

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

LUIZA CUNHA DE CERQUEIRA CÉSAR

**Interação da população de células dendríticas CD103+ com células
epiteliais alveolares do tipo II infectadas por *Mycobacterium
tuberculosis***

Ribeirão Preto

2022

LUIZA CUNHA DE CEQUEIRA CÉSAR

Interação da população de células dendríticas CD103+ com células epiteliais alveolares do tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*

Versão original

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

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

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

São Paulo

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

César, Luiza Cunha de Cerqueira

Interação da população de células dendríticas CD103+ com células epiteliais alveolares do tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

Ribeirão Preto, 2022, 75 p. : 1l; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Bonato, Vânia Luiza Deperon.

1. Célula Epitelial Alveolar do tipo II (AEC-II).
2. Célula Dendrítica (DC) CD103+.
3. *Mycobacterium tuberculosis*.

Nome: César, Luiza Cunha de Cerqueira

Título: Interação da população de células dendríticas CD103+ com células epiteliais alveolares do tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr^a Silvia Beatriz Boscardin

Instituição: ICB - USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr Anderson de Sá-Nunes

Instituição: ICB – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Vânia Bonato, pela dedicação, ensinamentos e oportunidade de realizar este trabalho de mestrado em seu grupo de pesquisa. À Ana Flávia, técnica do laboratório, pelo auxílio em experimentos difíceis e pela sua disposição e zelo em auxiliar no caminhar desse projeto. À Dr^a Thaís Fraga, pela disponibilidade e curiosidade em todos os projetos, por inspirar sempre a dar o nosso melhor. Agradeço ao Dr. Diego Luis Costa, pelos reagentes cedidos que ajudaram na caminhada desse estudo e à sua ajuda no desenvolvimento de experimentos que fazem parte desse trabalho. Agradeço também ao professor Dr. Fausto Almeida, por contribuir para o desenvolvimento de experimentos e à sua aluna, Bianca Texeira Moraes de Oliveira, por conduzir parte desses experimentos. Agradeço também aos demais integrantes do laboratório por auxiliar sempre que me vi em necessidade. Agradeço aos meus colegas de pós-graduação, André Correa, Marina Bonifácio e Juliana Madeira, que me ajudaram a não desanimar e me sentir melhor em suas companhias.

Agradeço aos meus pais, por me auxiliar de diversas formas apoiando meus projetos e por continuarem sempre acreditando em mim. Agradeço ao meu companheiro de vida, Roberto Rosseline, por ser o meu apoio emocional e por sempre me inspirar a dar o meu melhor.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES por promover o auxílio financeiro que auxiliaram durante a realização desse trabalho. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido ao temático “Estratégias para estudar inflamação pulmonar no contexto de comorbidades”, do qual este trabalho faz parte.

César, Luiza Cunha de Cerqueira. Interação da população de células dendríticas CD103+ com células epiteliais alveolares do tipo II infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*. 2022, 75 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

RESUMO

A tuberculose, doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, provoca diversas respostas imunológicas complexas que podem levar à resolução da doença ou seu pior desfecho, a morte do seu hospedeiro. O início da infecção ocorre no microambiente alveolar, no qual a interação de células epiteliais com células dendríticas residentes poderiam contribuir para eliminar ou não os bacilos. Apesar de vários estudos analisarem o papel isolado de células dendríticas ou de macrófagos na infecção por *M. tuberculosis*, poucos estudos levam em consideração a interface das células epiteliais com essas leucócitos. Em nosso estudo, cultivamos uma linhagem (MLE-15) de células epiteliais alveolares do tipo II (AEC-II), que foram infectadas com *M. tuberculosis* (MOI 10), e investigamos se os sobrenadantes dessa cultura, denominado meio condicionado, ativaria a população de células dendríticas (DC) CD103+. Como controles experimentais, usamos meio condicionado de AEC-II não infectadas, LPS ou infecção por *M. tuberculosis*. O meio condicionado de AEC-II infectadas promoveu maturação parcial de DC CD103+, caracterizada pela regulação positiva na expressão CD86 e de CD80, mas não de MHC-II. O estado de maturação parcial foi mantido independente da infecção das DC CD103+ ocorrer antes ou depois do tratamento com o meio condicionado. A maturação parcial das DC CD103+ foi ineficaz em induzir a proliferação e a diferenciação de células T CD4+ produtoras de IFN- γ . Nossos resultados sobre a investigação da interface de AEC-II com DC adicionam conteúdo original sobre as formas de evasão de *M. tuberculosis* da resposta inata. Ainda, nossos resultados mostram que a identificação de moléculas contidas no meio condicionado de AEC-

II infectadas por *M. tuberculosis* podem revelar novos alvos para terapias imunológicas contra a tuberculose.

Palavras-chave: Célula Epitelial Alveolar do tipo II (AEC-II). Célula Dendrítica (DC) CD103+. *Mycobacterium tuberculosis*.

César, Luiza Cunha de Cerqueira. Interaction of CD103+ dendritic cell population with type II alveolar epithelial cells infected by *Mycobacterium tuberculosis*. 2022, 75 p. Master dissertation (Graduate Program in Basic and Applied Immunology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

ABSTRACT

Tuberculosis, a disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*, causes several complex immune responses that can lead to the resolution of the disease or its worst outcome, the death of its host. The beginning of the infection occurs in the alveolar microenvironment, in which the interaction of epithelial cells with resident dendritic cells could contribute to eliminate or not the bacilli. Although several studies have analyzed the isolated role of dendritic cells or macrophages in *M. tuberculosis* infection, few studies consider the interface of epithelial cells with these leukocytes. In our study, we cultured a strain (MLE-15) of type II alveolar epithelial cells (AEC-II), which were infected with *M. tuberculosis* (MOI 10), and investigated whether supernatants from this culture, called conditioned medium, would activate the population of CD103+ dendritic cells (DC). As experimental controls, we used conditioned medium from uninfected AEC-II, LPS or *M. tuberculosis* infection. Conditioned medium from infected AEC-II promoted partial maturation of CD103+ DC, characterized by upregulation in CD86 and CD80 expression, but not MHC-II. The partial maturation state was maintained regardless of whether CD103+ DC infection occurred before or after treatment with the conditioned medium. Partial maturation of CD103+ DC was ineffective in inducing proliferation and differentiation of IFN- γ producing CD4+ T cells. Our results on the investigation of the AEC-II interface with DC add original content on the ways in which *M. tuberculosis* evades the innate response. Furthermore, our results show that the identification of molecules contained in the conditioned medium of AEC-II infected by *M. tuberculosis* may reveal new targets for immunological therapies against tuberculosis.

Keywords: Alveolar Epithelial Cell type II (AEC-II). Dendritic Cell (DC) CD103+.
Mycobacterium tuberculosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

A

AEC – Célula Epitelial Alveolar

B

BMDC – Célula Dendrítica derivada da medula (*Bone Marrow derived Dendritic Cells*)

BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*

D

DC – Célula Dendrítica

E

EV – Vesícula Extracelular

F

FLT3L - Ligante de Tirosina quinase 3 relacionado a Fms

G

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

I

ICM – Meio condicionado de AEC-II infectada

IFN- γ – Interferon gamma

L

LPS – Lipopolissacarídeo

M

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

N

NO – Óxido Nítrico

NICM – Meio Condicionado de AEC-II Não Infectada

P

PAMPS – Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PRR – Receptores de Reconhecimento Padrão

R

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

T

TLR – Receptores *Toll-Like*

TNF – Fator de Necrose Tumoral α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Obtenção de DC CD103+.....	43
Figura 2: Estratégia de Gate usada para a avaliação da expressão de CD80, CD86 e MHC-II em DC CD103+ tratada com meio condicionado de MLE-15 infectada..	44
Figura 3:Meio condicionado de AEC-II infectada promove a maturação parcial de DC CD103+ CD86 e CD80.....	46
Figura 4: DC CD103+ previamente tratadas com ICM e, posteriormente, infectadas regularam positivamente a expressão de CD86 e de CD80.	49
Figura 5: DC CD103+ infectadas e, posteriormente, tratadas com ICM regularam positivamente a expressão de CD86 e de CD80.....	50
Figura 6: Caracterização das vesículas extracelulares purificadas de <i>M. tuberculosis</i> e das células MLE-15 infectadas por <i>M. tuberculosis</i>.....	52
Figura 7: EV purificadas de ICM regularam positivamente a expressão de CD86 e de CD80 e aumentaram a secreção de IL-6.....	54
Figura 8: ICM e NICM regularam negativamente a proliferação e secreção de IFN-γ antígeno-específica por células CD4+..	57
Figura 9: Resumo dos resultados.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Tuberculose.....	18
2.2. Células epiteliares pulmonares do tipo II e a tuberculose.....	22
2.3. AEC-II e células dendríticas na tuberculose	24
2.4. DC CD103+ pulmonar	25
2.5. DC CD103+ e a tuberculose	26
2.6. Vesículas extracelulares.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
3.2.1. Padronizar a diferenciação de DC CD103+ a partir precursores da medula óssea;	31
3.2.2. Avaliar a capacidade de maturação das DC CD103+ induzida pelo meio condicionado de AEC-II, oriundo da infecção ou não com <i>M. tuberculosis</i>	31
3.2.3. Investigar se o efeito do meio condicionado das AEC-II sobre as DC CD103+ seria modulado pela infecção dessas DC com <i>M. tuberculosis</i> ;	31
3.2.4. Investigar o papel de EV na maturação e ativação de DC CD103+;	31
3.2.5. Avaliar a ativação de células T CD4+ por DC CD103+ estimuladas com meio condicionado oriundo da infecção de AEC-II com <i>M. tuberculosis</i>	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Linhagem de células epiteliares alveolares	32
4.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32

4.3. Animais	32
4.4. Células Dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC)	33
4.5. Infecção por <i>M. tuberculosis</i>	34
4.5.1. Infecção de células	34
4.5.2. Infecção de animais.....	34
4.6. Ensaio de fagocitose e <i>killing</i>	35
4.7. Detecção de citocinas	35
4.8. Extração de vesículas extracelulares	36
4.9. Quantificação de vesículas extracelulares	36
4.10. Microscopia eletrônica de transmissão.....	36
4.11. Isolamento de Células T CD4 ⁺	37
4.12. Ensaio de ativação de linfócitos	37
4.12.1. Ensaio para avaliação de células Th1	37
4.12.2. Ensaio de proliferação	38
4.13. Citometria de fluxo.....	38
4.13.1. Marcação de células dendríticas.....	38
4.13.2. Marcação de células T	39
4.14. Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

APÊNDICE I -ESTATÉGIA DE GATE, FMO E REPRESENTATIVOS DE DC E MEIO
CONDICIONADO.....73

APÊNDICE II -ESTATÉGIA DE GATE, FMO E REPRESENTATIVOS DA CO-CULTURA
DE DC E CÉLULAS T CD474

APÊNDICE III - ESTATÉGIA DE GATE, FMO E REPRESENTATIVOS DA CO-CULTURA
DE DC E CÉLULAS T CD475

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que infecta aproximadamente um quarto da população mundial e, apesar dessa alta incidência, apenas 5-10% da população infectada desenvolve a doença ativa (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021, 2021). Com apenas uma pequena parcela da população infectada manifestando a forma ativa da doença, é apontado que interações e mecanismos da bactéria com as células hospedeiras contribuem para a ótima adaptação dessa infecção no ser humano (ABEL et al., 2018; BRITES; GAGNEUX, 2015)

A contenção da tuberculose no hospedeiro é dependente, principalmente, do desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa mediada por células T (JASENOSKY et al., 2015). Dentre as células T, a diferenciação de células T CD4⁺ de perfil Th1, que secretam IFN- γ , é a resposta mais relacionada à proteção contra a tuberculose (JASENOSKY et al., 2015; O'GARRA et al., 2013). O atraso no desenvolvimento de células T CD4⁺ específicas é característico da doença e esse atraso pode definir o curso final da doença no hospedeiro (SIA; RENGARAJAN, 2019). Dentre os vários fatores que contribuem para o atraso do desenvolvimento da resposta adaptativa durante a tuberculose, a inibição da ativação de células dendríticas infectadas pela micobactéria já foi descrita (MADAN-LALA et al., 2014; SRIVASTAVA; ERNST, 2014; WOLF et al., 2007)

As células dendríticas (DC) convencionais residentes nos pulmões são as células apresentadoras de antígeno que promovem a rápida ativação de células T frente às ameaças decorrentes da presença de imunógenos e das infecções que se instalam neste órgão (SHEKHAR et al., 2018). Dentre as populações de células dendríticas residentes dos pulmões, há dois tipos com grande capacidade migratória para os linfonodos: as células dendríticas do tipo 2, que expressam o marcador de superfície CD11b⁺ e as do tipo 1, conhecidas pela expressão do

marcador de superfície CD103+ (GEURTSVANKESSEL; LAMBRECHT, 2008; SCHLITZER et al., 2015).

A maior prevalência de células dendríticas CD103+ residentes nos pulmões de animais infectados por *M. tuberculosis* favorece maior recrutamento de células T CD4+ produtoras de IFN- γ ou de IL-17 e maior recrutamento e maior ativação de células T CD8+ nos pulmões e linfonodos (KOH et al., 2017; SÉRGIO et al., 2015). Porém, apesar de evidências apontarem para o papel benéfico desse subtipo celular durante a tuberculose, outros resultados apontam a DC CD103+ como a célula contrarreguladora da ativação de células Th1 (LAI et al., 2018). Além dos poucos estudos que investigaram o papel desse subtipo de DC na tuberculose, há também a escassez de estudos que investigaram *in vitro* as características dessa célula frente à tuberculose.

Além das células dendríticas residentes nos pulmões, a célula epitelial alveolar do tipo II também entra em contato com os bacilos no momento da infecção. A célula epitelial do tipo II localiza-se nos alvéolos, um dos principais microambientes para ocorrer a disseminação da infecção (PAI et al., 2016). Essa célula epitelial consegue responder e interagir com células do sistema imunológico por meio da secreção de citocinas e quimiocinas (RODRIGUES et al., 2020a). Além dessas moléculas, é observado que vesículas extracelulares (EV) secretadas por essas mesmas células epiteliais durante a infecção por *Streptococcus pneumoniae* possuem capacidade de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (LETSIOU et al., 2021).

A partir de resultados de nosso laboratório que descreveram a ativação indireta de células dendríticas CD11b⁺ pelas células epiteliais alveolares do tipo II infectadas por *M. tuberculosis* (RODRIGUES et al., 2020b), consideramos importante avaliar qual o papel de células dendríticas CD103+ frente à interação com moléculas e vesículas secretadas por células epiteliais alveolares do tipo II durante a infecção por *M. tuberculosis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tuberculose

Em 1882, Robert Koch descobriu o bacilo causador da tuberculose (SAKULA, 1982). É descrito que as micobactérias existem há milhares de anos e, com o processo de industrialização e urbanização, a tuberculose foi disseminada rapidamente (HERSHKOVITZ et al., 2015). Causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), a tuberculose causa sintomas como febre, falta de apetite, perda de peso, suor noturno, e hemoptise (tosse seguida de sangue) em casos graves da doença (PAI et al., 2016).

A tuberculose é uma doença que atinge em média 10 milhões de pessoas e provoca em torno de 1,3 milhões de mortes ao ano no mundo (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021, 2021). De forma global, tem se observado uma diminuição da incidência de tuberculose desde 2015 até 2020 (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021, 2021). Porém, na região das Américas existe um lento aumento da incidência, que é atribuído ao aumento de casos no Brasil. Em adição, o Brasil é um dos três países com a menor renda per capita que sofrem com a alta incidência da doença, o que ressalta a importância do melhor conhecimento dessa doença no país (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021, 2021).

Aproximadamente um quarto da população mundial está infectada por *M. tuberculosis* e apenas 5-10% dos indivíduos infectados desenvolvem tuberculose ativa (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021, 2021). Devido à grande parte da população infectada não desenvolver a doença ativa, estudos atuais classificam a infecção por *M. tuberculosis* como uma doença heterogênea com espectro pontuado pela fase ativa, subclínica, latente e pela fase resolutive da doença (LIN; FLYNN, 2018; PAI et al., 2016). Com quase dois bilhões de pessoas infectadas no mundo e a grande maioria apresentar a forma latente da doença, é de grande interesse investigar e esclarecer as relações das respostas imunológicas do

hospedeiro com a bactéria, principalmente os mecanismos que levam à supressão da doença (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021, 2021).

Um dos cenários que ilustra as complexas relações imunológicas durante a tuberculose é a coinfeção com o vírus da AIDS (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021, 2021). A coinfeção por HIV-1 aumenta o risco de reativação da tuberculose latente e aumenta a mortalidade desses pacientes (BELL; NOURSADEGHI, 2018). Isso está relacionado à atividade imunossupressora do vírus, que envolve a depleção, principalmente, de células T CD4⁺, afetando a defesa do hospedeiro contra a micobactéria (BELL; NOURSADEGHI, 2018).

Por meio da produção de IFN- γ , as células T CD4⁺ são importantes na ativação e reposta pró-inflamatória de fagócitos e na diminuição do infiltrado polimorfonuclear pulmonar (DOMINGO-GONZALEZ et al., 2016). Em um estudo de Nandi e colaboradores, animais RAG2^{-/-}, que não possuem linfócitos maduros, apresentaram um maior acúmulo de neutrófilos no pulmão dos animais infectados. Com a transferência de células T CD4⁺ maduras, a sua produção de IFN- γ reduziu o número de neutrófilos infiltrados, o que levou à maior sobrevivência desses animais (NANDI; BEHAR, 2011). Quando as células T CD4⁺ são depletadas, isso provoca a diminuição da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2) e a diminuição de IFN- γ , o que resulta na reativação da tuberculose em pacientes coinfectados (DOMINGO-GONZALEZ et al., 2016).

Porém, há um aumento no risco de infecção por *M. tuberculosis* em pacientes já infectados por HIV-1 logo após a soro conversão e antes mesmo da depleção grave de células T CD4⁺ (O'GARRA et al., 2013; SONNENBERG et al., 2005). Isso chama à atenção para a atuação de células de defesa primária no controle da doença, como as células dendríticas (DC), que apresentam diminuição da expressão de moléculas coestimuladoras e da molécula do MHC HLA-DR, quando infectadas (SINGH; LI; SCHOREY, 2015). Além dos leucócitos de defesa inata, outras

células não mielóides também participam da rede de interações imunológicas que ocorre durante a doença (RODRIGUES et al., 2020a).

