No presente estudo, mesmo os macrófagos expressando mais Arg1 após o tratamento com ICM, a expressão de iNOS não foi comprometida pela infecção *in vitro*, e a mesma pode ter resultado no controle da carga bacteriana (MACMICKING et al., 1997). A enzima Arg1 usa como substrato o aminoácido arginina que na reação tem como produtos a ornitina e a ureia (RATH et al., 2014). Sivangala Thandi e colaboradores mostraram o papel da ornitina na infecção com *M. tuberculosis* H37Rv em macrófagos. A ornitina está presente no ciclo da ureia e tem papel importante na degradação de amônia gerada no processamento de aminoácidos, convertendo esse excesso de amônia em ureia. O fato é que na infecção com H37Rv, o bacilo gera amônia, que é prejudicial para o macrófago e favorece seu próprio crescimento. Os autores mostraram que a ornitina diminui os níveis de amônia na infecção e isso ativa a *adenosine monophosphateactivated protein kinase* (AMPK), que é um sensor citosólico que se ativa com a diminuição de nutrientes citoplasmáticos. Essa ativação de AMPK inibe mTOR e induz o processo de autofagia, resultando no controle da infecção (SIVANGALA THANDI et al., 2020). É possível que esses macrófagos *M2-like* tratados com ICM controlem a infecção através da autofagia, mas isso necessita ser comprovado com experimentos futuros. Nesse contexto, será importante comprovar se esses macrófagos *M2-like* realmente estão fazendo autofagia para eliminar os bacilos e se a enzima iNOS possui papel em conjunto no controle da infecção nesses mesmos macrófagos que estariam fazendo autofagia.

Vale ressaltar que a expressão de iNOS e Arg1 não é concomitante, pois ambas as enzimas utilizam arginina para produzir seus produtos metabólicos (RATH et al., 2014). Assim, isso levanta a questão se as células epiteliais também estão modulando macrófagos que não exibiram aumento da expressão de Arg1, que é uma população com frequência muito alta, cerca de 96-98% de macrófagos totais tratados, pois o aumento da expressão de iNOS após o tratamento com ICM e o contato com os bacilos foi significativamente maior comparado com a infecção apenas, sugerindo uma modulação prévia nesses macrófagos Arg1 negativos.

Acreditamos que essa modulação seja proporcionada por alterações metabólicas, como aumento da utilização da via glicolítica, como demonstrado por Gleeson e colaboradores, que observaram melhora na atividade microbicida em conjunto com maior produção de IL-1 β em células que utilizaram a glicólise, que em contrapartida tinham sua atividade microbicida diminuída quando a via de fosforilação oxidativa era usada (GLEESON et al., 2016). Esse estudo corrobora o papel essencial, já descrito, da IL-1 β no combate ao bacilo da tuberculose (MAYER-BARBER et al., 2010).

A IL-1 β promove a inflamação e o recrutamento celular como resposta à infecção por *M. tuberculosis*, sendo crítica para a resistência do hospedeiro. Um dos mecanismos de escape dos bacilos é a evasão do fagolisossomo e a translocação para o citosol, e como resposta, os receptores citosólicos são ativados, e inicia-se a produção de IL-1 β (BECKWITH et al., 2020). Sousa e colaboradores mostraram que cepas virulentas induzem menos IL-1 β quando infectam macrófagos, subvertendo a resposta mune do hospedeiro (SOUSA et al., 2020). Em nossos resultados, a IL-1 β foi produzida, principalmente, por macrófagos tratados com ICM e infectados *in vitro*, indicando que a célula epitelial consegue aumentar o perfil inflamatório no momento da infecção.

Ao avaliarmos a morte de macrófagos tratados com ICM *in vitro*, esse grupo apresentou menos morte por apoptose em 24 horas, mas aumento de morte por necrose no tempo de 72 horas. Essa morte celular pode estar relacionada à alta produção de IL-1 β , resultando em piroptose (BECKWITH et al., 2020), necessitando de experimentos futuros para investigação, mas que em todo caso não prejudicou o controle bacteriano em 72 horas.

