

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARINA BONIFÁCIO DENADAI

**Caracterização de um modelo animal para o estudo do papel da ferroportina
em leucócitos mieloides durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis***

Ribeirão Preto
2023

MARINA BONIFÁCIO DENADAI

Caracterização de um modelo animal para o estudo do papel da ferroportina em leucócitos mieloides durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Diego Luís Costa

Ribeirão Preto
2023

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.

Catálogo na publicação
Biblioteca
Faculdade de Medicina

DENADAI, Marina Bonifácio

Caracterização de um modelo animal para o estudo do papel da ferroportina em leucócitos mielóides durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.
Ribeirão Preto, 2023.

84 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Diego Luís Costa.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Ferroportina. 3. Ferro. 4. Terapia direcionada ao hospedeiro.

Nome: DENADAI, Marina Bonifácio

Título: Caracterização de um modelo animal para o estudo do papel da ferroportina em leucócitos mielóides durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Diego Luís Costa pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos durante todo o período de elaboração deste trabalho e durante anos que passei sob sua orientação.

Aos professores Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato e Dr. Dario Simões Zamboni e suas equipes da Universidade de São Paulo – USP agradeço pela colaboração neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação de Imunologia Básica e Aplicada e aos professores que foram essenciais em meu processo de formação.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório André e Gabriele. Sou extremamente grata por todo apoio e amizade durante este período.

Sou extremamente grata às minhas amigas de graduação Julia Stein, Gousilin Silva e Larissa Nunes que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram durante essa trajetória na universidade.

Agradeço também aos demais colegas que conheci durante o período pelo companheirismo, amizade e experiências que me fizeram crescer não só como profissional, mas também como pessoa.

Por fim, agradeço à minha família e em especial ao meus pais Roseclair e Romolo pelo apoio e por sempre acreditarem no meu potencial desde o início.

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

Este trabalho também foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº de processo: 2021/04028-3. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do (s) autor (es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Resumo

Denadai, M. B. Caracterização de um modelo animal para o estudo do papel da ferroportina em leucócitos mielóides durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. 2023. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023).

A ausência de uma vacina eficaz e de uma terapia que elimine rapidamente o agente patogênico do organismo hospedeiro, contribuem para que a tuberculose (TB) seja a doença infecciosa que mais mata no mundo. Novas linhas de tratamento propostas na literatura sugerem utilizar processos biológicos do hospedeiro que favoreçam a replicação das bactérias como alvos de estratégias terapêuticas para se atingir a cura da doença de maneira mais rápida e eficaz. Especificamente, o metabolismo de ferro em células infectadas tem se mostrado um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias direcionadas ao hospedeiro. A regulação dos níveis de ferro intracelular em macrófagos, principal célula infectada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), ocorre principalmente pela ação conjunta da enzima de heme oxigenase-1 (HO-1) e do transportador ferroportina (FPN). Enquanto a metabolização de heme por HO-1 resulta em liberação de ferro no citoplasma, a FPN age como transportador de íons de ferro para o espaço extracelular. Sendo assim a diminuição de sua expressão na membrana de células infectadas pode ter contribuição direta no aumento da concentração intracelular de ferro das mesmas, o que pode impactar o controle da replicação bacteriana. Com isso, nosso objetivo foi investigar o papel de FPN durante a infecção por Mtb e desenvolver um modelo animal geneticamente deficiente em FPN em macrófagos para este estudo. Nossos resultados mostram que a infecção por Mtb em macrófagos derivados de medula óssea (*bone marrow-derived macrophages* - BMDM), suplementados com ferro induziu aumento significativo da expressão de FPN em comparação ao grupo não tratado. Observamos que a infecção com Mtb in vivo induz alteração na expressão relativa de marcadores importantes para a regulação de ferro nos pulmões de camundongos C57BL/6, como HO-1, SPIC, ferritina (FTH) e hepcidina (HAMP). De forma ainda mais importante, identificamos que em pulmões de animais infectados com Mtb houve aumento significativo na expressão de FPN em macrófagos alveolares (MA) e, principalmente, em macrófagos parenquimais derivados de monócitos (MP) infectados em comparação às mesmas populações de