Em seu trajeto ao microambiente alveolar, a micobactéria é reconhecida por diversas células a partir dos PRR (*Pattern Recognition Receptors*), dentre as quais os TLR (*Toll-Like Receptors*) 2, 4 e 9 que estão bastante envolvidos na resposta contra *M. tuberculosis* (BAFICA et al., 2005; REILING et al., 2002). A participação desses receptores no controle da tuberculose é descrita em estudos como o de Bafica e colaboradores, que observaram o papel fundamental dos receptores TLR2 e TLR9 na produção de citocinas como IL-12 por DC e por macrófagos estimulados com *M. tuberculosis*. Além disso, esses PRR também atuam no controle da inflamação exacerbada, uma vez que animais deficientes para ambos TLR2 e TLR9 apresentaram elevada inflamação pulmonar (BAFICA et al., 2005).

Após o reconhecimento dos antígenos bacterianos pelos PRR, a cascata de sinalização da resposta inata envolve, principalmente, duas moléculas adaptadoras, MyD88 e CARD9 (O'GARRA et al., 2013). Foi observado que animais deficientes de MyD88 apresentaram diminuição da produção de IL-12, TNF e de IFN- γ , e diminuição da expressão de NOS2. Animais deficientes para CARD9 também apresentavam maior susceptibilidade à doença experimental por meio da desregulação da imunidade inata com a menor ativação de macrófagos e de DC (DORHOI et al., 2010; SCANGA et al., 2004).

Além dos TLR, outros PRR participam da resposta inata por também reconhecerem estruturas moleculares de *M. tuberculosis*. Outra classe de PRR de membrana são os Receptores de Lectina tipo C. Dentro dessa classificação, receptores de manose, DEC-205, DC-SIGN e dectin-1 exemplificam os receptores mais conhecidos na tuberculose (DUBÉ et al., 2021). Dentre eles, DC-SIGN, receptor específico de DC, tem a sua função subvertida pela micobactéria, inibindo a sua maturação e a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (GEIJTENBEEK et al., 2003). Os Receptores do tipo NOD (NLR), outra classe de PRR, se localizam no

citoplasma celular e o seu receptor NOD2 é bastante estudado no contexto da tuberculose (DUBÉ et al., 2021). Estudos apontam a importância da resposta de NOD2 contra *M. tuberculosis* em macrófagos e DC, induzindo a produção de Óxido Nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (GANDOTRA et al., 2007).

Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF, são produzidas a partir do reconhecimento do patógeno por PRR e participam da contenção bacteriana, contribuindo para a contenção da infecção (COOPER; MAYER-BARBER; SHER, 2011; SASINDRAN; TORRELLES, 2011). Essa proteção provida pelas citocinas está presente no desenvolvimento da resposta de células T pela IL-6, no qual a inibição *in vivo* dessa citocina durante a exposição inicial ao antígeno, prejudicou a produção de IFN- γ e a proliferação de células T CD4⁺ (LEAL et al., 1999, 2001). Em mecanismos mais diretos, a produção de IL-1 β por macrófagos infectados favorece a produção de TNF e prostaglandina-E2, favorecendo a morte celular por apoptose e assim, a eliminação do bacilo (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016). Apesar de favorecerem o combate inicial da infecção, a exacerbação da resposta inflamatória pode ser prejudicial ao hospedeiro (TEZERA; MANSOUR; ELKINGTON, 2020).

Com a exacerbação das respostas inflamatórias, há a piora a patogênese da doença (GARLANDA et al., 2007). Citocinas, como TNF, relacionadas anteriormente à proteção contra a micobactéria estão associadas ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e à morte celular por necrose (BEHAR et al., 2011; ROCA; RAMAKRISHNAN, 2013). A necrose da célula infectada favorece a liberação da bactéria que, uma vez fora da contenção do fagossoma, continua o ciclo de lise celular em outras células infectadas por meio do fator de virulência ESX-1 (DALLENGA et al., 2017). Garlanda e colaboradores observaram que o bloqueio das citocinas IL-1 β e TNF em animais ausentes de um receptor da família IL-1R, inibidor da resposta inflamatória, promoveu maior sobrevivência à infecção por *M. tuberculosis* (GARLANDA et al., 2007).

Além de induzir a morte de células, o excesso de TNF- α é relacionado com a secreção de matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) (ELKINGTON et al., 2005). Com a expressão excessiva de metaloproteinasas, ocorre a degradação do colágeno, molécula que dá estrutura ao parênquima pulmonar (ELKINGTON et al., 2022). A indução de colagenases ocorre como mecanismo de liberação da bactéria de estruturas formadas para a sua contenção, conhecidas como granulomas (ELKINGTON et al., 2005). A partir de incapacidade de *M. tuberculosis*, há a agregação de macrófagos para a formação de um granuloma (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). Com o persistência da infecção, os macrófagos expressam moléculas de adesão e se diferenciam em macrófagos epitelióides, células que isolam o foco bacteriano (CRONAN et al., 2016; PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). Ao redor dessas células, as células T CD4⁺ e T CD8⁺ e as células dendríticas compõem a estrutura granulomatosa (SHALER et al., 2013).

O granuloma apresenta um papel paradoxal no combate à tuberculose. É estabelecido que pacientes que não desenvolvem bem uma resposta adaptativa não possuem granulomas bem definidos e apresentam alta disseminação da bactéria, com o desenvolvimento de focos extrapulmonares (SHALER et al., 2013). Por outro lado, os granulomas também são considerados como uma estratégia bacteriana para escapar da ação de uma resposta imune efetiva, uma vez que o granuloma grande impede o contato de células T efetoras, macrófagos e moléculas bactericidas com as bactérias (CRONAN et al., 2016; GIDEON et al., 2015). Com isso, é observado que a interação das células que compõem o estrutura do granuloma pode influenciar a resolução desse foco bacteriano ou promover a disseminação da bactéria com o processo de cavitação nos pulmões.

2.2. Células epiteliares pulmonares do tipo II e a tuberculose

O alvéolo, onde ocorre a respiração, é formado por dois tipos de células epiteliares alveolares (AEC), a do tipo I (AEC-I) e a do tipo II (AEC-II) (MASON, 2006). As AEC-I são células achatadas responsáveis pelas trocas gasosas que recobrem

95% do alvéolo, enquanto as AEC-II recobrem apenas 5% da superfície alveolar e produzem as proteínas surfactantes que promovem a eficácia da troca gasosa (MASON, 2006).

Além da sua função nas trocas gasosas, estudos anteriores já observavam a capacidade imunomoduladora das AEC-II frente a estímulos patogênicos (STANDIFORD et al., 1991; THORLEY et al., 2011). Vários estudos também descreveram a capacidade de resposta da AEC-II frente à infecção por *M. tuberculosis*, com a produção de mediadores próinflamatórios, como MCP-1, óxido nítrico (NO) e IL-8 (LIN; ZHANG; BARNES, 1998; ROY et al., 2004).

M. tuberculosis encontra no alvéolo o lugar para o início da sua colonização, infectando, predominantemente, os macrófagos alveolares (COHEN et al., 2018). Além dos macrófagos alveolares, a micobactéria também é capaz de utilizar a AEC-II como nicho de proliferação, e assim, evadir do sistema de defesa do organismo (RODRIGUES et al., 2020b; SCORDO; KNOELL; TORRELLES, 2016). Outros mecanismos de evasão foram observados em micobactérias, como o Bacilo de Calmette e Guérin (BCG), que são capazes de reduzir a resposta inflamatória induzida por AEC-II infectadas ao modular negativamente a expressão de MyD88, molécula adaptadora da sinalização de TLR, por meio de miRNA (MA et al., 2014).

Cepas mais virulentas de *M. tuberculosis*, como a H37Rv, utilizam da citotoxicidade para promover a necrose da AEC-II infectada (DOBOS et al., 2000). Nessas células, *M. tuberculosis* inibe a expressão de genes relacionados à apoptose e favorece genes relacionados à morte celular por necrose (DANELISHVILI et al., 2003). Esse tipo de morte celular promove um estado mais inflamatório e possibilita a evasão da eferocitose, um mecanismo antibacteriano utilizado pelo hospedeiro para conter a disseminação dos bacilos (MARTIN et al., 2012).

Mesmo incapaz de conter a proliferação bacteriana intracelular, a AEC-II responde à infecção com a produção de nitrito (NO₂), IL-6, IFN-γ, e S100A9,

mediadores inflamatórios que podem modular o microambiente alveolar (RODRIGUES et al., 2020b). Foi observado, então, que produtos secretados pela AEC-II infectada são capazes de influenciar a maior ou menor ativação de leucócitos do sistema imunológico inato, como macrófagos e células dendríticas (RODRIGUES et al., 2020b; SCORDO et al., 2019).

2.3. AEC-II e células dendríticas na tuberculose

As células epiteliais do alvéolo e os leucócitos do sistema imunológico inato estão em grande proximidade e isso é necessário para a melhor defesa da mucosa pulmonar (JOHNSTON et al., 2021). Em situação de homeostase, foi observado que as células de defesa residentes dos pulmões, como as DC, apresentavam maior expressão de PRR, quando comparadas a DC de outros órgãos, como o baço (AGRAWAL et al., 2017). Em infecções pulmonares, como a pneumonia viral, foi observado que a AEC contribui para a defesa do hospedeiro com o recrutamento e ativação de DC (UNKEL et al., 2012).

A interação das células epiteliais de vias aéreas com DC durante a tuberculose ainda não está bem descrita, apesar de ter sido mencionada em alguns estudos (DE WAAL et al., 2022; LI; WANG; LIU, 2012; SCORDO; KNOELL; TORRELLES, 2016). Foi observado que dentre as citocinas secretadas pela AEC-II infectada por *M. tuberculosis*, GM-CSF é uma das poucas moléculas relacionadas à ativação de DC (RAHMATPANAHA et al., 2019; SCORDO et al., 2019). Com isso, um estudo do nosso grupo de pesquisa se propôs a avaliar mais detalhadamente a íntima interação das AEC-II e DC CD11c⁺ durante a infecção por *M. tuberculosis* (RODRIGUES et al., 2020b).

A partir da infecção de células AEC-II de linhagem murina, foi observado que essas células apresentavam aumento de citocinas próinflamatórias, como IL-6 e IFN- γ , aumento na secreção da alarmina S100A9 e na produção de nitrito (NO₂) (RODRIGUES et al., 2020b). Por meio de produtos secretados no microambiente externo, a AEC-II infectada consegue promover a ativação de células dendríticas

derivadas da medula óssea (BMDC) CD11c⁺ CD11b⁺, que passam a apresentar aumento na expressão de CD80, CD86, MHC-II e CCR7, além de uma produção aumentada de IL-6 e de IL-1 β (RODRIGUES et al., 2020b).

A interação das AEC II com DC CD103⁺ no contexto da tuberculose ainda não foi descrita na literatura; porém, devido à relevância e à proximidade entre essas duas células no microambiente alveolar, ambiente crítico para o desenvolvimento da resposta imune contra *M. tuberculosis*, acreditamos que essa relação deva ser melhor investigada.

2.4. DC CD103⁺ pulmonar

Como abordado anteriormente, os pulmões são revestidos internamente pela mucosa que entra em contato com diversas moléculas e microrganismos do ambiente externo, precisando, assim, que células de defesa estejam prontas para agir. Dentre as células de defesa, as DC migratórias dos pulmões são responsáveis pela captação do antígeno no ambiente pulmonar e por sua apresentação para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa (COOK; MACDONALD, 2016).

As DC que residem em um órgão e que são responsáveis pela captação e apresentação de antígenos presentes nesse órgão para os linfócitos T de órgãos linfóides secundários são nomeadas de DC migratórias (SUNG et al., 2006). No pulmão, há uma divisão entre as duas principais DC migratórias: as que expressam CD103⁺ e as que expressam CD11b⁺ (SUNG et al., 2006). A DC CD103⁺ pulmonar expressa proteínas das junções de oclusão que permitem a migração e expansão de pseudópodes para o espaço luminal e a captura de antígenos (EISENBARTH, 2019; JAKUBZICK et al., 2008; SUNG et al., 2006).

A diversidade dos papéis que essas subpopulações de DC apresentam frente a infecções e outros estímulos já vem sendo documentada (GEURTSVANKESSEL; LAMBRECHT, 2008). Foi observado que células T CD4⁺ imaturas de animais DO11.10, animais que apresentam TCR transgênico para o reconhecimento de

peptídeo da ovalbumina, apresentam um tipo de diferenciação dependendo da DC que apresenta o antígeno (FURUHASHI et al., 2012). As células T CD4⁺ estimuladas por DC CD103⁺ apresentavam perfil mais Th1 ou Th17, com o aumento na produção de IFN- γ e IL-17A, enquanto as células T estimuladas com DC CD11b⁺ apresentaram maior expressão de IL-4, condizente com a geração de um perfil mais Th2 (FURUHASHI et al., 2012).

Além de uma ativação diferenciada de células T CD4⁺, os subgrupos de DC também apresentam diferença na ativação de células T CD8⁺ (DEL RIO et al., 2007). Desh e colaboradores observaram que antígenos específicos presentes em corpos apoptóticos eram melhor apresentados por DC CD103⁺ ativadas, levando a um maior número de células T CD8⁺ citotóxicas específicas (DESCH et al., 2011). Essa ativação de células T CD8⁺ específicas por DC CD103⁺ é também observada em diversos cenários, como em infecções virais e em durante o câncer (DESAI et al., 2018).

Durante a infecção por *Chlamydia muridarum*, bactéria intracelular, foi observado que a DC CD103⁺ transferidas adotivamente controlaram melhor a doença experimental, causando menor ao tecido pulmonar (SHEKHAR et al., 2018). Esse subgrupo de DC pulmonar promoveu melhor o perfil de resposta Th1 e Th17, quando comparado ao subgrupo de DC CD11b^{high} (SHEKHAR et al., 2018).

2.5. DC CD103⁺ e a tuberculose

Durante a infecção por *M. tuberculosis*, o bacilo evade do sistema de defesa do hospedeiro de diversas formas, como a inversão das funções da DC pulmonar (GEIJTENBEEK et al., 2003; VAN KOOYK; APPELMELK; GEIJTENBEEK, 2003). A DC migratória é a célula residente que tem o papel de ativar a resposta imunológica adaptativa para a contenção da doença (JIAO et al., 2002). A partir disso, foi observado que os estudos acerca desses dois tipos de DC vêm apresentando uma divergência de papéis durante a infecção (KOH et al., 2017; LAI et al., 2018; SÉRGIO et al., 2015).

Camundongos C57BL/6 infectados apresentaram maior número de DC CD103+ nos pulmões comparado aos camundongos BALB/c, seguindo-se, nos animais C57BL/6, uma resposta Th1 mais expressiva (SÉRGIO et al., 2015). Com isso, também foi observado que os animais C57BL/6 apresentaram maior influxo de células T CD4⁺ e T CD8⁺ para os pulmões quando comparado aos animais BALB/c (SÉRGIO et al., 2015).

A partir da depleção específica de DC CD103+ pulmonar em animais infectados, é possível observar o impacto dessas células na ativação de células T (KOH et al., 2017). O estudo aponta de Koh e colaboradores mostrou que as DC CD103+ eram importantes nas primeiras fases da infecção, por serem as primeiras células a migrarem e a apresentarem os antígenos de *M. tuberculosis*, enquanto a DC CD11b+ participa para o desenvolvimento de células T específicas nos linfonodos (KOH et al., 2017). Os dois tipos de DC pulmonares migratórias apresentaram diferentes papéis no combate à tuberculose, onde a DC CD103+ foi importante para o transporte de corpos apoptóticos e ativação de células T CD8+ por meio da apresentação cruzada, enquanto a DC CD11b+ aparentou ter uma maior relação com a ativação de células T CD4+ (KOH et al., 2017).

Apesar de estudos apontarem a importância de ambas os subtipos de DC migratória pulmonar para o desenvolvimento da resposta adaptativa contra *M. tuberculosis*, há discordâncias (LAI et al., 2018). Lai e colaboradores descreveram que células T CD4+ com TCR específico para o antígeno de *M. tuberculosis*, quando co-cultivadas com DC CD103+ isoladas do linfonodo drenante pulmonar de animais infectados, proliferaram menos e produziram menos IFN- γ , sugerindo que a DC CD103+ regula negativamente a resposta Th1 induzida pela DC CD11b+ (LAI et al., 2018).

É possível perceber que os papéis de cada subtipo de DC migratória pulmonar durante a tuberculose ainda não estão bem definidos. A partir disso, levando em consideração a interferência de células não mieloides no contexto da

infecção, Rodrigues e colaboradores observaram em estudos *in vitro* que a AEC-II infectada por *M. tuberculosis* era capaz de ativar BMDC CD11b+ (RODRIGUES et al., 2020b). O estudo destaca a importância do microambiente onde ocorre a infecção, no qual a DC CD11b+ não infectada foi capaz de ser ativada por fatores secretados pela célula epitelial infectada, e possivelmente, favorecer o combate à infecção (RODRIGUES et al., 2020b). No entanto, quando a DC CD11b+ era inicialmente infectada, os fatores secretados pela célula epitelial infectada não foram capazes de ativá-la (RODRIGUES et al., 2020b). Com relação à DC CD103+, nada foi investigado a respeito de sua interação com AEC-II durante a infecção por *M. tuberculosis*.

2.6. Vesículas extracelulares

Vesículas extracelulares (EV) são estruturas de bicamada lipídica que podem carrear conteúdo do interior celular (BROWN et al., 2015). O processo de formação de EV ocorre em todos os organismos vivos e pode funcionar como um sistema de exportação e transferência de moléculas (BROWN et al., 2015). As EV englobam uma população heterogênea que varia entre corpos apoptóticos (2.000 a 50 nm), microvesículas (1.000 a 50 nm) e exossomos (120 a 30 nm). As EV também diferem entre si pelo processo de formação e pelo seu conteúdo interior (WILLMS et al., 2018).