A diminuição da apoptose e o aumento de iNOS em 24 horas após a infecção pode sugerir que o controle da carga bacteriana se iniciou nesse momento, de forma que foi possível observar apenas a diminuição significativa do CFU em 72 horas. A diminuição da apoptose do grupo ICM e do grupo IFN+LPS que também apresentou controle da carga

bacteriana, pode ter permitido ao macrófago uma maior sobrevivência e que estando dotado de sua capacidade inflamatória e microbicida aumentada nesse período, resultou no controle bacteriano em 72 horas em ambos os grupos. Dessa maneira, experimentos futuros para avaliar o papel do iNOS com objetivo de saber se o mesmo influencia na diminuição da apoptose durante a infecção e qual o papel dessa enzima no controle bacteriano é de extrema importância.

Para avaliar se a atividade desses macrófagos tratados com ICM também ocorria *in vivo*, nós transferimos macrófagos que foram estimulados com ICM para os pulmões de animais em conjunto com a infecção, no intuito de proporcionar um microambiente mais fidedigno para avaliar o funcionamento dessas células, quando comparado aos experimentos *in vitro*. Nós infectamos os animais com dois inóculos diferentes, 1×10^2 ou 1×10^5 CFU conforme feito por Pasula e colaboradores (PASULA et al., 2015). Os autores indagaram que a infecção com inóculo de 1×10^2 CFU em camundongos serve para deixar o modelo mais próximo da infecção natural que acontece em humanos, assim, nós utilizamos essa mesma dose para avaliar a inflamação presente, principalmente, nas populações de macrófagos e produção intracelular de citocinas. Os autores também utilizam inóculo de 1×10^5 CFU estabelecido mediante a sobrevivência do animal, pois as infecções com inóculos maiores levaram à morte precoce e com inóculos menores aumentaram muito a sobrevivência dos mesmos. Esses dados vão ao encontro de resultados de trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (MORAIS FONSECA et al., 2010), no qual a infecção realizada com 1×10^5 CFU gerou maior inflamação pulmonar e maiores níveis de citocinas. Assim, nós optamos por avaliar a morte presente nos macrófagos e células epiteliais utilizando o inóculo de 1×10^5 CFU, que induz inflamação intensa e permite caracterização das células em processo de morte.

A avaliação da função *in vivo* de macrófagos tratados previamente com ICM se mostrou positiva, pois animais que receberam células provenientes do tratamento com ICM apresentaram melhor controle bacteriano quando comparados aos animais controles que não receberam transferência celular. Essa transferência resultou em diversas alterações imunológicas, como aumento da expressão de iNOS em macrófagos alveolares e intersticiais do hospedeiro, maior produção de IL-1 β por células totais dos pulmões e menor inflamação pulmonar na infecção com carga bacteriana maior.

A infecção das células epiteliais alveolares pode ser benéfica ao patógeno e não ao hospedeiro, pois culmina na morte celular por necrose (DOBOS et al., 2000). A literatura

descreve a morte por necrose na infecção por *M. tuberculosis* apenas *in vitro*, sendo assim, nossos resultados mostram que a célula epitelial morre também por necrose *in vivo*, exibindo um papel duplo na infecção por *M. tuberculosis*, pois serve de nicho para a replicação e disseminação bacteriana, mas ao mesmo tempo modula macrófagos para desenvolverem uma reposta imune mais inflamatória e mais microbicida contra o patógeno.

A inflamação avaliada através da histologia estava diminuída nos pulmões de animais infectados com maior inóculo. Animais que receberam macrófagos tratados previamente com ICM e foram infectados com um inóculo maior (1×10^5 CFU) apresentaram diminuição no número de bacilos presentes nos pulmões e por consequência diminuição da inflamação causada pelo patógeno quando comparado ao grupo Controle; isso pode ser visto pelo nível da inflamação de animais que foram apenas infectados e que apresentaram maior *score* inflamatório, pois após a transferência de macrófagos tratados com ICM esse *score* diminuiu. Fenômeno que não se repetiu nos animais que receberam macrófagos tratados com ICM e foram infectados com menor carga bacteriana (1×10^2 CFU), pois não apresentaram diferença significativa no *score* inflamatório em comparação ao grupo controle.