células não infectadas, na quarta semana pós-infecção (4 spi). Desta forma, desenvolvemos um modelo animal deficiente geneticamente para FPN em MA e MP (FPN^{fl/fl} LyzMCre⁺), de forma a investigar o papel deste transportador na contenção da replicação bacteriana. Observamos que BMDM deficientes em FPN se mostraram mais suscetíveis à infecção por Mtb *in vitro* quando comparados a células do tipo selvagem (wild-type-WT), apresentando maior carga bacteriana e morte celular, especialmente na presença de suplementação com ferro. Porém, este cenário não foi reproduzido *in vivo*, de forma que os camundongos FPN^{fl/fl} LyzMCre⁺ infectados com uma alta dose de Mtb apresentaram carga bacteriana pulmonar similar àquela observada em animais WT; juntamente com menor morte celular de leucócitos pulmonares. Concomitante com estes resultados, observamos um aumento significativo na produção de iNOS em MP totais e infectados. Em conjunto, nossos resultados indicam que a ausência de FPN resulta em maior suscetibilidade à replicação bacteriana em macrófagos *in vitro*, embora, *in vivo*, nos pulmões, a ausência de FPN não tenha interferido com a resistência à replicação bacteriana. Entretanto, ainda se faz necessária uma investigação mais abrangente utilizando-se este modelo, de forma a identificar se a deficiência em FPN pode impactar na disseminação de Mtb para órgãos nos quais macrófagos desempenham papel importante no metabolismo de ferro, como baço e fígado. Por fim, uma melhor compreensão do papel deste receptor durante a TB experimental pode identificar possíveis novos alvos para o desenvolvimento de terapias direcionadas ao hospedeiro para o tratamento da TB.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, ferroportina, ferro.

Abstract

Denadai, M. B. Characterization of an animal model to study the role of ferroportin in myeloid leukocytes during *Mycobacterium tuberculosis* infection. 2023. Dissertation (Master's Degree in Basic and Applied Immunology – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023).

The absence of an effective vaccine and a therapy that quickly eliminates the pathogenic agent from the host organism, contribute to tuberculosis (TB) being one of the most lethal infectious diseases in the world. New lines of treatment proposed in the literature suggest using host biological processes that favor the replication of bacteria as targets of therapeutic strategies to achieve a faster and more effective cure of the disease. Specifically, iron metabolism in infected cells has been suggested as a promising target for the development of host-directed therapies. The regulation of intracellular iron levels in macrophages, the main cell infected by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), occurs mainly through the combined action of the enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) and the transporter ferroportin (FPN). While the metabolism of heme by HO-1 results in the release of iron into the cytoplasm, FPN acts as a transporter of iron ions to the extracellular space. Thus, the decrease in its expression on the membrane of infected cells may directly contribute to the increase in their intracellular iron concentration, which can impact the control of bacterial replication. Therefore, our aim was to investigate the role of FPN during Mtb infection and to develop an animal model genetically deficient for FPN in macrophages in order to address this question. Our results showed that the infection of bone marrow-derived macrophages (BMDM) with Mtb induced a significant increase in FPN expression in the presence of iron supplementation. We observed that the in vivo Mtb infection induces changes in the relative expression of important markers for iron regulation in the lungs of C57BL/6 mice, such as HO-1, SPIC, ferritin (FTH) and hepcidin (HAMP). More importantly, we identified that in the lungs of animals infected with Mtb there was a significant increase in FPN expression in infected alveolar macrophages (AM) and, mainly, in infected monocyte-derived parenchymal macrophages (PM) compared to non-infected cells from the same populations, at four weeks post-infection (4 wpi). Therefore, we developed an animal model genetically deficient for FPN in AM and PM (FPN^{fl/fl} LyzMCre⁺), in order to investigate the role of this transporter in the containment of bacterial replication. We observed that FPN-deficient BMDM were more susceptible to Mtb infection in vitro when compared to wild-type (WT) cells, displaying a higher