As moléculas carregadas pelas EV variam desde lipídeos de membrana, proteínas citoplasmáticas até material genético, como DNA e RNA (TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019). Em bactérias, um dos organismos mais antigos no estudo de vesiculogênese, a formação de EV ocorre durante a sua fase de crescimento, e é afetado pelos diferentes estímulos do microambiente, como o uso de antibióticos e mesmo a falta de ferro no meio de crescimento (TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019). Com uma grande divergência de tamanho e de composição intravesicular, muitos estudos publicados preferem o uso de termos mais abrangentes, como o de

vesículas extracelulares (EV), quando não há outros métodos utilizados para a precisão da origem e do conteúdo dessas estruturas (TKACH; THÉRY, 2016).

As moléculas presentes na membrana ou no interior dessas vesículas são captadas por outras células, por mecanismos como fagocitose ou endocitose (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Foi observado que essas moléculas conseguem interagir com receptores celulares, como TLR2, e induzir respostas imunológicas (PRADOS-ROSALES et al., 2011). Assim como vários organismos patogênicos, *M. tuberculosis* utiliza as EV como forma de liberar moléculas próprias com grande capacidade imunomoduladora (PALACIOS et al., 2021).

Experimentos *in vitro* mostraram que EV oriundas de *M. tuberculosis* (MEV) apresentavam agonistas lipoproteicos de TLR2 e promoviam resposta inflamatória em macrófagos derivados da medula óssea; porém, também promoveram a diminuição na expressão de MHC-II nessas células (HARDING; BOOM, 2010; PRADOS-ROSALES et al., 2011). Em DC CD11c+ CD11b+ derivadas da medula, as MEV induziram a expressão de CD86, MHC-I e MHC-II, favorecendo a sua capacidade de ativação de células T CD4+, *in vitro* (JURKOSHEK et al., 2016). Porém, a exposição a MEV inibiu a ativação de células T CD4+, que apresentaram diminuição na produção de IL-2 após estímulo com anticorpos contra CD3 (ATHMAN et al., 2017). É notável que o papel imunomodulador de MEV é bem divergente e é dependente de outras características, como o tipo celular avaliado (JURKOSHEK et al., 2016; PALACIOS et al., 2021).

Ao avaliar o papel das MEV de forma sistêmica, foram administradas MEV por via intra-traqueal em animais já previamente infectados. Esses animais apresentaram exacerbação no processo inflamatório e proliferação bacteriana nos pulmões (PRADOS-ROSALES et al., 2011). Porém, quando as MEV foram administradas como reforço em animais já imunizados com a vacina BCG, foi observada proteção com o melhor controle da disseminação de *M. tuberculosis* nos

pulmões comparando-se aos animais vacinados apenas com BCG (PRADOS-ROSALES et al., 2014).

Em outro estudo, a administração por via intranasal com exossomos de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* promoveu produção equivalente de IFN- γ e de IL-2, e menor produção de IL-4 quando comparados aos animais imunizados com BCG (CHENG; SCHOREY, 2013). Em outro tipo celular como as AEC, foi observado aumento da produção de EV quando essas células foram estimuladas por pneumolisina, uma toxina produzida por *Streptococcus pneumoniae* (NERLICH et al., 2018). Essas EV reduziram a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (LETSIOU et al., 2021).

Nesse contexto, a hipótese desse estudo baseou-se na capacidade de DC CD103+ estimuladas com meio condicionado, obtido a partir dos sobrenadantes de AEC-II infectadas com *M. tuberculosis*, apresentarem maturação e capacidade de ativar linfócitos T CD4⁺. Ainda, que as EV teriam papel essencial nesse processo enquanto componentes desse meio condicionado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a interação de células epiteliais alveolares do tipo II (AEC-II) infectadas por *M. tuberculosis* com células dendríticas (DC) CD103+, observando o papel de vesículas extracelulares (EV) nesse cenário.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Padronizar a diferenciação de DC CD103+ a partir precursores da medula óssea;
- 3.2.2. Avaliar a capacidade de maturação das DC CD103+ induzida pelo meio condicionado de AEC-II, oriundo da infecção ou não com *M. tuberculosis*.
- 3.2.3. Investigar se o efeito do meio condicionado das AEC-II sobre as DC CD103+ seria modulado pela infecção dessas DC com *M. tuberculosis*;
- 3.2.4. Investigar o papel de EV na maturação e ativação de DC CD103+;
- 3.2.5. Avaliar a ativação de células T CD4+ por DC CD103+ estimuladas com meio condicionado oriundo da infecção de AEC-II com *M. tuberculosis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagem de células epiteliais alveolares

Células murinas epiteliais alveolares pulmonares do tipo II imortalizadas (MLE-15) foram cultivadas em meio HITES, contendo RPMI (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, EUA) suplementado de 2% de soro bovino fetal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 5µg/mL de insulina, 5µg/mL de transferrina, 5µg/mL de selenito de sódio, 50µg/mL de hidrocortisona, 20µg/mL de β-estradiol, 200mM de glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As células foram cultivadas a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

4.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Para a realização do banco de micobactéria congelado, a cepa H37Rv (American Type Culture Collection 27294, Rockville, MD, USA) foi colocada em cultivo em 60mL de meio Middlebrook 7H9 (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, EUA) enriquecido com glicerol, Tween 80 e 10% de OADC™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e cultivado a 37°C por 3 a 6 dias. As bactérias em crescimento exponencial apresentaram uma densidade óptica de 0,6 a 0,8 e foram então centrifugadas a 3.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. As bactérias foram então ressuspensas em meio 7H9 e congeladas em freezer -80°C em alíquotas de 1 x 10⁸ bactérias/mL.

4.3. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade variando entre 6 e 10 semanas, fornecidos pelo Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Foi obtida a autorização do Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação da FMRP-USP (Protocolo n° 019-2021) para a realização dos procedimentos em animais ou com células provenientes de animais, utilizados

durante este projeto. Os animais utilizados eram *Specific Pathogen Free (SPF)* ou livres de germes patogênicos específicos. A qualidade sanitária dos animais foi mantida pela utilização de um sistema de ventilação individual para cada gaiola, pelo uso de água e ração estéreis e pela manipulação animal sempre ocorrer em uma capela de fluxo laminar. Comida e água foram fornecidas *ad libitum*.

4.4. Células Dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC)

Precusores da medula óssea foram obtidos utilizando a técnica de *flushing* em ossos do fêmur e tíbia de camundongos previamente eutanasiados. Utilizando uma seringa, é aplicado PBS 1X e Soro Bovino Fetal (2%) (GIBCO™ - Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) no osso com suas epífises já removidas. Com a pressão necessária, a medula óssea foi lavada e recolhida em tubo estéril. Com a obtenção das suspensão celular, as hemácias foram eliminadas com a utilização de tampão de lise ACK (Amônia-Cloreto-Potássio). Essas células foram então cultivadas em meio RPMI suplementado de 10% de soro bovino fetal e 50µM de β-mercaptoetanol e 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO™ - Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) e permaneceram em incubadora de atmosfera úmida de 37°C e 5% de CO₂ por 15 dias.

A partir da retirada de precusores da medula óssea, 15 x 10⁶ células foram cultivadas em RPMI completo adicionado de 20 ng/mL de GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) e 200 ng/mL de FLT3L (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) em um volume final de 10 mL. A cultura foi incubada por 15 dias, havendo a adição de mais 5 mL de RPMI completo no 5º dia e a troca total do meio no 9º dia com a adição de 200 ng/mL de FLT3L e de 40 ng/mL de GM-CSF em um volume final de 10 mL (MAYER et al., 2014).

4.5. Infecção por *M. tuberculosis*

4.5.1. Infecção de células

As células infectadas foram as células de linhagem MLE-15 e as BMDC. A MLE-15 foi plaqueada em placas de 24 poços (Eppendorf SE, Hamburg, Alemanha) com 1×10^6 células em um volume final de 900 μL para cada poço. A MLE-15 foi infectada com MOI (*Multiplicity of infection*) 10, que foi calculado a partir dos bancos congelados da micobactéria (1×10^7 bactérias em 100 μL). Após 48h, o meio condicionado infectado (ICM) foi obtido a partir da coleta do sobrenadante dos poços e esterilizado em membrana de 0,22 μm (Corning, Corning, NY, EUA). Da forma semelhante, o meio condicionado não infectado (NICM) foi realizado com MLE-15 não infectadas que foram cultivadas por 48h a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂, de acordo com metodologia descrita previamente (RODRIGUES et al., 2020b).

As BMDC foram plaqueadas em placas de 96 poços (Corning, Corning, NY, EUA) a 2×10^5 células em volume final de 100 μL . As BMDC foram infectadas com MOI 2; suspensão de 4×10^5 bacilos foi ressuspensa no volume de 100 μL de RPMI. Ambas MLE-15 e BMDC foram lavadas duas vezes com PBS 1X ao final de 4 horas de contato com a micobactéria. O controle da infecção da MLE-15 foi feito por meio da diluição do volume de inóculo (100 μL) em 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000, 1:10.000.000. O controle do inóculo de infecção das BMDC foi feito por meio da diluição do volume de inóculo (100 μL) em 1:1000, 1:10.000, 1:100.000. Para ambas as diluições, foram plaqueados 100 μL de cada diluição em placas de 7H11 e colocadas em cultura por 28 dias a 37°C. Após 21 dias, o crescimento bacteriano, o número de *Colony-Forming Units* (CFU), foi contado e corrigido pelo fator de diluição.

4.5.2. Infecção de animais

Alíquotas da bactéria foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em água mili-Q estéril para a concentração de 1000 CFU. Camundongos C56BL/6 foram infectados com inóculo de 1000 CFU em volume de 30 μL . Para

infecção por via orofaríngea, os animais foram previamente anestesiados por via inalatória utilizando Isoforina (Isoflurano, 1mL/1mL) em atmosfera contendo 5% de isoflurano, com fluxo de 1 litro por minuto (LPM) pelo equipamento de anestesia inalatória por infusão (Bonther). Os animais foram utilizados aos 30 dias de infecção. Foi realizado o controle do inóculo, no qual o volume do inóculo (30 µL) foi plaqueado nas seguintes diluições: 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. Foi utilizado também o controle da infecção, no qual um animal infectado foi sacrificado após 24h. Após a maceração mecânica do pulmão infectado, o sobrenadante também foi plaqueado nas diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. Após 21 dias, o crescimento bacteriano, o número de CFU, foi contado e corrigido pelo fator de diluição.

4.6. Ensaio de fagocitose e *killing*

Após 4 horas de infecção, as culturas de DC foram lavadas duas vezes com PBS 1X, lisada com saponina a 0,05% e incubada por 10 minutos na estufa. Após a incubação, foram feitas diluições seriadas e plaqueadas as 4 últimas, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000, em placas de 7H11, que foram cultivadas na estufa por 28 dias, a 37°C e 5% CO₂. Para o ensaio de *killing*, após as 4 horas de fagocitose, as culturas foram lavadas uma vez com PBS 1X para a retirada das bactérias não fagocitadas e incubadas novamente por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas mais uma vez com PBS 1 X, lisadas, diluídas em série e plaqueadas em 7H11, da mesma forma que no ensaio de fagocitose.

4.7. Detecção de citocinas

A citocina IL-6 (curva na base 2: 15,6 a 1000 pg/mL) foi dosada em culturas de MLE-15 e DC, enquanto IL-12 p40 (31,3 a 2000 pg/mL) e IL-10 (31,3 a 2000pg/mL) foram dosadas em culturas de DC. Foram utilizados os kits DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para as citocinas IL-6 e IL-10 e o kit da BioLegend (BioLegend, San Diego, EUA) para a citocina IL-12 p40, de acordo com as instruções do fabricante.

4.8. Extração de vesículas extracelulares

Após a infecção das AEC-II MLE-15 com MOI 10 por 48 horas, o meio condicionado foi coletado, centrifugado a 5.000 x g, a 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 x g, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante da última centrifugação foi então ultrafiltrado por meio do sistema amicon (100kDa) (Millipore, Billerica, MA, EUA), e as vesículas que ficaram retidas pelo sistema amicon foram então ressuspensas e ultracentrifugadas a 60.000 x g, a 4°C por 1 hora. As vesículas extracelulares (EV) formaram um sedimento que foi ressuspenso em água ultrapura com inibidores de protease.

O mesmo procedimento foi realizado para o meio condicionado obtido de AEC-II MLE-15 não infectadas, ou seja, que foram cultivadas por 48 horas apenas em presença de meio de cultura.

4.9. Quantificação de vesículas extracelulares

A quantificação e caracterização do tamanho e distribuição das vesículas foi realizada pela metodologia de análise de nanopartículas (NTA - *Nanoparticle tracking analysis*). A análise foi realizada no equipamento Nanosight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, UK), de acordo com metodologia previamente descrita (BITENCOURT et al., 2022). A técnica foi realizada pela aluna de doutorado, Bianca Texeira de Moraes de Oliveira, no laboratório de pesquisa do professor Dr. Fausto Almeida, no departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.10. Microscopia eletrônica de transmissão

As EV foram fixadas em solução de 2% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, por 4 horas a 4°C. Em seguida, as EV foram ultracentrifugadas a 60.000 x g por 1 hora, a 4°C e ressuspensas em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3 para contraste e visualização no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM – 100 CXII (Hitachi, USA) que faz

parte da central de Equipamentos Multiusuários (USP Multi; disponível em: www.uspmulti.prp.usp.br), localizado no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (FMRP).

4.11. Isolamento de Células T CD4⁺

Baços de animais infectados com *M. tuberculosis* (30 dias de infecção) foram fei macerados e filtrados por um filtro de 100 µm. A suspensão celular oriunda de cada baço foi centrifugada a 1500 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento celular foram adicionados 3mL do tampão de lise ACK para remoção de hemácias, procedendo-se incubação por 3 minutos. A suspensão celular foi lavada com PBS 1X e centrifugada novamente a 450 x g por 10 minutos, a 4°C. As células foram ressuspensas em RPMI completo (20% SBF, 2% penicilina/streptomicina, 2% aminoácido não essenciais, 2% piruvato, e 0,2% β-Mercaptoetanol). O isolamento foi então realizado pelo *CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse*, seguindo as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, EUA).

4.12. Ensaio de ativação de linfócitos

4.12.1. Ensaio para avaliação de células Th1

As BMDC CD103+, 0,8 x 10⁵, foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo U (Corning, Corning, NY, EUA) e co-cultivadas com 1,6 x 10⁵ células T CD4⁺, previamente purificadas dos baços de animais infectados. As BMDC CD103+ foram previamente tratadas com ICM ou NICM por 24 horas. Foram utilizados os peptídeos específicos ESAT6, Ag85b e EsxG, todos a 10 µg/mL, cedidos pelo Dr. Diego Luís Costa (Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP-USP). Além disso, foram realizadas as demais condições experimentais: estímulo policlonal com anticorpos contra CD3 (clone:145-2C11; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e contra CD28 (clone: 37.51; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA); controle negativo, ou seja, células T CD4⁺ que permaneceram em cultura apenas com meio de cultura, sem qualquer estímulo ou tratamento. Nos grupos de estímulo com meio condicionado foi utilizado o próprio meio condicionado como meio de cultura com

suplementação de 20% SBF, 2% penicilia/streptomicina, 2% aminoácido não essenciais, 2% piruvato e 0,2% β -Mercaptoetanol. Após 72 horas de co-cultura, os sobrenadantes foram coletados para a detecção de citocinas por ELISA e as células marcadas para análise por citometria de fluxo de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ .

4.12.2. Ensaio de proliferação

As células T foram ressuspensas a uma concentração de 1×10^6 em solução de PBS e éster succinimidílico da carboxifluoresceína (CFSE) em uma concentração final de 1,25 μ M, seguindo-se incubação em estufa de CO₂ (5%), protegidas da luz, por 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, as células foram tratadas com RPMI completo contendo 5% de soro bovino fetal em volume 9x maior do que o volume inicial, incubando-se por mais 10 minutos, em gelo, para parar a reação. As células T foram, então, centrifugadas a 450 x g, por 10 minutos, a 4°C. Após a ressuspensão, as células T foram co-cultivadas a $1,6 \times 10^5$ /poço com BMDC CD103⁺ a $0,8 \times 10^5$ /poço e então distribuídas em placas de 96 poços de fundo U (Corning). Decorrido o tempo de cultura, as células foram recolhidas, centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Após a fixação (PBS 1X + Paraformaldeído 1%), as células foram analisadas por citometria de fluxo no citômetro FACSCanto™ II (BD, Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), que faz parte da central de Equipamentos Multiusuários (USP Multi; disponível em: www.uspmulti.prp.usp.br).

4.13. Citometria de fluxo

4.13.1. Marcação de células dendríticas

As DC CD103⁺ foram caracterizadas como MHC-II⁺/CD11c⁺/CD103⁺ utilizando os anticorpos monoclonais (mAb) contra MHC-II marcado com PECy7, (clone: M5/114.15.2; Biolegend, San Diego, CA, EUA), contra CD11c marcado com PerCP (clone: N418, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), contra CD103 marcado com APC (clone: M290, BD biosciences), e contra CD11b marcado com FITC (clone: M1/70, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Para avaliar a expressão de CD86 foi utilizado o mAb marcado com PE (clone: GL1, BD

Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e mAb contra CD80, marcado com BV421 (clone: 16-10A1, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA).

As DC CD103⁺ foram centrifugadas a 450 x g, por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em PBS 1X e seguiram para a marcação de citometria. Foi realizado a marcação extracelular, onde a suspensão de 2×10^5 células foram marcadas com marcador de viabilidade FVS 780 (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS 1X. Após centrifugar a 450 x g, por 5 minutos a 4°C as células tiveram os receptores FcγRII/III bloqueados com mAb αCD16/32 (clone: 93, eBioscience, San Diego, CA, EUA). Após 10 minutos, as células foram marcadas com os mAb de interesse em tampão de marcação *AutoMACS Rising solution* adicionado de 0,5% MACS BSA *Stock Solution* (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, EUA), por 30 minutos a 4°C, protegido da luz. Após o tempo de marcação, as células foram novamente centrifugadas a 450 x g, por 5 minutos a 4°C e fixadas em tampão de fixação (PBS 1X + Paraformaldeído 1%). As células totais (100.000 eventos) foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Foi utilizado o FlowJo X software (v 10.0.7; Tree Star, Ashland, OR, EUA) para a análise celular. As células foram analisadas primeiramente em SSC-A (granulosidade) e FSC-A (tamanho), depois foi realizado a exclusão de *doublets* em uma *gate* FSC-H por FSC-A e posteriormente a seleção de células viáveis.