Mesmo após 10 dias de infecção, os macrófagos PKH⁺ tratados com ICM e que foram recuperados dos animais apresentaram aumento de Arg1 quando comparados ao grupo NICM, convergindo com o aumento de Arg1 24 horas após a infecção e em valores próximos aos encontrados *in vitro*.

Como o CFU estava diminuído nos pulmões, avaliamos a infecção em células específicas, macrófagos alveolares e intersticiais. Os macrófagos alveolares provenientes dos animais que receberam macrófagos tratados com ICM apresentaram aumento da expressão de iNOS, no entanto, não apresentaram redução na carga bacteriana. Os macrófagos intersticiais também apresentaram aumento de iNOS, que se associou com a diminuição na carga bacteriana. Como os macrófagos alveolares apresentam perfil anti-inflamatório, por serem células associadas à mucosa, isso possivelmente explica que mesmo tendo aumento da enzima iNOS, não conseguiram diminuir a carga bacteriana.

Ao avaliar a expressão de IL-1 β intracelular nas células totais dos pulmões, encontramos maior expressão de IL-1 β nas células provenientes dos animais que receberam macrófagos tratados com ICM, resultado que se correlaciona com o fato de que animais deficientes para IL-1 β sucumbem a infecção rapidamente (MAYER-BARBER et al., 2010). Ao avaliar a morte celular de macrófagos alveolares, encontramos menos morte por apoptose

no grupo de animais ICM, sugerindo que essas células permanecem mais vivas. Macrófagos alveolares que apresentam diminuição na morte podem migrar mais para o interstício pulmonar por via dependente de IL-1 β , e isso permitiria que macrófagos intersticiais entrassem em contato com a bactéria (COHEN et al., 2018), e assim ocorresse o controle da carga bacteriana, que é visto na diminuição da frequência de macrófagos intersticiais positivos para mCherry.

6. CONCLUSÃO

As células epiteliais alveolares do tipo II infectadas por *M. tuberculosis* modulam a resposta dos macrófagos, aumentando a atividade microbicida e inflamatória, resultando em maior controle da infecção pulmonar. A identificação das moléculas presentes no meio condicionado (ICM) poderá possibilitar o surgimento de novos alvos para terapias imunológicas contra a tuberculose.