bacterial load and cell death, especially in the presence of iron supplementation. However, this scenario was not reproduced in vivo, since FPN^{f/f} LyzMCre⁺ mice infected with a high dose of Mtb displayed similar pulmonary bacterial loads compared to WT animals; along with lower cell death in pulmonary leukocytes. Concomitant with these results, we observed a significant increase in iNOS production in total and infected PM. Taken together, our results indicate that the absence of FPN results in increased susceptibility to bacterial replication in macrophages in vitro, although, in vivo, in the lungs, the absence of FPN did not interfere with resistance to bacterial replication. However, a more comprehensive investigation using this model is still necessary, in order to identify whether FPN deficiency can impact the dissemination of Mtb to organs in which macrophages play an important role in iron metabolism, such as the spleen and liver. Finally, a better understanding of the role played by this receptor during experimental TB may identify possible new targets for the development of host-directed therapies for the treatment of TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, ferroportin, iron.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 12 |
| 1.1. Figura 1. Metabolismo de ferro em macrófagos | 16 |
| 2. Objetivos | 21 |
| 3. Metodologia..... | 22 |
| 3.1. Camundongos | 22 |
| 3.2. Cultura celular primária..... | 22 |
| 3.3. Cultura bacteriana | 23 |
| 3.4. Infecção de macrófagos <i>in vitro</i> | 23 |
| 3.5. Infecção <i>in vivo</i> | 23 |
| 3.6. Quantificação bacteriana | 23 |
| 3.7. Determinação da expressão de mRNA | 24 |
| 3.8. Dosagem de citocina por ELISA..... | 24 |
| 3.9. Quantificação de citotoxicidade celular pelo ensaio de LDH | 24 |
| 3.10. Preparação de suspensões unicelulares de pulmões e marcação para citometria | 24 |
| 3.11. Análise fenotípica de células infiltrantes pulmonares por citometria..... | 25 |
| 3.12. Detecção de ferroportina por imunofluorescência | 25 |
| 3.13. Estatística | 25 |
| 4. Desenvolvimento | 27 |
| 4.1. Figura 2. Padronização de marcação de FPN de membrana e indução de regulação de FPN de membrana..... | 28 |
| 4.2. Figura 3. Caracterização da expressão de FPN e de marcadores associados à modulação de ferro em pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com alta dose de Mtb. | 31 |
| 4.3. Figura 4. Efeito do tratamento com HAMP na replicação bacteriana de BMDM de camundongos C57BL/6 infectados com Mtb..... | 32 |
| 4.4. Figura 5. Camundongos com o genótipo FPN ^{flox/flox} Csfr1Cre ⁺ não são viáveis. | 34 |
| 4.5. Figura 6. Análise fenotípica de populações mieloides em pulmões de camundongos dTomato ^{flox} LyzM Cre ⁺ infectados ou não com Mtb | 36 |
| 4.6. Figura 7. Camundongos FPN ^{flox/flox} LyzM Cre ⁺ são mais suscetíveis à infecção por Mtb <i>in vitro</i> | 38 |
| 4.7. Figura 8. Análise fenotípica e quantificação bacteriana pulmonar de camundongos WT e FPN LyzM ⁺ infectados com alta dose de Mtb. | 41 |
| 5. Conclusão..... | 44 |
| Referências | 45 |
| Apêndice (s)..... | 49 |

| | |
|--|-----------|
| APÊNDICE A – Estratégia de <i>gate</i> de BMDM | 49 |
| APÊNDICE B – Estratégia de <i>gate</i> de células mielóides de animais C57BL/6, WT e FPN LyzM⁺ | 50 |
| APÊNDICE C – Estratégia de <i>gate</i> de células mielóides de animais dTomato LyzM Cre⁺ | 52 |
| APÊNDICE D – Estratégia de <i>gate</i> de células linfóides de animais WT e FPN LyzM⁺ | 53 |

1. Introdução

A tuberculose (TB) humana, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é uma das doenças infecciosas que mais mata no mundo. Em 2021 foram registrados 10,6 milhões de novos casos e 1,6 milhões de óbitos por TB (WHO, 2021). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o Brasil é listado como um dos 30 países com os mais altos índices de TB no mundo (*High TB Burden Countries*). A transmissão dessa doença ocorre através da inalação de gotículas de aerossol contendo o bacilo, que são expelidas através da tosse por indivíduos contaminados. Sua manifestação clínica mais comum é a TB pulmonar, embora outras regiões do corpo possam ser acometidas. Uma vez contaminado, o indivíduo pode apresentar um quadro assintomático da doença, no qual a infecção é latente, ou sintomático, exibindo sinais e sintomas clínicos além de replicação bacteriana (SIA; RENGARAJAN, 2019).

Como mencionado, a transmissão da TB ocorre por via aérea, desta forma as primeiras células imunes a entrarem em contato com a bactéria são macrófagos residentes no pulmão, os macrófagos alveolares (ERNST, 2012; MAYER-BARBER; BARBER, 2015). Outras células fagocíticas também são alvo de infecção pelo bacilo de Mtb, como neutrófilos, monócitos e células dendríticas (DCs) (MAYER-BARBER; BARBER, 2015). Uma vez infectados, esses fagócitos ativam mecanismos microbicidas para eliminar a bactéria, ao passo que as DCs migram para linfonodos drenantes para apresentação de antígeno para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (COOPER; SOLACHE; KHADER, 2007; MAYER-BARBER; BARBER, 2015). A resposta imune protetora contra a infecção por Mtb depende da posterior ativação e diferenciação destes linfócitos por DCs produtoras de IL-12, o que promove o desenvolvimento de imunidade adaptativa celular de padrão Th1 contra as bactérias (COOPER; SOLACHE; KHADER, 2007). Após recrutamento para o sítio de infecção, a liberação de IFN γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) por linfócitos Th1 antígeno-específicos desencadeia a ativação de células infectadas, que passam a expressar a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e produzir de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS), resultando na morte do bacilo contido nestas células (COOPER; SOLACHE; KHADER, 2007; ERNST, 2012; MAYER-BARBER; BARBER, 2015). Juntamente temos a liberação de granzimas, perforinas e granulicina por linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos na superfície de células infectadas,