4.13.2. Marcação de células T

As células T CD4⁺ foram caracterizadas pela expressão de CD4⁺/CD44⁺ utilizado os anticorpos monoclonais (mAb) contra CD4 marcado com PerCP (clone: RM4-5, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e contra CD44, marcado com BV510 (clone: IM7, Biolegend, San Diego, CA, EUA). Para a avaliação de células T CD4⁺ reativas com a proteína ESAT6, foi utilizado um tetrâmero de MHC contendo um peptídeo imunodominante de ESAT-6 (I-Ab, ESAT-6 4–17) marcado com APC,

que foi produzido por *NIAID Tetramer Core Facility* (Emory University, Atlanta, GA, EUA), cedido pelo Dr. Diego Luís Costa

Para o controle positivo, a placa de cultura foi incubada a com o mAb CD3 (clone: 145-2C11; BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, EUA) a [2µg/mL] por no mínimo 4 horas antes do ensaio e mAb CD28 (clone: 37.51; BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, EUA) a [1µg/mL]. Após a co-cultura, as células foram centrifugadas a 450 x g, por 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em PBS 1X e seguiram para a marcação de citometria. Foi realizado a marcação extracelular, onde a suspensão de 2,4x 10⁵ células foram marcadas com marcador de viabilidade *LIVE/DEADTM* (Invitrogen, Eugene, OR, EUA). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS 1X. Após centrifugar a 450 x g, por 10 minutos a 4°C as células tiveram os receptores FcγRII/III bloqueados com mAb αCD16/32 (clone: 93, eBioscience, San Diego, CA, EUA). Após 10 minutos, as células foram marcadas com os mAb de interesse em tampão de marcação *AutoMACS Rising solution* (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, EUA) adicionado de 0,5% *MACS BSA Stock Solution* (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, EUA), por 30 minutos a 4°C, protegido da luz. Após o tempo de marcação, as células foram novamente centrifugadas a 450 x g, por 5 minutos a 4°C e fixadas em tampão de fixação (PBS 1X + Paraformaldeído 1%). As células (60.000 a 130.000 eventos) foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento FACSCantoTM II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Foi utilizado o FlowJo X software (v 10.0.7; Tree Star, Ashland, OR, EUA) para a análise celular. As células foram analisadas primeiramente em SSC-A (granulosidade) e FSC-A (tamanho), identificando a população linfocítica. A seguir, foi realizado um *gate* para células viáveis. As células analisadas foram caracterizadas como CD4+ e CD44+.

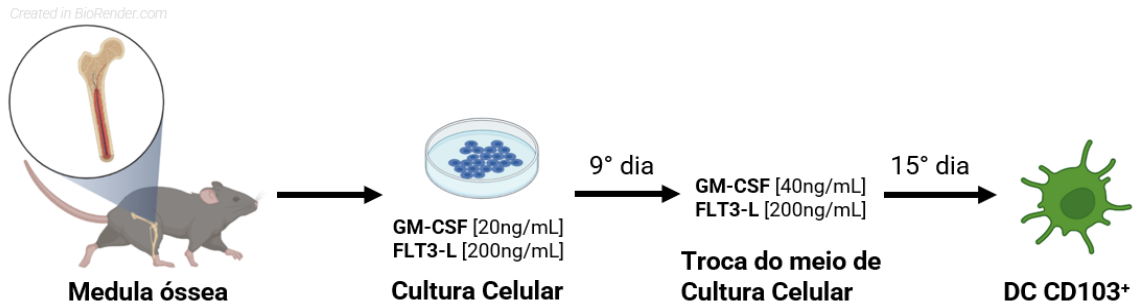
4.14. Análise estatística

A análise de correlação paramétrica realizada para os experimentos com mais de duas condições foi utilizado a Análise de Variância *ordinary one-way*

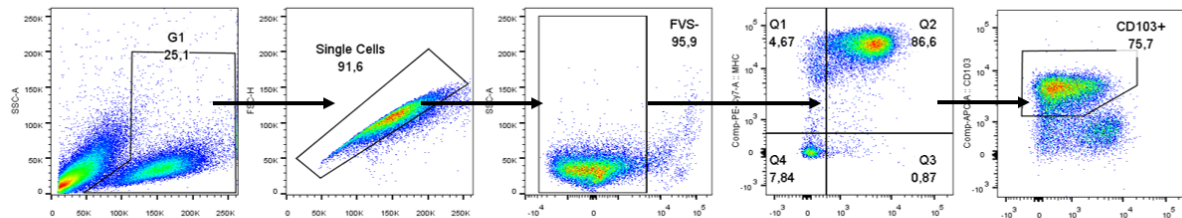
(ANOVA), aplicando o teste de múltiplas comparações de Turkey. Para os experimentos com análise de 2 condições, foi utilizado o teste t não pareado. Pelo método ROUT, foi identificado os *outliers* que foram removidos da análise. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 8.0.

5. RESULTADOS

Dentre as células dendríticas residentes do pulmão, destacam-se dois subgrupos com capacidades migratórias que são caracterizados de forma geral pela apresentação dos marcadores de superfície CD11b+ ou CD103+ (GINHOUX et al., 2009; SUNG et al., 2006). Para a diferenciação DC CD103+ utilizadas neste trabalho, as mesmas foram diferenciadas a partir de precursores da medula, seguindo-se protocolo adaptado a partir do trabalho de Mayer e colaboradores (MAYER et al., 2014). Diferentemente da cultura de DC CD11b+, as DC CD103+ utilizam tanto o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) quanto o ligante tirosina quinase 3 (FLT3L) para o seu desenvolvimento (**Figura 1**). A **Figura 1** ilustra ainda a estratégia de análise usada para avaliar o rendimento de DC CD11c+, MHC-II+, CD103+, assim como CD103+, assim como o controle da análise *Fluorescence Minus One* (FMO).



Estratégia de gate



Controle FMO

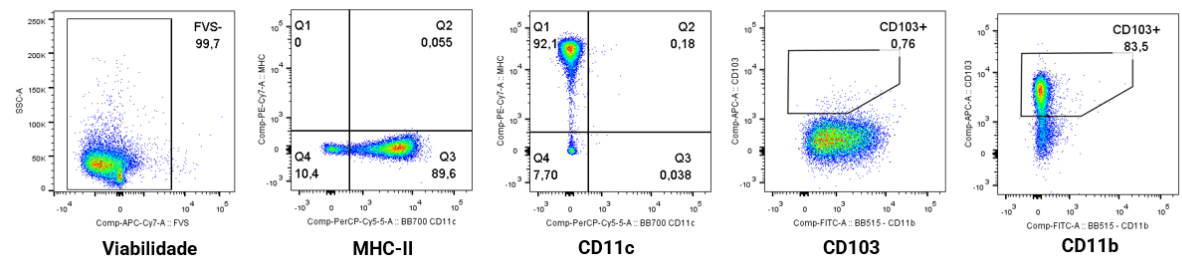
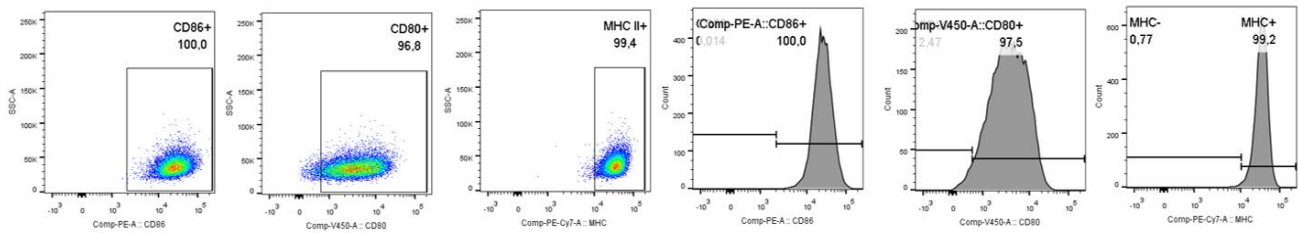


Figura 1: Obtenção de DC CD103+. Precursoras da medula óssea de camundongos fêmeas foram cultivados por 15 dias na presença de GM-CSF e FLT3L, seguindo-se a troca de meio no 9º dia, dobrando a concentração de GM-CSF e mantendo a mesma concentração de FLT3-L. Após a diferenciação, as células foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho e granulosidade (G1), seguida da exclusão de *doublets* (*Single Cells*), células viáveis (FVS-), células CD11c⁺ MHC-II⁺ (Q2), e CD103+.

Para as análises em citometria de fluxo dos marcadores CD80, CD86 e MHC-II em DC CD103+, utilizamos a estratégia de análise ilustrada na **Figura 2**. As *gates* foram definidas de acordo com o respectivo controle negativo de cada fluorocromo utilizado, o FMO. Assim, foi mantido a mesma estratégia para as subsequentes análises.

Estratégia de gate



Controle FMO

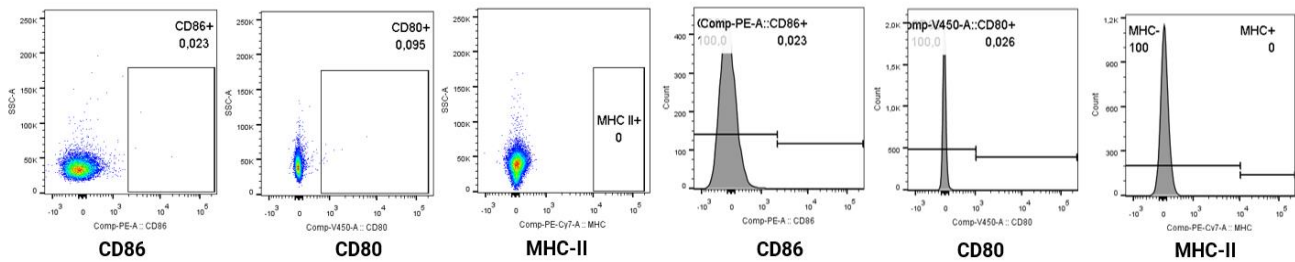


Figura 2: Estratégia de Gate usada para a avaliação da expressão de CD80, CD86 e MHC-II em DC CD103+ tratada com meio condicionado de MLE-15 infectada. A estratégia de *gate* apresentada é um representativo das análises de expressão de moléculas coestimuladoras em DC CD103+ estimuladas por meio condicionado de MLE-15 infectada.

A AEC-II é uma das primeiras células do microambiente alveolar a entrar em contato com os bacilos. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa mostrou como os fatores secretados pelas células MLE-15, uma AEC-II de linhagem murina infectada por *M. tuberculosis*, foi capaz de modular positivamente a expressão das moléculas coestimuladoras CD86 e CD80, a expressão de MHC-II e do receptor CCR7 em BMDC CD11b⁺ (RODRIGUES et al., 2020b). Considerando que outros subtipos de DC também estão presentes nos pulmões, questionamos qual seria o perfil de ativação de DC CD103+ em contato com o meio condicionado oriundo de AEC-II infectadas. BMDC CD103+ foram estimuladas com meio condicionado tanto de célula epitelial alveolar não infectada (NICM) quanto de célula epitelial infectada (ICM), e foi avaliada a expressão das moléculas coestimuladoras CD86 e CD80, e também a expressão de MHC-II por citometria de fluxo.

Os fatores secretados por AEC-II infectadas induziram a maturação parcial de DC CD103+ ao promover o aumento significativo da intensidade média de fluorescência (MFI) de CD86 e de CD80 em BMDC CD103+ estimuladas por ICM (**Figura 3a, 3b**). Porém, esse aumento não foi observado na expressão de MHC-II (**Figura 3c**). O controle positivo LPS aumentou significativamente a expressão de CD86 e de CD80, e reduziu a expressão de MHC-II quando comparado ao controle negativo, que foram as DC CD103+ cultivadas apenas em presença de meio de cultura, sem qualquer estímulo (LPS) ou sem qualquer tratamento (ICM ou NICM) (**Figura 3a-c**).

Além da expressão de moléculas coestimuladoras, foi analisado a produção de IL-10 e IL-6 por ELISA. Observamos tanto um aumento da produção de IL-6, que foi superior aos níveis presentes no ICM utilizado, quanto baixos níveis de IL-10, tanto em DC estimulada por ICM quanto por NICM, quando comparada ao estímulo positivo de LPS (**Figura 3d e 3e**).

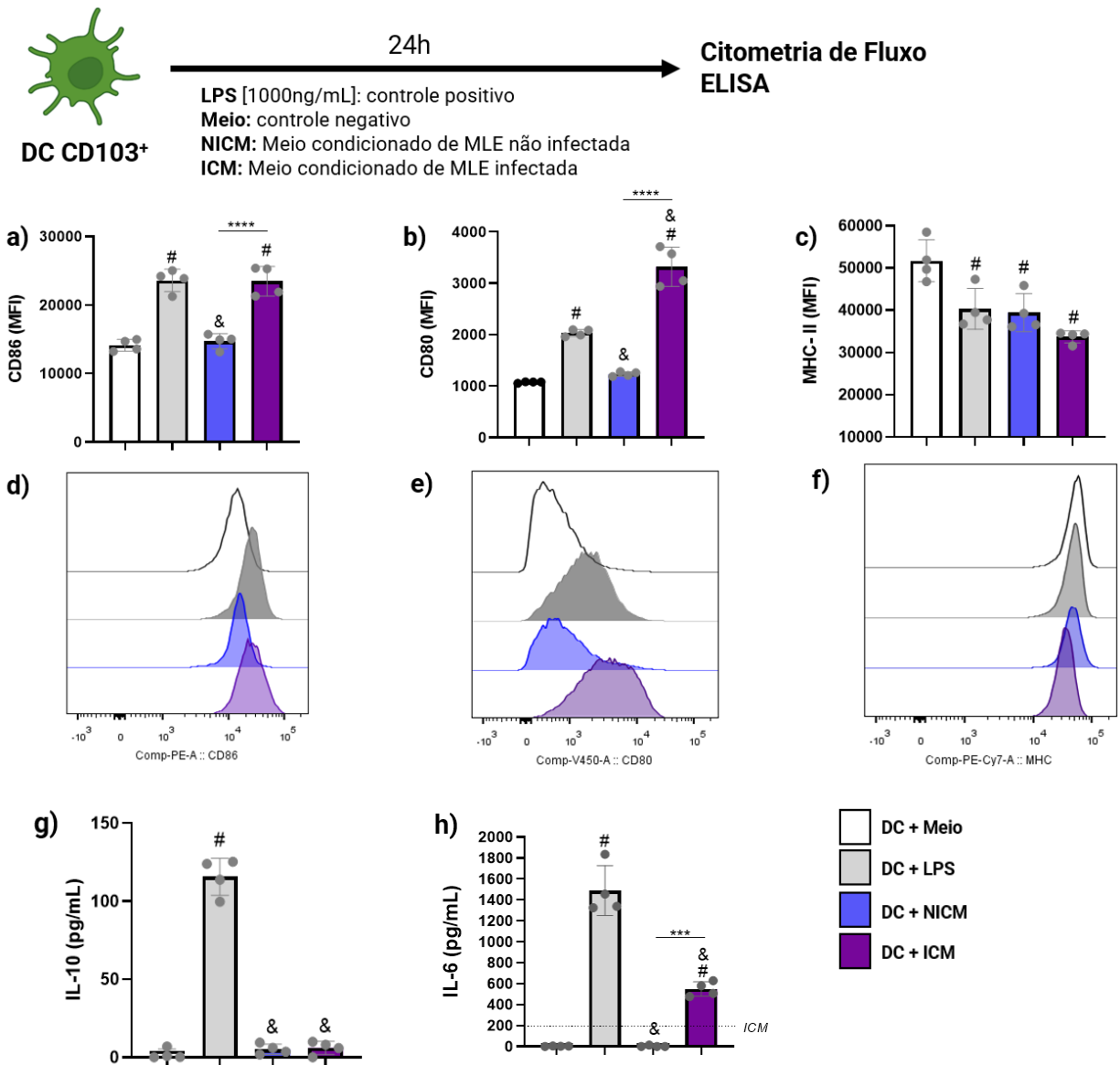


Figura 3:Meio condicionado de AEC-II infectada promove a maturação parcial de DC CD103⁺ CD86 e CD80. DC CD103⁺ foram estimuladas com LPS [1000 ng/mL], usado como controle positivo, meio condicionado de MLE-15 não infectada (NICM) ou de MLE-15 infectada (ICM) - MOI 10. Como controle negativo, as DC CD103⁺ foram cultivadas apenas com meio de cultura, sem estímulo ou tratamento (Meio) Os resultados **a-c** são de um experimento representativo realizado em quadruplicata, reproduzido 3 vezes independentemente. O resultado **e** foi obtido de um experimento. # P<0,05 comparado ao controle negativo; & P<0,05 comparado com o controle positivo; ***P<0,001; ****P<0,0001.

Durante a infecção, as micobactérias podem infectar DC que entraram previamente em contato com fatores secretados por AEC-II infectadas. Com isso, nós nos questionamos se DC CD103+ que entraram previamente em contato com esse microambiente, conseguiriam manter o mesmo perfil de maturação parcial após a infecção com *M. tuberculosis*. Para isso, a DC CD103+ previamente estimulada com meio condicionado (ICM) foi colocada em contato com a micobactéria e 24 horas depois foi avaliada a expressão de moléculas coestimuladoras, e de MHC-II por citometria de fluxo (**Figura 4**).