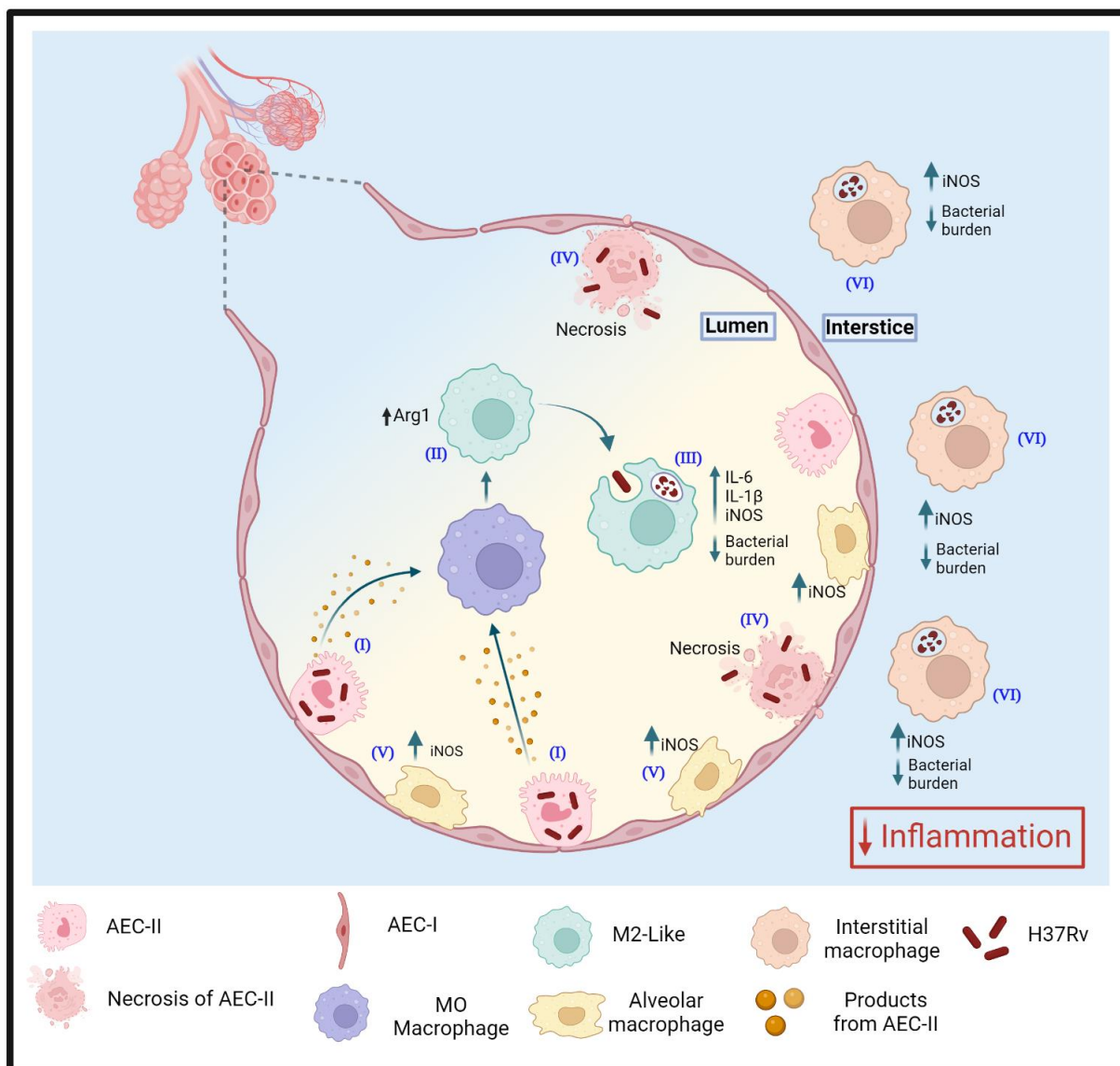


Figura 21. Resumo. (I) Com a chegada do *M. tuberculosis* nos alvéolos, ocorre a infecção das AEC-II que secretam produtos em resposta à presença do bacilo; (II) esses produtos em contato com macrófagos aumentam a expressão de Arg1 induzindo um perfil de M2-like, caracterizado por produção de citocinas de perfil misto. (III) A infecção desses macrófagos M2-like resulta em alta produção de IL-6, IL-1β e alta expressão da enzima iNOS, diminuindo a carga bacteriana. (IV) Após a infecção das células epiteliais, ocorre morte por necrose e disseminação do bacilo. (V) Macrófagos alveolares de animais que receberam BMDM tratados com ICM aumentam a expressão de iNOS, mas não reduzem a carga bacteriana. (VI) Quando a infecção passa para o parênquima pulmonar, macrófagos intersticiais do hospedeiro aumentam a expressão de iNOS e diminuem a carga bacteriana.