contribuindo para a eliminação do bacilo (LIN; FLYNN, 2015). Entretanto, ao longo da evolução, a bactéria Mtb desenvolveu diversos mecanismos de evasão para impedir sua eliminação intracelular (PHILIPS; ERNST, 2012). Quando o macrófago falha em eliminar a bactéria, temos o desenvolvimento de uma infecção crônica, com formação de granulomas (MAYER-BARBER; BARBER, 2015). O granuloma consiste no acúmulo de leucócitos ao redor de fagócitos infectados com Mtb que falharam em eliminar a bactéria, com o intuito de conter sua disseminação para outros tecidos. No entanto, este cenário também é favorável para a bactéria visto que sua contenção em um granuloma favorece a permanência do bacilo no organismo e a perpetuação da infecção (DORHOI; KAUFMANN, 2016). A estrutura do granuloma é formada por uma 1ª camada composta por de fagócitos (macrófagos, neutrófilos, células gigantes multinucleadas e macrófagos espumosos) no centro do granuloma, seguido por uma 2ª camada de macrófagos epiteliais e, por fim, uma 3ª camada de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e linfócitos B (MAYER-BARBER; BARBER, 2015). Por serem estruturas ricas em uma resposta pró-inflamatória, a cronicidade da resposta pode levar ao dano tecidual local e, por isso, também é possível encontramos camadas de fibroblastos ao redor da estrutura do granuloma (DORHOI; KAUFMANN, 2016; MAYER-BARBER; BARBER, 2015). O desbalanço inflamatório no interior do granuloma pode levar à indução de necrose celular local (granuloma necrótico), podendo seguir dois caminhos: resolução e consequente fibrose local; ou liquefação e caseificação do conteúdo central (granuloma caseoso) e consequente liberação do bacilo em um ramo brônquico com eventual transmissão da doença (DORHOI; KAUFMANN, 2016). Ao final, esses processos acabam danificando o tecido pulmonar, levando à perda de regiões do órgão e sua disfunção (ERNST, 2012).

Não há vacina que seja eficaz para prevenir a TB adulta e o tratamento convencional consiste no uso de quatro antibióticos: rifampicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida, por no mínimo seis meses. Devido à sua longa duração e à presença de efeitos colaterais, o abandono da terapia é recorrente, podendo resultar em reativação da doença e seleção de bactérias resistentes aos antibióticos. O tratamento da TB causada por cepas resistentes a antibióticos requer uso de drogas mais tóxicas e por um período maior de tempo, mas com baixa margem de cura, 50-75% (WHO, 2021). Sendo assim, faz-se necessário o uso de novas abordagens terapêuticas que

não envolvam exclusivamente o uso de antibióticos e que busquem eliminar o patógeno de maneira mais rápida e eficiente.

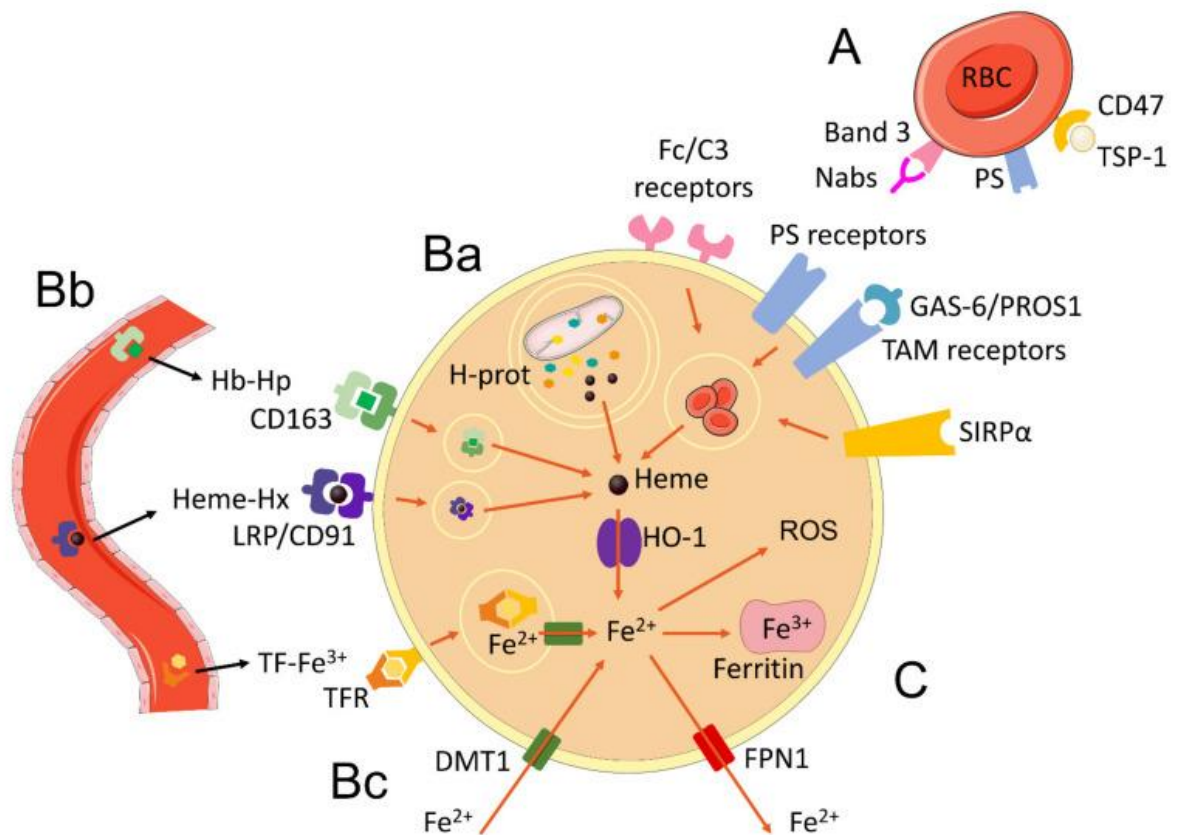
O uso de terapias direcionadas ao hospedeiro (TDHs) têm se tornado alternativas com grande potencial para atingir este objetivo. Assim como o nome se refere, TDHs tem como alvo processos biológicos do paciente que favorecem a sobrevivência do microrganismo, ou a patogênese da doença. O uso de fármacos que não sejam tóxicos para o agente infeccioso impede a seleção de patógenos resistentes à terapia. Desta forma, as TDHs têm como objetivo otimizar os mecanismos microbicidas de células infectadas, para que possam eliminar o patógeno de forma mais rápida e eficiente, ou suprimir respostas inflamatórias exacerbadas que são geradas durante a infecção, a fim de proteger o tecido contra danos causados pela inflamação e aumentar a absorção e penetração de antibióticos convencionais nos tecidos (HAWN; SHAH; KALMAN, 2015).

Heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima codificada pelo gene Hmox1, constitutivamente expresso por macrófagos envolvidos com o processo de reciclagem de eritrócitos e hemoglobinas. Sua principal função é atuar na metabolização de heme em três subprodutos: gás monóxido de carbono (CO), biliverdina (BV) e ferro (Fe^{2+}) (KIKUCHI; YOSHIDA, 1980; OTTERBEIN; SOARES; YAMASHITA; BACH, 2003; SOARES; BACH, 2009). Foi demonstrado que a inibição farmacológica da atividade de HO-1 em animais infectados com Mtb diminui a replicação bacteriana em camundongos C57BL/6, mas não em animais $IFN\gamma^{-/-}$ ou $NOS2^{-/-}$. Observou-se que a adição de um inibidor de HO-1 a macrófagos derivados de medula óssea (Bone Marrow-Derived Macrophages - BMDMs) infectados com Mtb, potencializou a atividade microbicida induzida pelo tratamento com $IFN\gamma$ nessas células, de forma dependente da enzima iNOS (COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021). Esses resultados indicam que HO-1 contribui para a replicação bacteriana ao prejudicar a eficácia de mecanismos microbicidas dependentes de $IFN\gamma$ e NOS2. Como mencionado anteriormente, HO-1 contribui com a reciclagem eritrocitária em macrófagos através da metabolização de heme. Existem diferentes formas de aquisição desta molécula pelo fagócito (**Fig. 1**) (DE OLIVEIRA; DENADAI; COSTA, 2022). Uma delas é através da fagocitose de eritrócitos senescentes que expressam diversos marcadores reconhecidos pelo macrófago (**Fig. 1A**). A autofagia de hemoproteínas presentes na mitocôndria (mitofagia) ou livres no citoplasma também gera moléculas de heme para o macrófago (**Fig. 1Ba**). Também podemos encontrar

hemoglobina (Hb) e heme complexadas ou não com proteínas séricas na corrente sanguínea, haptoglobina (Hp) e hemopexina (Hx), respectivamente (**Fig. 1Bb**). Quando em contato com a célula fagocítica, esses complexos podem ser endocitados por meio da ligação com receptores de membrana, como CD163 (Hb-Hp) e CD91 (heme-Hx). Por fim, heme citoplasmática é metabolizada por HO-1 gerando Fe^{2+} , CO e BV (**Fig. 1**). Foi demonstrado que o envolvimento de HO-1 no favorecimento da replicação bacteriana de Mtb tanto *in vivo* quanto *in vitro*, está associado ao acúmulo de um de seus subprodutos em células infectadas pela bactéria, o ferro. Isto foi comprovado em experimentos que demonstraram que o tratamento de BMDMs com ferro, mas não CO ou BV, foi capaz de reverter o efeito da inibição de HO-1 sobre o controle da carga bacteriana em BMDMs. Adicionalmente, o acúmulo de ferro encontrado em secções histológicas de camundongos infectados com Mtb também foi diminuído pela inibição de HO-1 *in vivo* (COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021).