Quanto à expressão de CD86, foi possível observar como descrito na Figura 2, que o estímulo prévio com ICM regulou positivamente a expressão de CD86, avaliada pela MFI, e a infecção com *M. tuberculosis* não teve efeito adicional ou de regulação negativa na expressão dessa molécula (**Figura 4a**). A DC CD103+ previamente tratada com ICM, e posteriormente infectada, expressou aumento significativo, também analisado pela MFI, de CD80 quando comparada com a DC apenas infectada, não tratada, e à DC previamente tratada com NICM (**Figura 4b**). Enquanto ICM não modulou a expressão de MHC-II, como apresentado na **Figura 2**, a infecção com *M. tuberculosis* das DC CD103+ previamente tratadas com ICM, regulou negativamente a expressão dessa molécula do MHC comparada com o controle negativo (Meio). A infecção apenas (Mtb) não foi eficiente em regular positivamente MHC-II, como fez com as moléculas CD86 e CD80 (**Figura 4a, b, c**). O aumento das moléculas coestimuladoras CD86 e CD80 pode ser observado também pela representação em histograma nas **Figuras 4d, 4e**, respectivamente. Assim também é observado que a expressão de MHC-II não é alterada (**Figura 4f**). Apesar da regulação positiva em DC CD103+ observada, o estímulo prévio com ICM não conseguiu a diminuição de CFU esperada (**Figura 4g**).

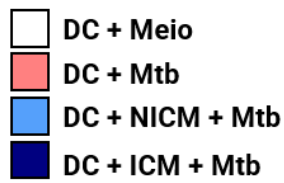
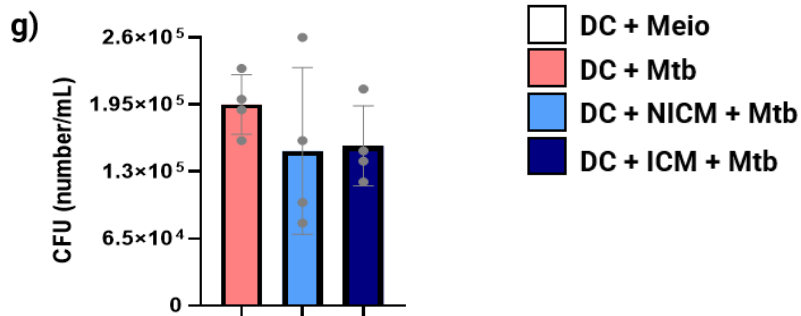
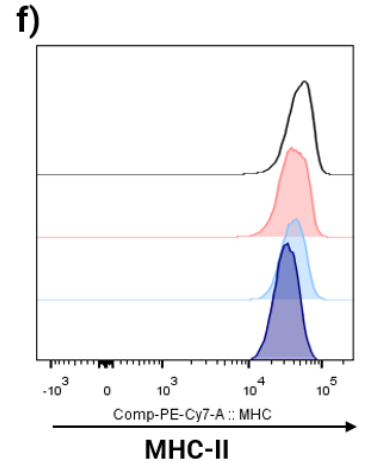
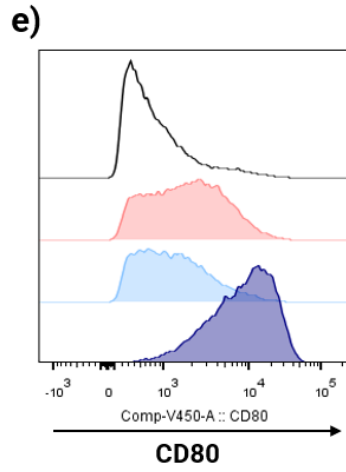
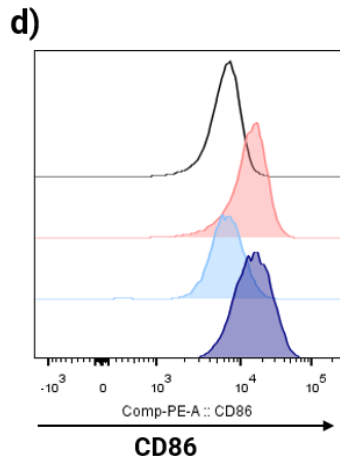
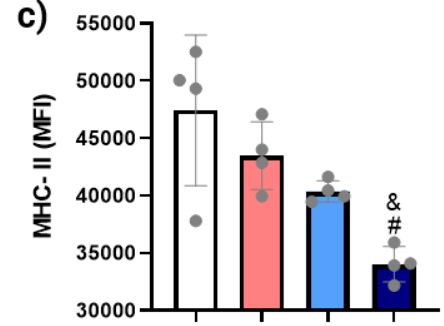
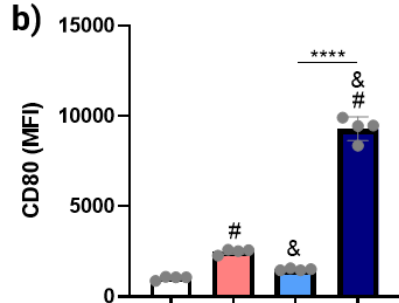
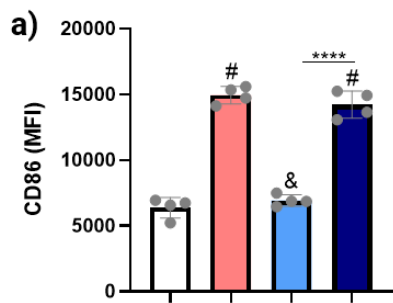
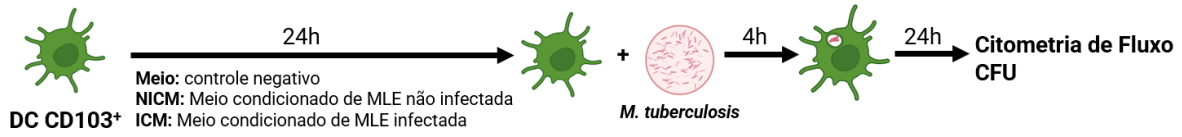


Figura 4: DC CD103+ previamente tratadas com ICM e, posteriormente, infectadas regularam positivamente a expressão de CD86 e de CD80. DC CD103+ foram estimuladas com ICM ou NICM por 24 horas. Após esse estímulo, as células foram colocadas em contato com *M. tuberculosis* (Mtb) por 4 horas e, posteriormente, lavadas. Após 24 horas, as DC CD103+ nas diferentes condições experimentais foram avaliadas. Os resultados **a-c** são de um experimento representativo realizado em quadruplicata, reproduzido 2 vezes independentemente. Os resultados **g** é de um experimento representativo realizado em quadruplicata, reproduzido 1 vez. Em **d, e e f** é apresentado um representativo em histograma da expressão das moléculas CD86, CD80 e MHC-II, respectivamente # $P < 0,05$ comparada ao controle negativo; & $P < 0,05$ comparado com o controle positivo; **** $P < 0,0001$.

Nós hipotetizamos um outro cenário que poderia ocorrer durante a infecção por *M. tuberculosis*: seria a DC CD103+ residente do pulmão ser primeiramente infectada e, posteriormente, entrar em contato com os fatores secretados pela AEC-II infectada. Para investigar se essa célula conseguiria ser ativada pelo ICM mesmo após a infecção, foi realizada, primeiramente, a infecção com a micobactéria e, posteriormente, o estímulo com o ICM (**Figura 5**). Como é possível observar, a expressão de CD86 e CD80 foram significativamente maiores comparadas tanto com a condição de DC CD103+ apenas infectadas quanto quando comparadas com a condição das células infectadas, e posteriormente, estimuladas com NICM (**Figura 5a, 5b**). Novamente, a expressão do MHC-II não mostrou alteração com os diferentes estímulos (**Figura 5c**). Esses resultados são observados na forma de histograma, onde as moléculas CD86, CD80 e MHC-II são representadas pelas **Figuras 5d, 5e e 5f**, respectivamente. Como observado (**Figura 5a e 5b**), DC CD103+ infectada estimulada com ICM promove o deslocamento dessa população para a direita no histograma, demonstrando o aumento do MFI das moléculas coestimuladoras CD86 e CD80 (**Figura 5d e 5e**). A partir da avaliação de CFU, observamos que os estímulos NICM e ICM promoveram um maior controle bacteriano quando comparado à célula infectada apenas (**Figura 5g**). Observamos também que o estímulo ICM promove um controle da proliferação bacteriano ainda maior quando comparado ao estímulo NICM (**Figura 5g**).

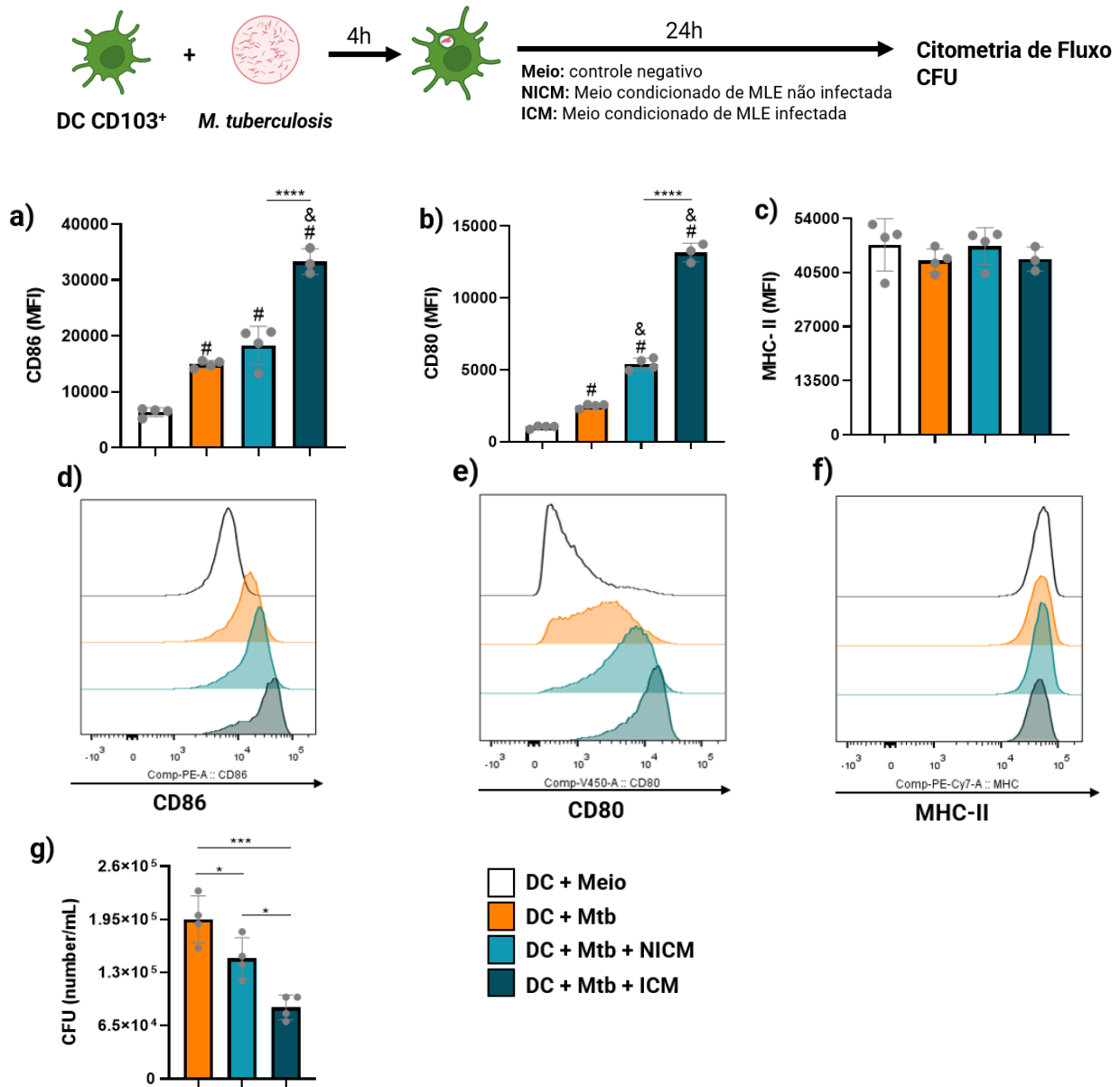


Figura 5: DC CD103⁺ infectadas e, posteriormente, tratadas com ICM regularam positivamente a expressão de CD86 e de CD80. DC CD103⁺ foram infectadas com MOI 2. Após 4 horas, as culturas foram lavadas para a retirada das bactérias não fagocitadas e, posteriormente, tratadas com ICM ou NICM. Após 24 horas, as DC CD103⁺ foram avaliadas por citometria de fluxo e quanto ao ensaio de CFU. Em **d**, **e** e **f** é apresentado um representativo em histograma da expressão das moléculas CD86, CD80 e MHC-II, respectivamente. Os resultados **a-c** são de um experimento representativo realizado em quadruplicata, reproduzido 2 vezes independentemente. Os resultados **g** é de um experimento representativo realizado em quadruplicata, reproduzido 1 vez. # P<0,05 comparado ao controle negativo; & P<0,05 comparado com o controle positivo; **** P<0,0001; *** P<0,001; * P<0,05.

Os resultados apresentados até o momento mostram que ICM pode ativar a maturação ao menos parcial das DC CD103+ em diferentes cenários de infecção hipotetizados. A partir de estudos que apontam as vesículas extracelulares como novas formas de comunicação entre células, foi questionado se vesículas extracelulares estariam presentes e se apresentariam uma capacidade imunomoduladora (BROWN et al., 2015; TKACH; THÉRY, 2016).

A investigação de vesículas extracelulares (EV) secretadas foi feita em meio de cultivo 7H9 da *M. tuberculosis* e do meio condicionado de AEC-II, infectado ou não. A partir da extração de EV dos meios, foi feita a caracterização das vesículas por uma análise de rastreamento de nanopartículas e por microscopia eletrônica de transmissão (BITENCOURT et al., 2022). A partir da análise de rastreamento de nanopartículas, observamos que tanto as EV obtidas do sobrenadante de AEC-II infectadas quanto as EV secretadas por *M. tuberculosis* apresentaram pico de aproximadamente 50 a 180 nm (**Figura 6a e 6b**). Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão, foi capturada a imagem das EV, apontadas por uma seta amarela, do meio 7H9 e de ICM (**Figura 6c e 6d**).

Created in BioRender.com

- Meio 7H9
- Meio Condicionado

Centrifugação
Filtração
Ultracentrifugação

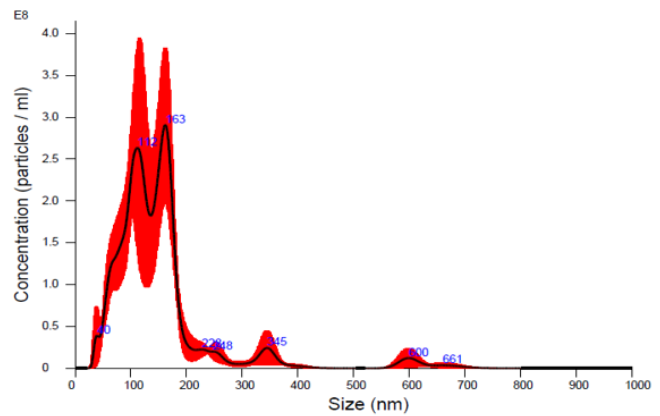
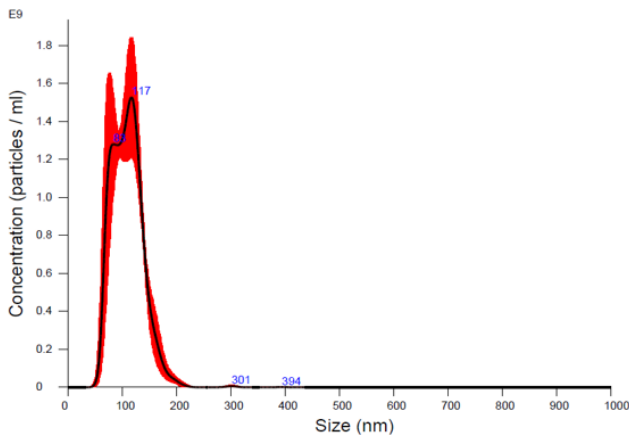
Vesículas
Extracelulares

Análise de
Rastreamento de
Nanopartículas

Microscopia
Eletrônica

a) Vesícula extracelular de *M. tuberculosis*

b) Vesícula extracelular de ICM



c) EV de *M. tuberculosis*

d) EV de ICM

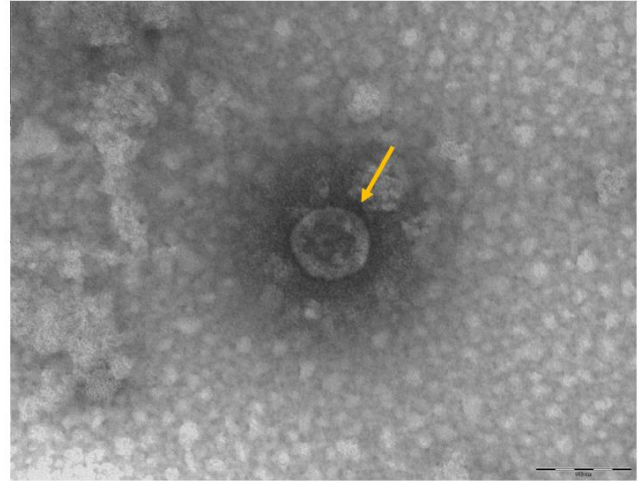
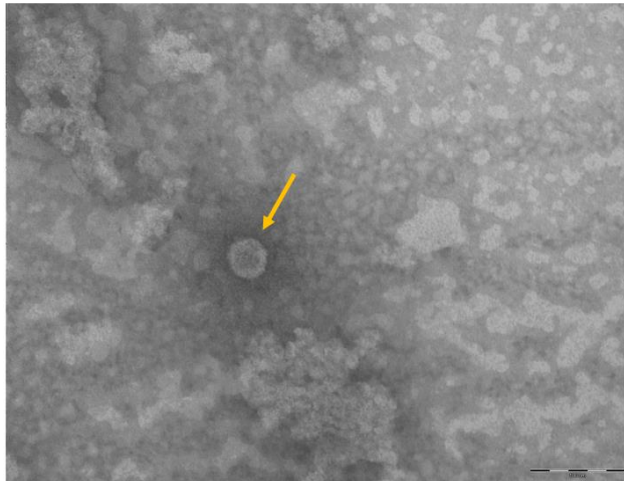


Figura 6: Caracterização das vesículas extracelulares purificadas de *M. tuberculosis* e das células MLE-15 infectadas por *M. tuberculosis*. (a) Caracterização de EV isoladas a partir do meio de crescimento 7H9 após 10 dias de cultura (filtrado a 0,22 μ m) e distribuídos de acordo com o tamanho. (b) Caracterização de EV isoladas a partir do meio condicionado infectado (ICM), filtrado a 0,22 μ m e distribuídos de acordo com o tamanho. (c) Figura representativa de microscopia eletrônica de EV presente em meio de crescimento 7H9, apontada pela seta amarela. (d) Figura representativa de microscopia eletrônica de EV presente em ICM, apontada pela seta amarela.