7. REFERÊNCIAS

- AMARAL, E. P. et al. A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 3, p. 556–570, 2019.
- ARMSTRONG, L. et al. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 31, n. 2 I, p. 241–245, 2004.
- ARORA, S. et al. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. **Immunobiology**, v. 223, n. 4–5, p. 383–396, 2018.
- BANKS, D. A. et al. Mycobacterium tuberculosis Inhibits Autocrine Type I IFN Signaling to Increase Intracellular Survival. **J Immunol**, v. 202, n. 8, p. 2348–2359, 2019.
- BASIL, M. C. et al. The Cellular and Physiological Basis for Lung Repair and Regeneration: Past, Present, and Future. **Cell Stem Cell**, v. 26, n. 4, p. 482–502, 2020.
- BECKWITH, K. S. et al. Plasma membrane damage causes NLRP3 activation and pyroptosis during Mycobacterium tuberculosis infection. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2020.
- BLANCO-MELO, D. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036–1045.e9, 2020.
- BLUMENTHAL, R. L. et al. Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 2, p. 258–264, 2001.
- BUTLER, R. E. et al. Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis-infected host cells to phospho-MLKL driven necroptosis is dependent on cell type and presence of TNF α . **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1820–1832, 2017.
- CASTRO-GARZA, J. et al. Demonstration of spread by Mycobacterium tuberculosis bacilli in A549 epithelial cell monolayers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, n. 2, p. 145–149, 2002.
- CAVAILLON, J.-M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 413–424, 2011.
- CHELEN, C. J. et al. Human alveolar macrophages present antigen ineffectively due to defective expression of B7 costimulatory cell surface molecules. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 3, p. 1415–1421, 1995.
- CHEN, M.; GAN, H.; REMOLD, H. G. A Mechanism of Virulence: Virulent Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3707–3716, 2006.
- CHO, H. J. et al. Different macrophage polarization between drug-susceptible and multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020.
- CHU, C. et al. ARG1 could be expressed by human, but not represent for repair. **bioRxiv**, v. 1, p. 1–20, 2020.

- CHUQUIMIA, O. D. et al. Alveolar Epithelial cells are critical in protection of the respiratory tract by secretion of factors able to modulate the activity of pulmonary macrophages and directly control bacterial growth. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 381–389, 2013.
- COHEN, S. B. et al. Alveolar macrophages provide an early Mycobacterium tuberculosis niche and initiate dissemination. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 3, p. 439–446.e4, 2018.
- CRAPO, J. D. et al. Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. **American Review of Respiratory Disease**, v. 128, n. 2 II Suppl., 1983.
- CROWELL, R. E. et al. Alveolar and interstitial macrophage populations in the murine lung. **Experimental Lung Research**, v. 18, n. 4, p. 435–446, 1992.
- DANELISHVILI, L. et al. Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 649–660, 2003.
- DAVIS, J. D.; WYPYCH, T. P. Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 5, p. 978–990, 2021.
- DHIMAN, R.; RAJE, M.; MAJUMDAR, S. Differential expression of NF- κ B in mycobacteria infected THP-1 affects apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1770, n. 4, p. 649–658, 2007.
- DIVANGAHI, M. et al. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 8, p. 751–758, 2010.
- DOBOS, K. M. et al. Necrosis of Lung Epithelial Cells during Infection with Mycobacterium tuberculosis Is Preceded by Cell Permeation. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6300–6310, 2000.
- DONADO, C. A. et al. A Two-Cell Model for IL-1 β Release Mediated by Death-Receptor Signaling. **Cell Reports**, v. 31, n. 1, p. 107466, 2020.
- DORMANS, J. et al. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different Mycobacterium tuberculosis genotypes in a BALB/c mouse model. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 137, n. 3, p. 460–468, 2004.
- ESPINOSA-CUETO, P. et al. Dendritic cells that phagocytose apoptotic macrophages loaded with mycobacterial antigens activate CD8 T cells via cross-presentation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–17, 2017.
- FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 355–366, 2009.
- FRAGA-SILVA, T. F. DE C. et al. COVID-19: Integrating the Complexity of Systemic and Pulmonary Immunopathology to Identify Biomarkers for Different Outcomes. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–18, 2021.
- FREY, A. et al. More Than Just a Barrier: The Immune Functions of the Airway Epithelium in Asthma Pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. April, p. 1–22, 2020.
- FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. **Tuberculosis** *The Lancet*, 2019.
- GAGNEUX, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. **Philosophical**

- Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1590, p. 850–859, 2012.
- GIBBINGS, S. L. et al. Three unique interstitial macrophages in the murine lung at steady state. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 57, n. 1, p. 66–76, 2017.
- GLEESON, L. E. et al. Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Induces Aerobic Glycolysis in Human Alveolar Macrophages That Is Required for Control of Intracellular Bacillary Replication. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 6, p. 2444–2449, 2016.
- GUILLIAMS, M. et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 10, p. 1977–1992, 2013.
- GUO, X. et al. Autophagy protects type II alveolar epithelial cells from Mycobacterium tuberculosis infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 432, n. 2, p. 308–313, 2013.
- HALEY, P. J. et al. Comparative morphology and morphometry of alveolar macrophages from six species. **American Journal of Anatomy**, v. 191, n. 4, p. 401–407, 1 ago. 1991.
- HAYAKAWA, K.; WANG, X.; LO, E. H. CD200 increases alternatively activated macrophages through CREB - C/EBP-beta signaling. **J. Neurochem**, v. 136, n. 6, p. 900–906, 2016.
- HEWITT, R. J.; LLOYD, C. M. Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 6, p. 347–362, 2021.
- HOLT, B. P. G. et al. Downregulation of the Antigen Presenting Cell Function (s) of Pulmonary Dendritic Cells In Vivo by Resident Alveolar Macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 2, p. 397–407, 1993.
- HORANI, A.; FERKOL, T. W. Understanding Primary Ciliary Dyskinesia and Other Ciliopathies. **Journal of Pediatrics**, v. 230, p. 15- 22.e1, 2021.
- HOUBEN, D. et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1287–1298, 8 ago. 2012.
- HUANG, L. et al. Growth of Mycobacterium tuberculosis in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 4, p. 1135–1152, 2018.
- HUANG, Z. et al. Mycobacterium tuberculosis-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas in vitro. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015a.
- HUANG, Z. et al. IL-37 Expression is Upregulated in Patients with Tuberculosis and Induces Macrophages Towards an M2-like Phenotype. **Scand J Immunol**, v. 82, n. 4, p. 370–9, 2015b.
- HUSSELL, T.; BELL, T. J. Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 81–93, 2014.
- JANSSEN, W. J. et al. Fas Determines Differential Fates of Resident and Recruited Macrophages during Resolution of Acute Lung Injury. **American Journal of Respiratory**

- and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 3, p. 547–560, 2011.
- JOHNSTON, S. L. et al. Airway Epithelial Innate Immunity. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. November, p. 1–9, 2021.
- KEANE, J. et al. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 298–304, 1997.
- KELLY, D. M. et al. Bystander macrophage apoptosis after Mycobacterium tuberculosis H37Ra infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 351–360, 2008.
- KHAN, A. et al. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 275–282, 2019.
- KOCH, R. The etiology of tuberculosis. **Berl. Klin. Wochenschr**, v. 15, n. 1, p. 221–230, 1882.
- KROMBACH, F. et al. Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. **Environmental health perspectives**, v. 105 Suppl, n. 5, p. 1261–1263, 1997.
- LASKIN, D. L.; MALAVIYA, R.; LASKIN, J. D. Pulmonary Macrophages. In: **Comparative Biology of the Normal Lung: Second Edition**. [s.l.] Academic Press, 2015. p. 629–649.
- LEE, J. et al. Macrophage Apoptosis in Response to High Intracellular Burden of Mycobacterium tuberculosis Is Mediated by a Novel Caspase-Independent Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, p. 4267–4274, 2006.
- LEEMANS, J. C. et al. Depletion of Alveolar Macrophages Exerts Protective Effects in Pulmonary Tuberculosis in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4604–4611, 2001.
- LEHNERT, B. E.; VALDEZ, Y. E.; HOLLAND, L. M. Pulmonary macrophages: Alveolar and interstitial populations. **Experimental Lung Research**, v. 9, n. 3–4, p. 177–190, 1985.
- LERNER, T. R. et al. Mycobacterium tuberculosis replicates within necrotic human macrophages. **The Journal of cell biology**, v. 216, n. 3, p. 583–594, 2017.
- LURIER, E. B. et al. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing Analysis of the macrophage-conditioned media for secretion of matrix-remodeling proteins HHS Public Access. **Immunobiology**, v. 222, n. 7, p. 847–856, 2017.
- MACMICKING, J. D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus. **Immunology**, v. 94, n. May, p. 5243–5248, 1997.
- MARÍN FRANCO, J. L. et al. Host-Derived Lipids from Tuberculous Pleurisy Impair Macrophage Microbicidal-Associated Metabolic Activity. **Cell Reports**, v. 33, n. 13, p. 1–14, 2020.
- MARTINS, N. S. et al. Artepillin c reduces allergic airway inflammation by induction of monocytic myeloid-derived suppressor cells. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1–14, 2021.
- MAUS, U. A. et al. Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p. 227–235, 2006.