Ferro é um nutriente essencial para o corpo humano, exercendo funções importantes como: respiração e sinalização celular, metabolismo energético, bem como reparo e síntese de DNA (SOARES; HAMZA, 2016). Entretanto, este micronutriente é também utilizado por quase todas as bactérias patogênicas, as quais desenvolveram evolutivamente diferentes mecanismos para aquisição deste íon (CASSAT; SKAAR, 2013). Desta forma, o organismo humano desenvolveu formas de reduzir o acesso de patógenos ao Fe^{2+} circulante, exercendo uma resposta denominada imunidade nutricional. Esse mecanismo envolve a ação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-22) que induzem o acúmulo e a estocagem de ferro intracelular, e, conseqüentemente, hipoferremia, diminuindo a disponibilidade de ferro no soro e ambiente extracelular, desta maneira impedindo o acesso ao íon por patógenos extracelulares (CASSAT; SKAAR, 2013; WEISS, 2005). Porém, isso favorece o acesso ao ferro por patógenos que sejam intracelulares obrigatórios ou facultativos, como Mtb. A relação entre o aumento da biodisponibilidade de ferro e o favorecimento da sobrevivência e replicação de agentes infecciosos é bem descrita na literatura (KIM; JEONG; LEE; KIM *et al.*, 2014; RIEDELBERGER; PENNINGER; TSCHERNER; SEIFERT *et al.*, 2020), inclusive na TB (GORDEUK; MCLAREN; MACPHAIL; DEICHSEL *et al.*, 1996; LOUNIS; TRUFFOT-PERNOT; GROSSET; GORDEUK *et al.*, 2001). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos que contribuem diretamente no metabolismo

1.1. Figura 1. Metabolismo de ferro em macrófagos.



Extraído de de Oliveira J, Denadai MB, Costa DL., *Antioxidants*, 2022.

deste íon durante a infecção por *Mtb*. Como exemplificado, uma das formas de aquisição de íons ferro é através da degradação de heme. Entretanto, existem outras vias nas quais o fagócito pode adquirir ferro. Ferro férrico (Fe^{3+}) pode ser encontrado em sua forma livre ou complexada com transferrina (TF), uma proteína sérica, na circulação sanguínea e fluídos extracelulares (**Fig. 1Bb**). Assim como os complexos heme-Hx e Hb-Hp, o macrófago também é capaz de endocitar Fe^{3+} -TF através do receptor de transferrina (TFR1 – CD71) presente na membrana. Após sua internalização, o Fe^{3+} complexado à transferrina é convertido em Fe^{2+} pela enzima STEAP3 (PHILPOTT; JADHAV, 2019), o qual é então transportado do endossomo para o citosol por meio do transportador DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*). DMT1 é um transportador transmembrana de íons de ferro comumente encontrado na membrana plasmática e endossomal. Ele contribui com o influxo de íons Fe^{2+} diretamente através membrana celular, e o responsável pelo passo final da aquisição de ferro via endocitose de transferrina (**Fig. 1Bc**). O ferro no citoplasma pode seguir três caminhos: ser estocado de maneira inerte em moléculas de ferritina na sua forma

Fe³⁺; compor o *pool* de ferro (Fe²⁺) livre citoplasmático (*Labile Iron Pool* - LIP), que é responsável pela maior parte das funções reguladoras de vias de sinalização intracelular desempenhadas pelo ferro, e que também contribui para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela reação de Fenton (DE OLIVEIRA; DENADAI; COSTA, 2022); ou ser transportado para o espaço extracelular pelo transportador ferroportina (FPN), o único exportador de íons ferro descrito atualmente na literatura (**Fig. 1C**). Nota-se que o metabolismo de ferro é um sistema complexo envolvendo diversas vias para aquisição deste íon, as quais podem ser exploradas pelo bacilo *Mtb* para melhor adaptação e sobrevivência nas células do hospedeiro.

Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo demonstraram que no infiltrado inflamatório de amostras de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados com *Mtb*, mais de 60% dos leucócitos *Mtb*⁺ eram células mieloides CD11b⁺, nas quais foi observado que há aumento da expressão de HO-1 ao longo da infecção, e que a intensidade de expressão de TFR1 (CD71) nestas mesmas células é maior em camundongos infectados em comparação a animais naive (dados não mostrados). Uma vez que a atividade de HO-1 e o eixo CD71-DMT1 promovem acúmulo de ferro intracelular, é possível que a FPN, através de sua atividade exportadora de íons de ferro, possa desempenhar um papel importante na regulação da homeostase de ferro em células infectadas por *Mtb* nos pulmões, mais especificamente, contribuindo com o acúmulo de ferro intracelular induzido pela infecção por *Mtb* em macrófagos pulmonares.