O estímulo das DC CD103+ com EV mostrou que as mesmas foram capazes de promover estimulação celular, caracterizada por aumento na expressão de CD86, CD80 e aumento na produção de IL-6. Foi observado que as EV extraídas de ICM foram capazes de promover aumento de CD86 e CD80, quando comparadas ao estímulo com EV de *M. tuberculosis* (**Figura 7a, 7b**). Todas as EV testadas regularam positivamente a expressão de CD86 e de CD80 (**Figura 7a, 7b**), mas não afetaram a expressão de MHC-II (**Figura 7c**). Esses resultados são observados na forma de histograma, onde as moléculas CD86, CD80 e MHC-II são representadas pelas **Figuras 7d, 7e e 7f**, respectivamente. As EV obtidas de AEC-II infectadas com *M. tuberculosis* (ICM EV) e as EV secretadas por *M. tuberculosis* (Mtb EV) estimularam uma produção significativamente maior de IL-6 quando comparadas com as EV obtidas de NICM (NICM EV) (**Figura 7g**).

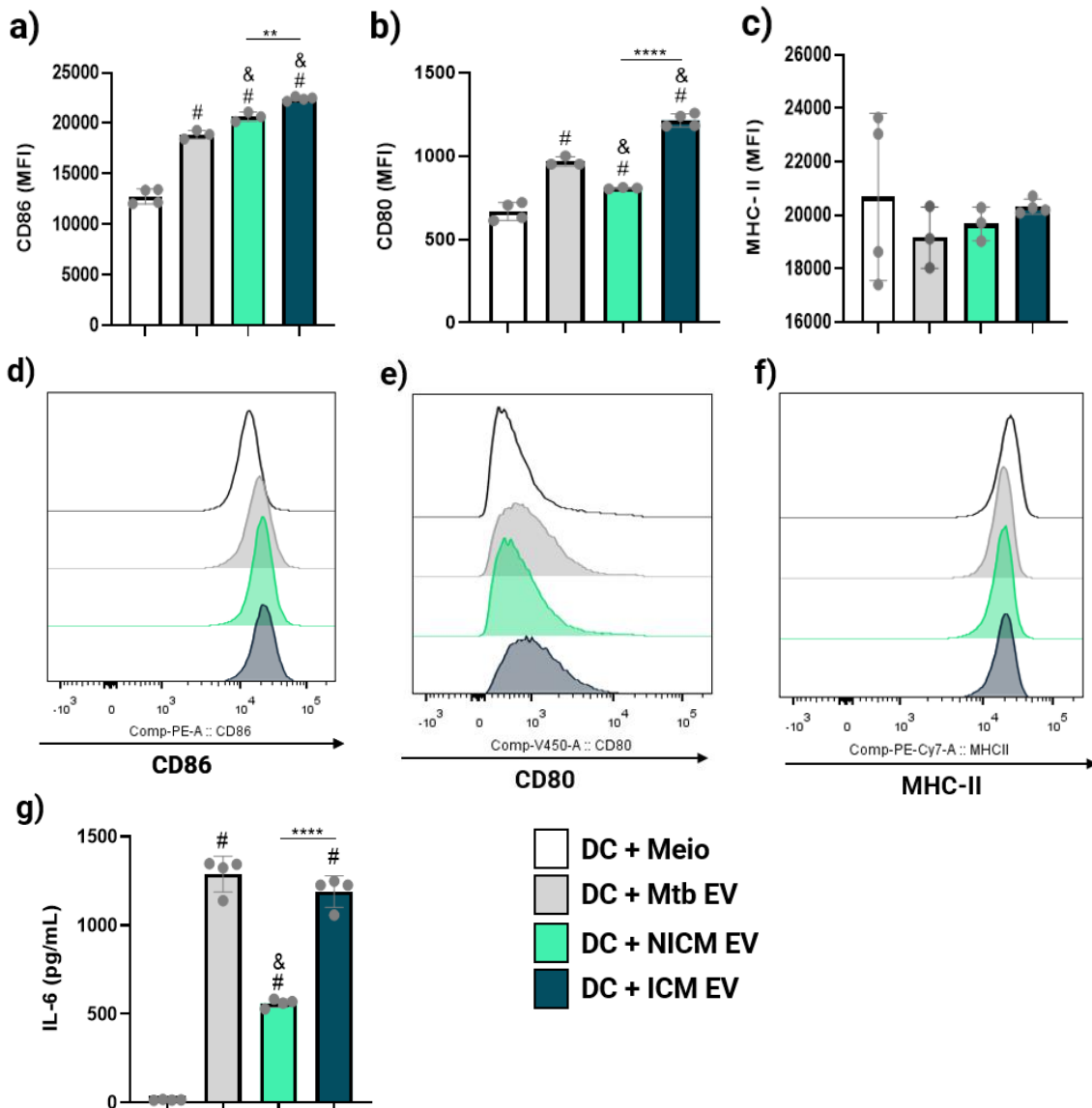
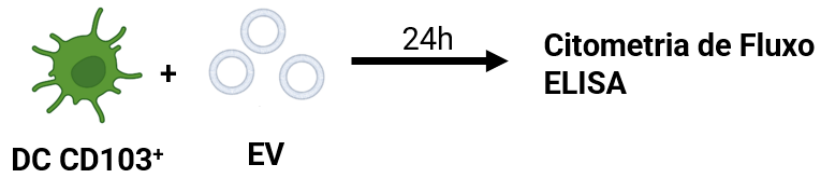


Figura 7: EV purificadas de ICM regularam positivamente a expressão de CD86 e de CD80 e aumentaram a secreção de IL-6. DC CD103⁺ foram estimuladas com EV de *M. tuberculosis*, ou EV de NICM ou EV de ICM, na uma concentração de 5×10^9 partículas/mL, por 24 horas. Os resultados de **d-f** estão ilustrados de cima para baixo: DC+meio; DC+Mtb+EV; DC+NICM EV; DC+ICM EV Os resultados **a-g** são de um experimento representativo realizado em triplicata, reproduzido 3 vezes independentemente. # P<0,05 comparado com o controle negativo; & P<0,05 comparado com o controle positivo; **** P<0,0001; *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05.

Em seguida, nós nos perguntamos se este cenário representado pela interface da AEC-II e da DC CD103+ afetaria a ativação de linfócitos T CD4⁺. Células T CD4⁺ purificadas dos baços de animais infectados com *M. tuberculosis* e co-cultivadas com DC CD103+ previamente tratadas com ICM (**Figura 8**) e estimuladas com peptídeos de *M. tuberculosis* proliferaram significativamente menos e secretaram menos IFN- γ , quando comparadas ao grupo de células T co-cultivadas com DC estimuladas apenas com peptídeos, não tratadas com ICM ou com NICM (**Figura 8b, 8f**). Como controle positivo, usamos linfócitos CD4⁺ estimulados com anticorpos contra CD3 e contra CD28, e mostramos a significativa proliferação celular, caracterizada pela perda ou redução da marcação para CFSE, e a significativa secreção de IFN- γ , comparada com as células CD4⁺ cultivadas em presença de meio de cultura, usadas como controle negativo, que apresentaram proliferação basal e baixíssima produção da citocina (**Figura 8a, e**).

Também avaliamos a porcentagem de células T CD4⁺ CD44⁺ específicas para o antígeno ESAT-6. Verificamos que o controle positivo aumentou a frequência de células CD4⁺ CD44⁺ comparadas ao controle negativo (**Figura 8c**). Enquanto o estímulo com peptídeos de ESAT-6 também elevou a frequência de células CD4⁺ CD44⁺, o tratamento com ICM não teve qualquer efeito (**Figura 8d**).

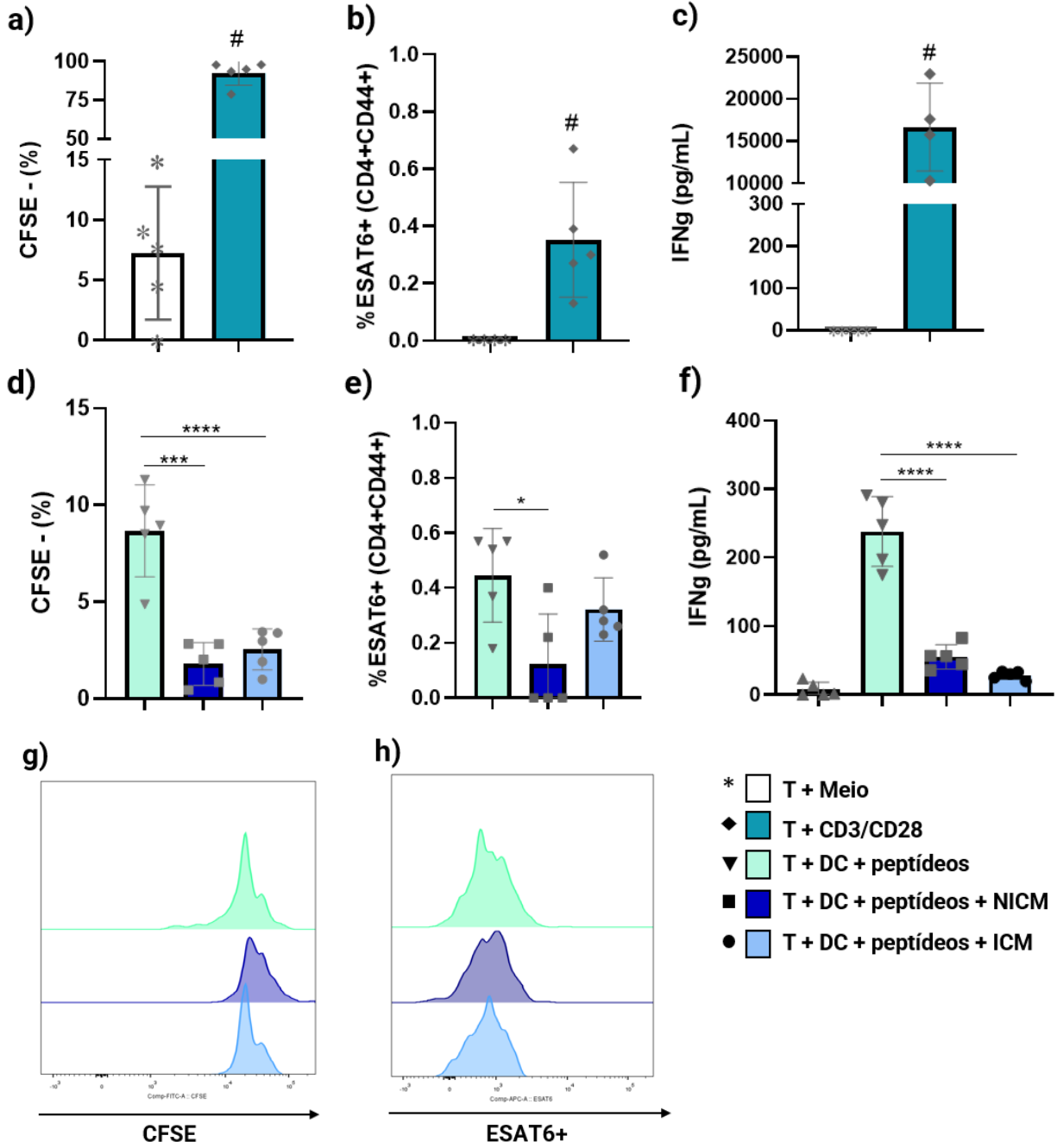
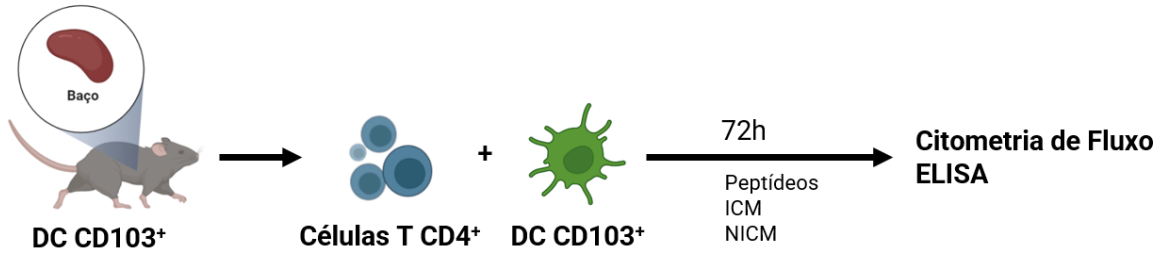
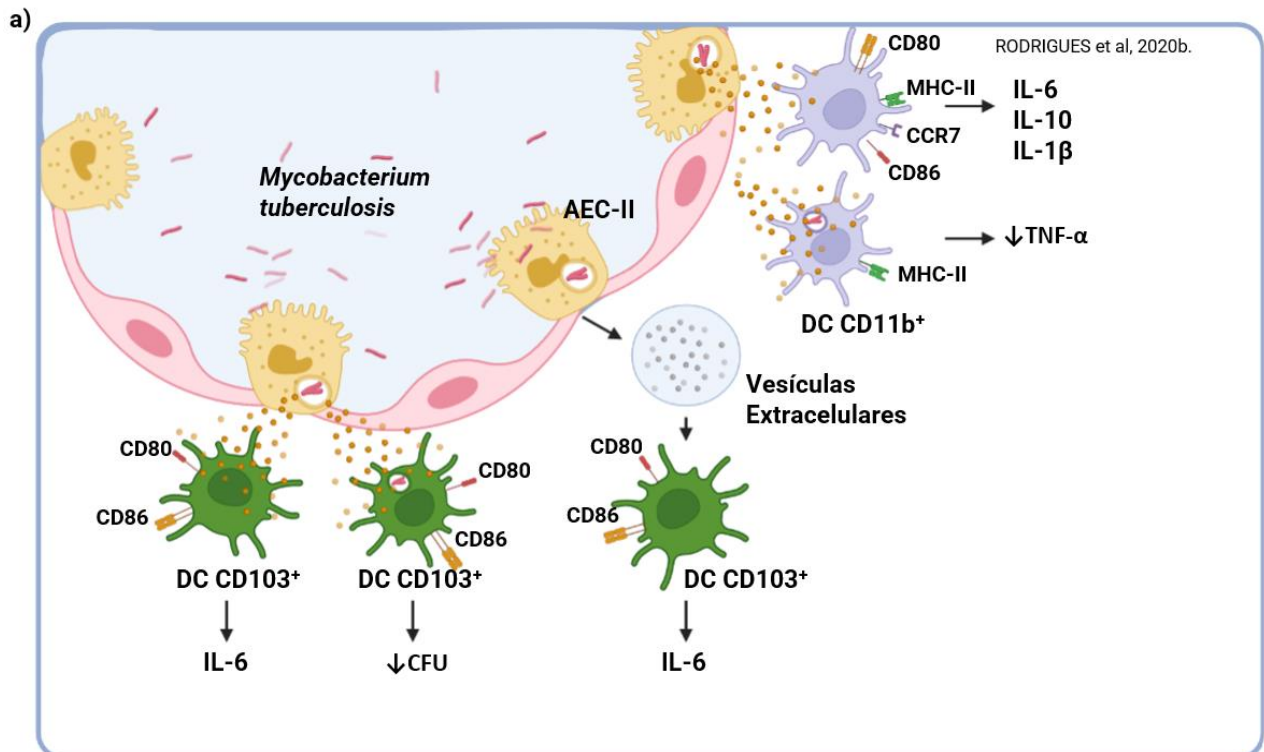


Figura 8: ICM e NICM regulam negativamente a proliferação e secreção de IFN- γ antígeno-específica por células CD4+. Linfócitos T CD4+ foram isolados dos baços de camundongos C57BL/6 infectados com 1000 CFU de *M. tuberculosis* após 28 dias de infecção. DC CD103+ foram previamente tratadas ou não com ICM ou NICM. Os linfócitos CD4+ foram co-cultivados com DC CD103+, tratadas ou não com ICM ou NICM, em presença de peptídeos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, EsxG e Ag85). Após 72 horas, as células foram avaliadas por citometria de fluxo e os sobrenadantes das culturas avaliados quanto à produção de IFN- γ . Como controle negativo, células T CD4+ foram cultivadas apenas em meio de cultura, e como controle positivo, células T CD4+ foram estimuladas com mAb contra CD3 e contra CD28. (g-d) de cima para baixo, os resultados estão representados como T+DC+peptídeos; T+DC+peptídeos+NICM e T+DC+peptídeos+ICM. Resultado de um experimento representativo reproduzido uma vez # P<0,05 comparado com o controle negativo; & P<0,05 comparado com o controle positivo; **** P<0,0001; *** P<0,001; * P<0,05.

Em seguida, a **Figura 9** representa o resumo dos resultados obtidos.