- MAYER-BARBER, K. D. et al. Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 β Production Is Critical for Host Resistance to Mycobacterium tuberculosis and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 3326–3330, 2010.
- MCQUATTIE-PIMENTEL, A. C.; BUDINGER, G. R. S.; BALLINGER, M. N. Monocyte-derived alveolar macrophages: The dark side of lung repair? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 58, n. 1, p. 5–6, 2018.
- METCHNIKOFF, E. Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei Wirbellosen Thieren. **Arbeit Zoologischen Instituten, Universität Wien**, v. 5, p. 141–168, 1883.
- MICHELET, X. et al. Lysosome-mediated plasma membrane repair is dependent on the small GTPase, Arl8b, and determines cell death type in Mtb infection. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 9, p. 3160–3169, 2018.
- MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.
- MINAKAMI, R.; SUMIMOTO, H. Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (Nox) family. **International Journal of Hematology**, v. 84, n. 3, p. 193–198, 2006.
- MOLLOY, A.; LAOCHUMROONVORAPON, P.; KAPLAN, G. Apoptosis, but Not Necrosis, of Infected Monocytes Is Coupled with Killing of Intracellular Bacillus Calmette-Guérin. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. October, p. 1499–1509, 1994.
- MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.
- MUSTAFA, T. et al. Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non-tuberculous mycobacteria: Role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 150, n. 1, p. 105–113, 2007.
- MVUBU, N. E. et al. Mycobacterium tuberculosis strains induce strain-specific cytokine and chemokine response in pulmonary epithelial cells. **Cytokine**, v. 104, n. 4, p. 53–64, 2017.
- MYRVIK, Q. N.; LEAKE, E. S.; WRIGHT, M. J. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of Mycobacterium tuberculosis. A correlate of virulence. **American Review of Respiratory Disease**, v. 129, n. 2, p. 322–328, 1984.
- PACE, E. et al. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. **Immunology**, v. 124, n. 3, p. 401–411, 2008.
- PAGÁN, A. J. et al. mTOR-regulated Mitochondrial Metabolism Limits Mycobacterium-induced Cytotoxicity. **Cell**, v. 29, n. 185, p. 3720–3738, 2022.
- PASULA, R. et al. Keratinocyte Growth Factor Administration Attenuates Murine Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Infection through Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF)-dependent Macrophage Activation and Phagolysosome Fusion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 11, p. 7151–7159, 2015.
- PETHE, K. et al. The heparin-binding haemagglutinin of M. tuberculosis is required for extrapulmonary dissemination. **Nature**, v. 412, n. 7, p. 190–4, 2001.