Existem diversos mecanismos envolvidos com a regulação de FPN na membrana. Uma das vias mais bem descritas na literatura é o eixo hepcidina-FPN. Hepcidina (HAMP) é um hormônio codificado pelo gene *Hamp* que é produzido principalmente por hepatócitos e macrófagos (SUKHBAATAR; WEICHHART, 2018). Além de suas propriedades microbicidas, HAMP é o principal mediador da imunidade nutricional do organismo inibindo a expressão de FPN na membrana celular (DE OLIVEIRA; DENADAI; COSTA, 2022). A produção deste hormônio ocorre em resposta a alterações dos níveis séricos de ferro (principalmente em hepatócitos) e frente ao estímulo por citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-22 (principalmente em macrófagos), cuja produção é induzida durante a infecção por *Mtb* (ABREU; ESSLER; LOY; QUINN *et al.*, 2018; ADANKWAH; NAUSCH; MINADZI; ABASS *et al.*, 2021; ARMITAGE; EDDOWES; GILEADI; COLE *et al.*, 2011; VIVEKANANDAN;

ADANKWAH; ANIAGYEI; ACHEAMPONG *et al.*, 2023). Após ser liberado pela célula, HAMP atua se ligando à porção extracelular da FPN, promovendo sua internalização seguida por degradação lisossomal (ANDREWS, 2008; VERMA; CHERAYIL, 2017). Desta forma, a degradação de FPN impede que este transportador exporte Fe^{2+} para o exterior do macrófago, promovendo o acúmulo intracelular do íon.

A regulação da expressão de FPN pela resposta imune não se restringe à produção de IL-6, uma vez que a família de receptores do tipo toll (TLRs), em especial TLR2, também desempenham um papel importante na modulação da expressão de FPN. A ligação de TLR2 juntamente a TLR1/6 promove ativação de MyD88 e de uma cascata de sinalização que reduz a transcrição de FPN de forma independente de hepcidina (ABREU; QUINN; GIRI, 2018). Por outro lado, as vias de TLR4 bem como TLR7/8 induzem a expressão de HAMP, também resultando em redução da expressão de FPN de membrana (ABREU; QUINN; GIRI, 2018). Entretanto, a ativação de TLRs também é capaz de induzir a expressão de FPN na superfície celular. Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) liberados por microrganismos podem se ligar à TLRs e induzir à expressão de Spic através da via STAT1-NF-Kb. Spic é um fator de transcrição que, quando ativado, promove indução da expressão e produção de FPN (ALAM; DEVALARAJA; LI; TO *et al.*, 2020).

Juntamente à produção de IL-6 e IL-22 que ocorre durante a TB (ABREU; ESSLER; LOY; QUINN *et al.*, 2018; ADANKWAH; NAUSCH; MINADZI; ABASS *et al.*, 2021; ARMITAGE; EDDOWES; GILEADI; COLE *et al.*, 2011; VIVEKANANDAN; ADANKWAH; ANIAGYEI; ACHEAMPONG *et al.*, 2023), mencionadas anteriormente, existem diversos ligantes de Mtb capazes de serem reconhecidos como agonistas de TLRs, dentre eles: lipoarabinomannan (LAM), lipomannan (LM) e fosfatidil-myo-inositol mannoside (PIM) (SAIGA; SHIMADA; TAKEDA, 2011). Sendo assim, é possível que durante a infecção por Mtb ocorra regulação da expressão de FPN em células infectadas pelo bacilo de maneira dependente ou independente de HAMP, conseqüentemente interferindo com a homeostasia de ferro em fagócitos infectados pelo bacilo.

Conforme citado anteriormente, nosso grupo identificou que o acúmulo de ferro advindo da ação de HO-1 em macrófagos infectados por Mtb prejudica a atividade microbicida dependente de iNOS após ativação com IFN- γ (COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021). Adicionalmente, Fe^{2+} livre no