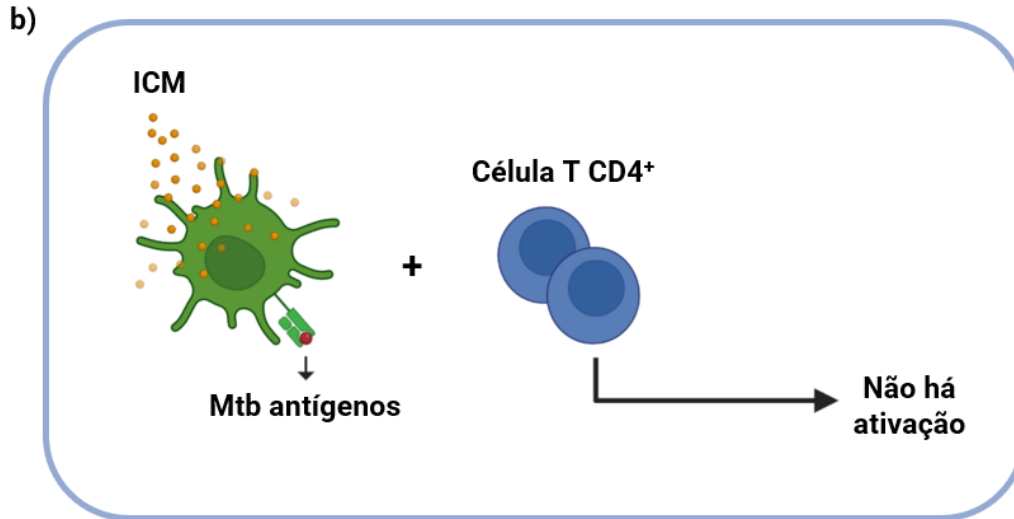


Figura 9: Resumo dos resultados: Em estudo anterior foi possível observar que DC CD11b⁺ estimuladas pelos produtos secretados pela AEC-II infectada por *M. tuberculosis*. **a)** O mesmo fenótipo foi observado em DC CD103⁺, com aumento das moléculas coestimuladoras CD86 e CD80. Mesmo após a infecção, a DC CD103⁺ estimulada por ICM mantém o fenótipo de ativação, o que não tinha sido observado em DC CD11b⁺. Outros produtos liberados pela AEC-II infectada são avaliados e é observado que vesículas extracelulares presentes no ICM também são capazes de promover a ativação observada somente com ICM. **b)** Acreditando que o fenótipo ativado seria capaz de induzir a ativação de células T CD4⁺ maduras isoladas do baço de um animal infectado, as DC CD103⁺ ativadas por ICM não induziram uma resposta esperada em células T CD4⁺ com a apresentação de antígenos específicos de *M. tuberculosis*.

6. DISCUSSÃO

O microambiente alveolar é o principal microambiente para a disseminação de *M. tuberculosis*. Com isso, interações das células presentes nesse microambiente podem ser determinantes para o desfecho da infecção, contribuindo ou não para a progressão da tuberculose. Dentre as células que compõem o alvéolo, as AEC-II infectadas interagem e ativam DC CD11b⁺, que apresentaram regulação positiva na expressão de MHC-II, CCR7, CD80 e CD86, além de secretarem IL-1 β , IL-6 e IL-10, como já descrito por nosso grupo (RODRIGUES et al., 2020b). Em adição, as DC CD11b⁺ tratadas com ICM aumentaram a proliferação de células T CD4⁺ *naive* estimuladas com anticorpo monoclonal (mAb) contra CD3 quando comparadas com as células CD4⁺ estimuladas com mAb contra CD3, porém não tratadas com ICM (RODRIGUES et al., 2020b). No presente trabalho, mostramos que AEC-II infectadas também afetam a maturação e a ativação de DC CD103⁺, e isso ainda não havia sido investigado no contexto da tuberculose.

As DC CD103⁺ representam uma subpopulação pequena, de 0,7-1,6% do total de células dos pulmões (SUNG et al., 2006), enquanto as DC CD11b⁺ estão em maior quantidade (SÉRGIO et al., 2015) Embora nós tenhamos usado um protocolo de purificação de DC CD103⁺ baseado no estudo prévio de MAYER e colaboradores (MAYER et al., 2014), não obtivemos uma população completamente pura de células CD103⁺, mas bastante enriquecido. A maior parte da população diferenciada era CD103⁺, porém, encontramos também uma população celular CD11c⁺, MHC-II⁺ e CD11b⁺.

As DC CD103⁺ foram ativadas por fatores secretados pelas AEC-II infectadas, e pode-se inferir que apresentaram maturação parcial, caracterizada por aumento na expressão de CD86 e de CD80, mas não de MHC-II. No entanto, a estimulação com LPS também não regulou positivamente a expressão de MHC-II nas DC CD103⁺, embora tenha resultado em aumento de CD86 e de CD80 também comparado com o controle negativo (meio de cultura). Interessante foi a

necessidade de se usar elevada concentração de LPS para estimular essa população de DC CD103+, comparativamente com a concentração usada para estimular DC CD11b+, e ainda assim, o LPS foi incapaz de regular positivamente a expressão do MHC. Com estes resultados, consideramos que a maturação das DC CD103+ foi parcial em presença do meio condicionado oriundo de AEC-II infectadas com *M. tuberculosis*. Este resultado confirma que estamos trabalhando com a população DC CD103+ majoritariamente porque, anteriormente, ao estimular as DC CD11b+, que foram geradas apenas com GM-CSF, encontramos que o meio condicionado oriundo de AEC-II infectadas com *M. tuberculosis* causou a maturação completa dessas células, inclusive com aumento de MHC-II (RODRIGUES et al., 2020b).

As DC CD103+ tratadas com ICM secretaram IL-6 e baixíssimas concentrações de IL-10. Além da presença de IL-6 contribuir para a indução da resposta inflamatória, esta citocina poderia contribuir também para o desenvolvimento de uma resposta de perfil Th1, juntamente com a IL-12 (COOPER; MAYER-BARBER; SHER, 2011; LEAL et al., 1999). Haveria possibilidade da IL-6 ter sido secretada pela população minoritária de DC CD11b+ presente na cultura. Porém, nosso grupo já mostrou em um estudo publicado anteriormente que as células CD103+ purificadas dos pulmões de animais infectados foram mais eficientes em estimular a resposta Th1 e Th17 (SÉRGIO et al., 2015).

Diversos eventos podem ocorrer de forma simultânea durante a infecção no microambiente alveolar. Dentre as diversas possibilidades, existem duas principais relacionadas ao nosso estudo: um cenário, no qual as DC CD103+ são infectadas antes de entrar em contato com o meio condicionado e a segunda situação, na qual as DC CD103+ já tiveram contato com o microambiente decorrente da infecção das AEC-II e foram, posteriormente, infectadas pelos bacilos.

No primeiro cenário, apontamos que as DC CD103+ infectadas quando expostas ao ICM apresentaram maturação superior à da DC apenas infectada.

Resultados semelhantes foram observados em um estudo feito por Demangel e colaboradores, no qual DC infectadas por BCG e estimuladas por ligante de CD40 apresentaram maior produção de IL-12 do que as células apenas infectadas (DEMANGEL et al., 2001). Além disso, está bem documentado que durante a infecção por *M. tuberculosis*, o pico de migração de DC CD11c⁺ ocorre mais tardiamente dos pulmões para os linfonodos, e que os bacilos atrasam a migração de DC dos pulmões para os linfonodos, retardando a indução da imunidade adaptativa. Se considerarmos a interface intercelular, como no presente estudo, e levarmos em conta a quantidade de bacilos infectantes e qual célula será primeiramente infectada, podemos sugerir que a infecção de DC CD103⁺ em presença do microambiente com fatores secretados pelas AEC-II infectadas, ou seja uma dupla estimulação (infecção + fatores secretados pela AEC-II), contribui para conter a replicação de bacilos intracelulares. Um estudo antigo já havia descrito que BMDC previamente ativadas com IFN- γ ou LPS e, posteriormente, infectadas apresentaram diminuição na proliferação bacteriana, principalmente relacionada à produção de NO por essas células (BODNAR; SERBINA; FLYNN, 2001). Previamente, nosso grupo mostrou que o ICM contém nitrito (NO₂), IFN- γ , IL-6 e S100A9 (RODRIGUES et al., 2020b), que poderiam ter contribuído para o efeito observado.

Já no segundo cenário, onde haveria a estimulação prévia das DC CD103⁺ em decorrência da presença do microambiente com fatores das AEC-II infectadas, seguida da infecção com *M. tuberculosis*, surpreendentemente, não encontramos maior capacidade das DC CD103⁺ em controlar a proliferação intracelular. Certamente, fatores solúveis que ainda desconhecemos, estão presentes no microambiente decorrente da secreção de produtos como consequência da infecção das AEC-II por *M. tuberculosis*.

Apesar da presença de NO no ICM, não detectamos a produção de NO por DC CD103⁺ em ambos os cenários, sugerindo que não seria NO o fator microbicida das DC CD103⁺. Fato interessante também a ser destacado é que as BMDC CD103⁺

mantiveram o fenótipo (aumento de CD86 e de CD80) independente da infecção acontecer antes ou depois do tratamento com ICM, enquanto, diferentemente, as BMDC CD11b+ foram negativamente moduladas pela infecção e expressaram mais iNOS (NOS2) quando comparadas com a expressão avaliada apenas nas células tratadas com ICM.

Além da produção de mediadores solúveis, como citocinas e quimiocinas, as vesículas extracelulares apresentam-se como uma outra forma de comunicação e interação celular. Obtivemos EV tanto das células epiteliais infectadas quanto das não infectadas, também da micobactéria. A partir do estímulo com as vesículas contidas no ICM, confirmamos o fenótipo previamente caracterizado pela estimulação das DC CD103+ com ICM.

As EV de *M. tuberculosis* apresentam capacidade de ativar BMDC CD11c+ CD11b+, que adquirem então maior capacidade de ativar células T CD4+ (JURKOSHEK et al., 2016). Em macrófagos, as EV de *M. tuberculosis* induziram maior resposta inflamatória com aumento de TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL1 e CCL3 (PRADOS-ROSALES et al., 2011). Ainda não existem relatos de EV secretadas por AEC-II infectadas por *M. tuberculosis*. Porém, resultados a partir de infecções com *Streptococcus pneumoniae* mostram que EV secretadas por AEC-II infectadas por *S. pneumoniae* impediram a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (LETSIU et al., 2021). Este resultado atribui às EV oriundas de AEC-II infectadas com *S. pneumoniae* um papel negativo na resposta imune protetora.

As vesículas de *M. tuberculosis* são capazes de promover a imunomodulação por meio do conteúdo que elas carregam. As vesículas de *M. tuberculosis* apresentam lipoproteínas, como LprA, 19 kDa e LprG, ligantes de TLR2 (PRADOS-ROSALES et al., 2011). Outro conteúdo presente nessas vesículas é o RNA, como o RNA mensageiro e o micro RNA, que são capazes de modular o transcriptoma da célula alvo (LETSIU et al., 2021; SINGH; LI; SCHOREY, 2015).

Apesar de observamos ativação de DC CD103+ por EV produzidas pela micobactéria, em experimentos *in vivo* é apontado que a administração dessas vesículas em animais infectados promove uma inflamação granulomatosa desregulada que favorece a proliferação da bactéria (PRADOS-ROSALES et al., 2011). Com isso, podemos afirmar que em princípio, as vesículas tanto de micobactéria quanto de AEC-II infectada favorecem uma resposta inflamatória da DC CD103+. Porém, é necessário investigar seus efeitos *in vivo*.

A partir do experimento de co-cultura, foi observado que a DC CD103+ estimuladas por ICM não foram capazes de induzir a ativação de células T CD4+, avaliada a partir da expressão de CD44 e da produção de IFN- γ . Este resultado contribui para confirmar que ICM causa maturação parcial das DC CD103+, regulando positivamente CD86 e CD80, mas não MHC-II, e isso, provavelmente, reflete na capacidade proliferativa, de ativação e de diferenciação das células T CD4+. Já foi descrito observado que *M. tuberculosis* se utiliza da inibição na expressão de MHC-II por via dependente da sinalização de TLR2 e, assim, impede a apresentação de antígenos (HARDING; BOOM, 2010).

Em estudos anteriores, DC CD103+ isoladas dos linfonodos de animais co-cultivadas com células T CD4+ específicas também estimularam menor produção de IFN- γ . Porém, em nossos experimentos as DC CD103+ secretaram concentrações diminutas de IL-10, que é uma das citocinas que poderia atuar na modulação negativa da ativação das células T (LAI et al., 2018). Dessa forma permanece a ser esclarecido se simplesmente a modulação negativa na expressão de MHC-II ou se outros fatores presentes no ICM participam da regulação negativa na proliferação e na diferenciação de linfócitos T CD4+.

7. CONCLUSÃO

AEC-II infectadas com *M. tuberculosis* secretam vesículas extracelulares que ativam parcialmente DC CD103+, regulando positivamente a expressão de CD86 e CD80, mas não MHC-II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. et al. **Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives.** *The Lancet Infectious Diseases* Lancet Publishing Group, , 1 mar. 2018.

AGRAWAL, S. et al. Airway epithelial cells enhance the immunogenicity of human myeloid dendritic cells under steady state. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 189, n. 3, p. 279–289, 1 set. 2017.

AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. **Innate immunity in tuberculosis: How the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death.** *Microbes and Infection* Elsevier Masson SAS, , 1 jan. 2016.

ATHMAN, J. J. et al. Mycobacterium tuberculosis Membrane Vesicles Inhibit T Cell Activation . **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 5, p. 2028–2037, 2017.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715–1724, 2005.

BEHAR, S. M. et al. **Lipids, apoptosis, and cross-presentation: Links in the chain of host defense against Mycobacterium tuberculosis.** *Microbes and Infection*, ago. 2011.

BELL, L. C. K.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and mycobacterium tuberculosis co-infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 2018.

BITENCOURT, T. A. et al. **Fungal Extracellular Vesicles Are Involved in Intraspecies Intracellular Communication.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/mbio>>.

BODNAR, K. A.; SERBINA, N. V.; FLYNN, J. L. Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 800–809, 2001.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. **Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.immunologicalreviews.com>.

BROWN, L. et al. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.

CHENG, Y.; SCHOREY, J. S. Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 12, p. 3279–3290, 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.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. **Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annual review of cell and developmental biology**, 2014.

COOK, P. C.; MACDONALD, A. S. Dendritic cells in lung immunopathology. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 4, p. 449–460, 2016.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 252–260, 2011.

CRONAN, M. R. et al. Macrophage Epithelial Reprogramming Underlies *Mycobacterial* Granuloma Formation and Promotes Infection. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 861–876, 18 out. 2016.

DALLENGA, T. et al. *M. tuberculosis*-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. **Cell Host and Microbe**, v. 22, n. 4, p. 519- 530.e3, 11 out. 2017.

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, set. 2003.

DE WAAL, A. M. et al. Lung epithelial cells interact with immune cells and bacteria to shape the microenvironment in tuberculosis. **Thorax**, p. thoraxjnl-2021-217997, 11 jan. 2022.

DEL RIO, M.-L. et al. CD103 – and CD103 + Bronchial Lymph Node Dendritic Cells Are Specialized in Presenting and Cross-Presenting Innocuous Antigen to CD4 + and CD8 + T Cells . **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 6861–6866, 2007.

DEMANGEL, C. et al. Stimulation of dendritic cells via CD40 enhances immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2456–2461, 2001.

DESAI, P. et al. Batf3-Dependent Dendritic Cells Promote Optimal CD8 T Cell Responses against Respiratory Poxvirus Infection. **Journal of Virology**, v. 92, n. 16, 15 ago. 2018.

DESCH, A. N. et al. CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 9, p. 1789–1797, 2011.

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.

DOMINGO-GONZALEZ, R. et al. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection . **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 14 out. 2016.

DORHOI, A. et al. The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 777–792, 12 abr. 2010.

DUBÉ, J. Y. et al. **Underwhelming or Misunderstood? Genetic Variability of Pattern Recognition Receptors in Immune Responses and Resistance to Mycobacterium tuberculosis.** **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 30 jun. 2021.

EISENBARTH, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 2, p. 89–103, 1 fev. 2019.

ELKINGTON, P. et al. **Understanding the tuberculosis granuloma: the matrix revolutions.** **Trends in Molecular Medicine**Elsevier Ltd, , 1 fev. 2022.

ELKINGTON, P. T. G. et al. Mycobacterium tuberculosis Up-Regulates Matrix Metalloproteinase-1 Secretion from Human Airway Epithelial Cells via a p38 MAPK Switch . **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 8, p. 5333–5340, 15 out. 2005.

FURUHASHI, K. et al. Mouse Lung CD103 + and CD11b high Dendritic Cells Preferentially Induce Distinct CD4 + T-Cell Responses. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 46, n. 2, p. 165–172, fev. 2012.

GANDOTRA, S. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 11, p. 5127–5134, nov. 2007.

GARLANDA, C. et al. Damping Excessive Inflammation and Tissue Damage in Mycobacterium tuberculosis Infection by Toll IL-1 Receptor 8/Single Ig IL-1-Related Receptor, a Negative Regulator of IL-1/TLR Signaling . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3119–3125, 1 set. 2007.

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

GEURTSVANKESSEL, C.; LAMBRECHT, B. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. 2008.

GIDEON, H. P. et al. Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of Pro-and Anti-inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization. 2015.

GINHOUX, F. et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 3115–3130, 2009.

HARDING, C. V.; BOOM, W. H. **Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: A role for Toll-like receptors. Nature Reviews Microbiology**, abr. 2010.

HERSHKOVITZ, I. et al. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. **Tuberculosis**, v. 95, n. S1, p. S122–S126, 2015.

JAKUBZICK, C. et al. Blood Monocyte Subsets Differentially Give Rise to CD103 + and CD103 – Pulmonary Dendritic Cell Populations . **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 3019–3027, 2008.

JASENOSKY, L. D. et al. **T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.immunologicalreviews.com>.

JIAO, X. et al. Dendritic Cells Are Host Cells for Mycobacteria In Vivo That Trigger Innate and Acquired Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, 2002.

JOHNSTON, S. L. et al. Airway Epithelial Innate Immunity. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 26 nov. 2021.

JURKOSHEK, K. S. et al. Interspecies communication between pathogens and immune cells via bacterial membrane vesicles. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. NOV, p. 1–8, 2016.

KOH, V. H. Q. et al. Role and contribution of pulmonary CD103+ dendritic cells in the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 102, p. 34–46, 2017.

LAI, R. et al. CD11b + Dendritic Cell–Mediated Anti– Mycobacterium tuberculosis Th1 Activation Is Counterregulated by CD103 + Dendritic Cells via IL-10 . **The Journal of Immunology**, p. j1701109, 26 jan. 2018.

LEAL, I. S. et al. Interleukin-6 and Interleukin-12 Participate in Induction of a Type 1 Protective T-Cell Response during Vaccination with a Tuberculosis Subunit Vaccine. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5747–5754, nov. 1999.