- PIÑEROS, A. R. et al. M2 macrophages or IL-33 treatment attenuate ongoing *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- PISU, D. et al. Dual RNA-Seq of *Mtb*-infected macrophages in vivo reveals ontologically distinct host-pathogen interactions. **Cell Reports**, v. 30, n. 2, p. 335–350, 2020.
- PRADO, R. Q. et al. Attenuation of experimental asthma by mycobacterial protein combined with CpG requires a TLR9-dependent IFN- γ -CCR2 signalling circuit. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, n. 9, p. 1459–1471, 2015.
- RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–10, 2014.
- REDENTE, E. F. et al. Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 1, p. 159–168, jul. 2010.
- RODRIGUES, T. S. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-infected alveolar epithelial cells modulate dendritic cell function through the HIF-1 α -NOS2 axis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 4, p. 1225–1238, 2020.
- RÖSLER, B.; HEROLD, S. Lung epithelial GM-CSF improves host defense function and epithelial repair in influenza virus pneumonia—a new therapeutic strategy? **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 3, n. 1, 2016.
- ROY, M. G. et al. Muc5b is required for airway defence. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 412–416, 2014.
- ROY, S. et al. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: An in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, v. 112, n. 3, p. 471–480, 2004.
- RUARO, B. et al. The history and mystery of alveolar epithelial type ii cells: Focus on their physiologic and pathologic role in lung. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–16, 2021.
- RYNDAK, M. B. et al. Transcriptional Profile of *Mycobacterium tuberculosis* Replicating in Type II Alveolar Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–22, 2015.
- RYNDAK, M. B.; LAAL, S. *Mycobacterium tuberculosis* Primary Infection and Dissemination: A Critical Role for Alveolar Epithelial Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. August, p. 1–16, 2019.
- SABATEL, C. et al. Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. **Immunity**, v. 46, n. 3, p. 457–473, 21 mar. 2017.
- SATO, K. et al. Type II Alveolar Cells Play Roles in Macrophage-Mediated Host Innate Resistance to Pulmonary Mycobacterial Infections by Producing Proinflammatory Cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 4, p. 1139–1147, 2002.
- SCORDO, J. M.; KNOELL, L.; TORRELLES, B. Alveolar Epithelial Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection : Active Players or Innocent Bystanders ? **Journal of Innate Immunity**, v. 8, n. 9, p. 3–14, 2016.
- SEBRING, R. J.; LEHNERT, B. E. Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages,

- pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. **Experimental Lung Research**, v. 18, n. 4, p. 479–496, 1992.
- SIVANGALA THANDI, R. et al. Ornithine-A urea cycle metabolite enhances autophagy and controls Mycobacterium tuberculosis infection. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3535, 15 dez. 2020.
- SLY, L. M. et al. Survival of Mycobacterium tuberculosis in Host Macrophages Involves Resistance to Apoptosis Dependent upon Induction of Antiapoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 430–437, 2003.
- SNELGROVE, R. J. et al. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 1074–1083, 2008.
- SOROOSH, P. et al. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 4, p. 775–788, 2013.
- SOUSA, J. et al. Mycobacterium tuberculosis associated with severe tuberculosis evades cytosolic surveillance systems and modulates IL-1 β production. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2020.
- STUTZ, M. D. et al. Necroptotic signaling is primed in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, but its pathophysiological consequence in disease is restricted. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 5, p. 951–965, 2018.
- STUTZ, M. D. et al. Macrophage and neutrophil death programs differentially confer resistance to tuberculosis. **Immunity**, v. 54, n. 8, p. 1758–1771.e7, 2021.
- TAN, S. Y. S.; KRASNOW, M. A. Developmental origin of lung macrophage diversity. **Development (Cambridge)**, v. 143, n. 8, p. 1318–1327, 2016.
- TOULMIN, S. A. et al. Type II alveolar cell MHCII improves respiratory viral disease outcomes while exhibiting limited antigen presentation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2021.
- TZOU, P. et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 737–748, 2000.
- WANG, Q. et al. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. **Cell Research**, v. 20, n. 6, p. 701–712, 2010.
- WEATHERHEAD, J. E. et al. Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. October, p. 1–14, 2020.
- WESTPHALEN, K. et al. Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. **Nature**, v. 506, n. 7489, p. 503–506, 2014.
- WHITSETT, J. A.; ALENGHAT, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 27–35, 2015.
- WHO. Global tuberculosis report 2021. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2021.
- WINAU, F. et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 105–117, 2006.

- WONG, K.-W. The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, p. 1–8, 2017.
- WU, A.; SONG, H. Regulation of alveolar type 2 stem/progenitor cells in lung injury and regeneration. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 7, p. 716–722, 2021.
- ZHAO, X. et al. Bcl-xL mediates RIPK3-dependent necrosis in M. tuberculosis-infected macrophages. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 6, p. 1553–1568, 2017.