LEAL, I. S. et al. Interleukin-6 regulates the phenotype of the immune response to a tuberculosis subunit vaccine. **Immunology**, v. 103, n. 3, p. 375–381, 2001.

LETSIOU, E. et al. Microvesicles released from pneumolysin-stimulated lung epithelial cells carry mitochondrial cargo and suppress neutrophil oxidative burst. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021.

LI, Y.; WANG, Y.; LIU, X. **The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. The End of the Binary Era: Revisiting the Spectrum of Tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 9, p. 2541–2548, 2018.

LIN, Y.; ZHANG, M.; BARNES, P. F. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1121–1126, 1998.

MA, C. et al. Mycobacterium bovis BCG triggered MyD88 induces miR-124 feedback negatively regulates immune response in alveolar epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 4 abr. 2014.

MADAN-LALA, R. et al. Mycobacterium tuberculosis Impairs Dendritic Cell Functions through the Serine Hydrolase Hip1 . **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 9, 2014.

MARTIN, C. J. et al. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 3, p. 289–300, 13 set. 2012.

MASON, R. J. **Biology of alveolar type II cells**. Respirology. **Anais...**2006.

MAYER, C. T. et al. Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD1031 dendritic cells from mouse bone marrow. **Blood**, v. 124, n. 20, p. 3081–3091, 2014.

NANDI, B.; BEHAR, S. M. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 11, p. 2251–2262, 24 out. 2011.

NERLICH, A. et al. Pneumolysin induced mitochondrial dysfunction leads to release of mitochondrial DNA. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

O’GARRA, A. et al. The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 475–527, 2013.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The Formation and Function of Granulomas. v. 23, n. 1, 2018.

PAI, M. et al. **Tuberculosis. Nature Reviews Disease Primers**, 2016.

PALACIOS, A. et al. Extracellular vesicles in the context of Mycobacterium tuberculosis infection. **Molecular Immunology**, v. 133, n. March, p. 175–181, 2021.

PRADOS-ROSALES, R. et al. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 4, p. 1471–1483, 2011.

RAHMATPANA, F. et al. Airway epithelial cells prime plasmacytoid dendritic cells to respond to pathogens via secretion of growth factors. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 1, p. 77–84, 1 jan. 2019.

REILING, N. et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection with Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3480–3484, 1 out. 2002.

ROCA, F. J.; RAMAKRISHNAN, L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 521–534, 25 abr. 2013.

RODRIGUES, S. T. et al. **Interplay between alveolar epithelial and dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis. Journal of Leukocyte Biology** John Wiley and Sons Inc., 1 out. 2020a.

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, 1 out. 2020b.

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.

SAKULA, A. Robert Koch: Centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax**, v. 37, n. 4, p. 246–251, 1982.

SASINDRAN, S. J.; TORRELLES, J. B. Mycobacterium tuberculosis infection and inflammation : what is beneficial for the host and for the bacterium ? v. 2, n. January, p. 1–16, 2011.

SCANGA, C. A. et al. MyD88-Deficient Mice Display A Profound Loss in Resistance to Mycobacterium tuberculosis Associated with Partially Impaired Th1 Cytokine and Nitric Oxide Synthase 2 Expression. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2400–2404, abr. 2004.

SCHLITZER, A. et al. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. **Nature Immunology**, v. 16, n. 7, p. 718–728, 2015.

SCORDO, J. M. et al. The human lung mucosa drives differential Mycobacterium tuberculosis infection outcome in the alveolar epithelium. **Mucosal Immunology**, n. August 2018, 2019.

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

SÉRGIO, C. A. et al. CD11c+ CD103+ cells of Mycobacterium tuberculosis-infected C57BL/6 but not of BALB/c mice induce a high frequency of interferon- γ - or interleukin-17-producing CD4+ cells. **Immunology**, v. 144, n. 4, p. 574–586, 2015.

SHALER, C. R. et al. Within the enemy's camp: Contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. FRB, p. 1–8, 2013.

SHEKHAR, S. et al. CD103+ lung dendritic cells (LDCs) induce stronger Th1/Th17 immunity to a bacterial lung infection than CD11bhi LDCs. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 4, p. 377–387, 2018.

SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections . **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, 16 ago. 2019.

SINGH, P. P.; LI, L.; SCHOREY, J. S. Exosomal RNA from Mycobacterium tuberculosis-Infected Cells Is Functional in Recipient Macrophages. **Traffic**, v. 16, n. 6, p. 555–571, 1 jun. 2015.

SONNENBERG, P. et al. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 2, p. 150–158, 2005.

SRIVASTAVA, S.; ERNST, J. D. Cell-to-cell transfer of M. tuberculosis antigens optimizes CD4 T cell priming. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 6, p. 741–752, 2014.

STANDIFORD, T. J. et al. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9912–9918, 1991.

SUNG, S.-S. J. et al. A Major Lung CD103 (α E)- β 7 Integrin-Positive Epithelial Dendritic Cell Population Expressing Langerin and Tight Junction Proteins . **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 4, p. 2161–2172, 2006.

TEZERA, L. B.; MANSOUR, S.; ELKINGTON, P. Reconsidering the Optimal Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 201, n. 4, p. 407–413, 2020.

THORLEY, A. J. et al. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human Lung - Role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

TKACH, M.; THÉRY, C. **Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go**. CellPress, , 10 mar. 2016.

TOYOFUKU, M.; NOMURA, N.; EBERL, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 13–24, 1 jan. 2019.

UNKEL, B. et al. Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3652–3664, 1 out. 2012.

VAN KOOYK, Y.; APPELMELK, B.; GEIJTENBEEK, T. B. H. A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 153–159, 2003.

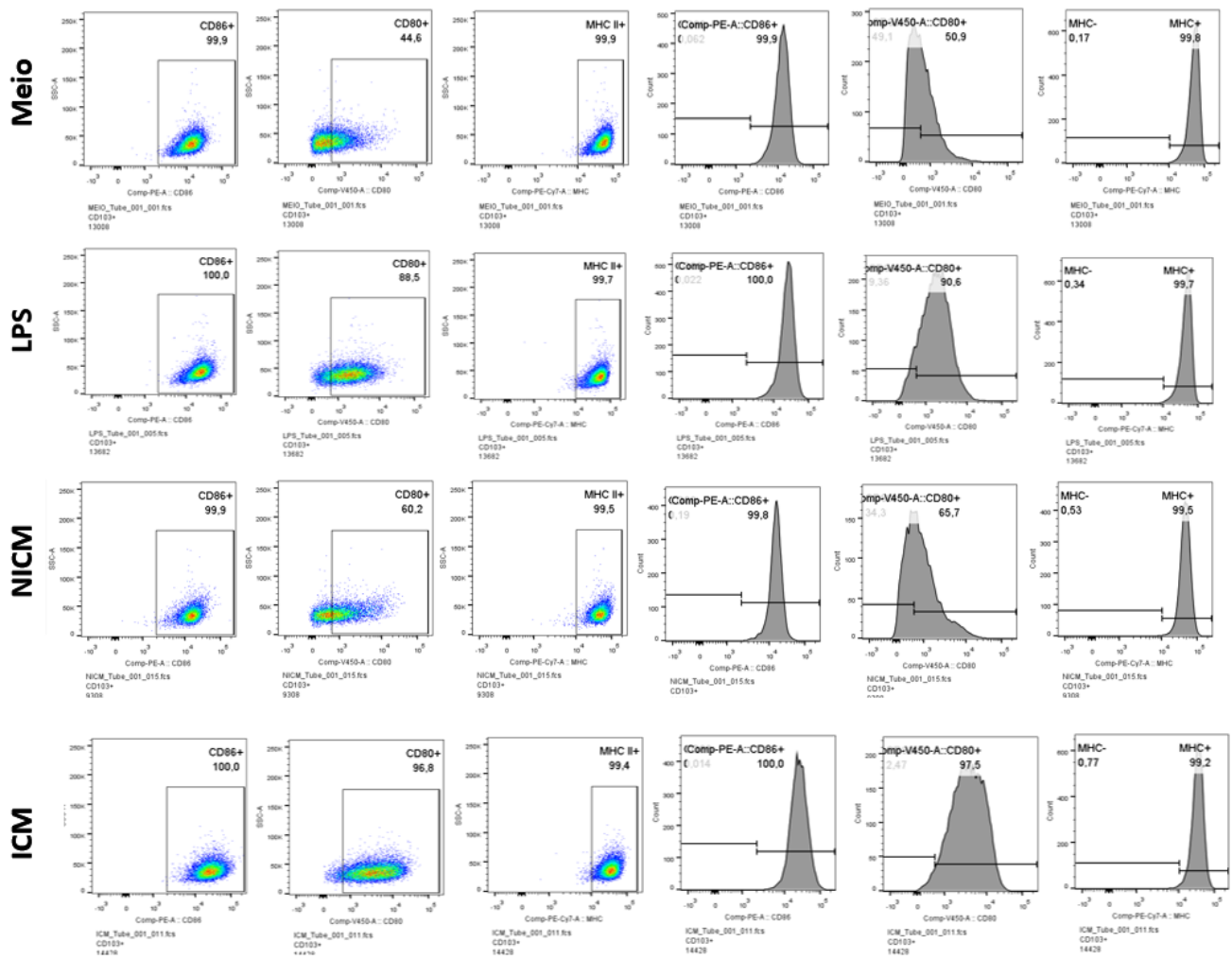
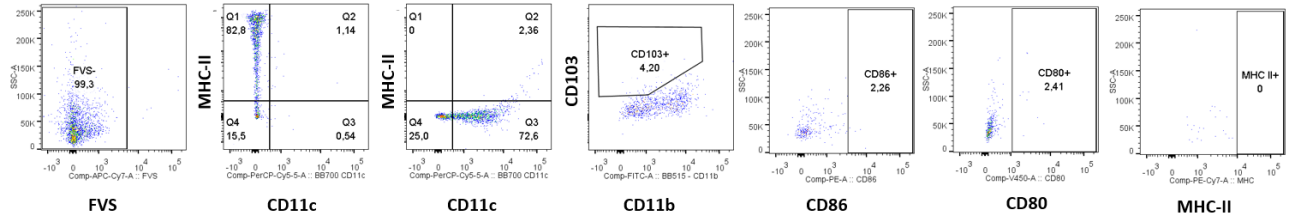
VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. H. **DC-SIGN: Escape mechanism for pathogens**. **Nature Reviews Immunology**, set. 2003.

WILLMS, E. et al. **Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 30 abr. 2018.

WOLF, A. J. et al. Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2509–2519, 2007.

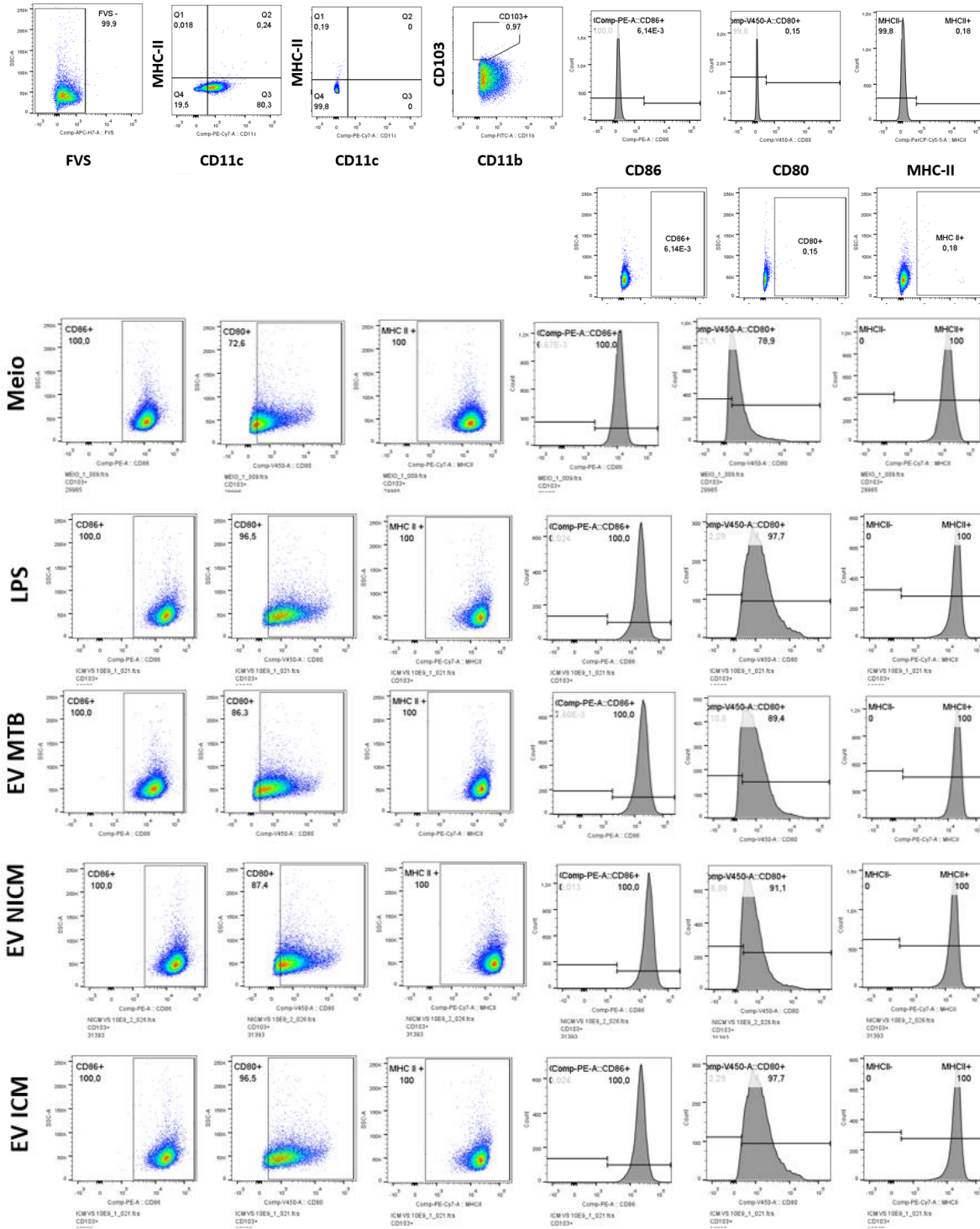
APÊNDICE I -ESTATÉGIA DE GATE, FMO E REPRESENTATIVOS DE DC E MEIO CONDICIONADO

FMO



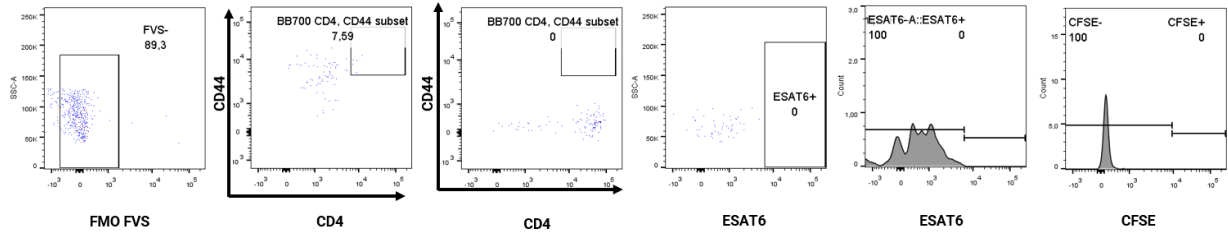
APÊNDICE II -ESTATÉGIA DE GATE, FMO E REPRESENTATIVOS DA CO-CULTURA DE DC E CÉLULAS T CD4

FMO

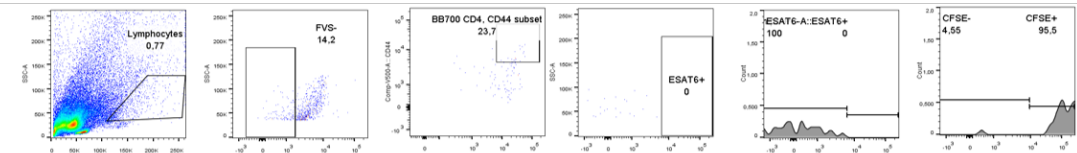


APÊNDICE III - ESTATÉGIA DE GATE, FMO E REPRESENTATIVOS DA CO-CULTURA DE DC E CÉLULAS T CD4

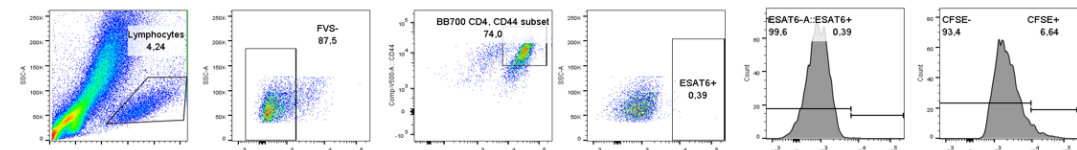
FMO



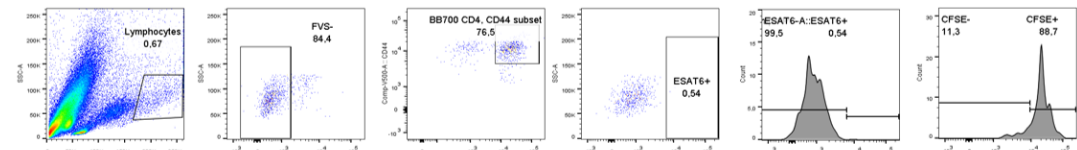
MEIO



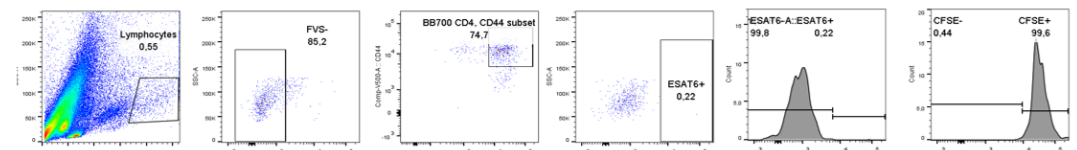
CD3/28



T+DC+pep



T+DC+pep +NICM



T+DC+pep +ICM