citoplasma é um importante catalisador na reação de Fenton para a produção de ROS. No entanto, sua produção em excesso é extremamente prejudicial para a célula que pode sofrer danos citotóxicos causados por estresse oxidativo (SOARES; HAMZA, 2016). Radicais livres de peróxido de hidrogênio liberados pela reação de Fenton interagem com os lipídeos de membrana induzindo peroxidação lipídica. Em excesso, a peroxidação lipídica leva a desestabilização estrutural da membrana plasmática, causando um processo de necrose celular denominado ferroptose (AMARAL; FOREMAN; NAMASIVAYAM; HILLIGAN *et al.*, 2022; STOCKWELL; FRIEDMANN ANGELI; BAYIR; BUSH *et al.*, 2017). Esse processo é normalmente controlado pela ação da enzima glutathione peroxidase 4 (GPX4) que atua bloqueando a peroxidação lipídica de membrana. A produção de GPX4 é regulada pelo sistema X_c^- (SLC3A2 + SLC7A11), um transportador que exporta glutamato para o compartimento extracelular e importa cistina para o citoplasma. Cistina é então convertida em cisteína, ao qual gera glutathione (GSH), um cofator de GPX4 (STOCKWELL; FRIEDMANN ANGELI; BAYIR; BUSH *et al.*, 2017; WU; LI; ZHANG; ZHOU, 2021). GPX4 é negativamente modulado por níveis elevados de glutamato que inibem o sistema X_c^- , reduzindo os níveis intracelulares de cistina. A ação direta de erastina, sulfasalazina e sorafenib no sistema X_c^- também leva à inibição deste transportador e, conseqüentemente, depleção de cistina. Foi observado que BMDMs infectados com Mtb apresentam maior susceptibilidade à morte celular necrótica por exibirem redução na expressão de GSH e GPX4. Além da redução de GPX4, nota-se também um aumento na peroxidação lipídica em células CD11b⁺ de camundongos C57BL/6 infectados com TB (AMARAL; COSTA; NAMASIVAYAM; RITEAU *et al.*, 2019). Os efeitos do acúmulo de ferro na indução de peroxidação lipídica e redução de GPX4 foram confirmados em amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes infectados (AMARAL; FOREMAN; NAMASIVAYAM; HILLIGAN *et al.*, 2022). A deficiência de GPX4 em células mieloides de camundongos com deleção genética condicional para a molécula resulta em redução da resistência à infecção por Mtb com concomitante de aumento de necrose tecidual pulmonar (AMARAL; FOREMAN; NAMASIVAYAM; HILLIGAN *et al.*, 2022). Esses resultados demonstraram claramente o papel de GPX4 e da inibição da peroxidação lipídica como importantes mecanismos protetores contra a TB, por atuarem na inibição da ferroptose de células infectadas por Mtb. Entretanto, os mecanismos associados à

regulação do metabolismo de ferro nestas células, bem como as consequências para a modulação da ferroptose, são desconhecidos.

Considerando-se, portanto, que a regulação do metabolismo de ferro em macrófagos infectados com *Mtb* interfere no controle da replicação bacteriana pelo hospedeiro por ter papel na regulação da ativação de mecanismos microbicidas, bem como no controle do estresse oxidativo e morte celular por ferroptose; que alterações na expressão de FPN durante a infecção de macrófagos por *Mtb* pode desempenhar função importante na modulação da homeostasia de ferro destas células; e que o papel desempenhado pelo transportador FPN em macrófagos na resistência do hospedeiro à infecção por *Mtb* é desconhecido; torna-se importante estudar o papel desempenhado pela FPN em macrófagos na resistência do hospedeiro à infecção por *Mtb*.

2. Objetivos

- 1-** Caracterizar a modulação da expressão de FPN em macrófagos pela infecção com Mtb.
- 2-** Desenvolver um modelo animal geneticamente deficiente em FPN em macrófagos para investigar o papel de FPN durante a infecção por Mtb.

3. Metodologia

3.1. Camundongos

Camundongos C57BL/6 machos entre 6 a 10 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da FMRP-USP. Os animais *knockout* condicionais para o gene FPTN1 foram gerados a partir do cruzamento entre camundongos *FPN^{flox/flox}* (B6.129S Slc40a1tm2Nca/J), obtidos em colaboração com o Dr. David frazer (QIRM Berghofer Institute - Austrália) e Dra. Nancy Andrews (Universidade de Duke, Universidade de Harvard, Novartis, Estados Unidos), e camundongos *Csfr1 Cre⁺* [C57BL6-Tg(Csfr1-cre)1MnzJ] ou *LysM Cre⁺* [B6.129P2-Lyz2tm1(cre)lfo/J], obtidos da empresa Jackson Laboratory (Estados Unidos). As matrizes geradas foram expandidas e mantidas no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP – USP. Todos os estudos em animais foram conduzidos em instalações de Nível 2 e 3 de Biossegurança. Os camundongos foram alojados em condições específicas livres de patógenos com acesso a comida e água *ad libitum* e foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais. Todos os protocolos experimentais envolvendo camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP, protocolo nº 043/2020.

3.2. Cultura celular primária

Cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram realizadas com a utilização de células-tronco extraídas de fêmures e tíbias murinos com PBS livre de LPS (Gibco). Posteriormente as células leucocitárias foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 7 dias em placas de Petri (100 × 15 mm) contendo meio RPMI completo (suplementado com 2mM de L -glutamina (Gibco), 10% de SBF, 10mM de Hepes (Life Technologies), 1mM de piruvato de sódio (Gibco), 1mM de aminoácidos não essenciais e 100 U/ml de Penicilina G) suplementado com 20% de meio RPMI completo contendo sobrenadante de cultura de células L929. No 7º dia, macrófagos diferenciados foram coletados pela adição de PBS livre de LPS gelado e posteriormente plaqueados a 3x10⁵ (placa de 48 poços) ou 8x10⁴ (placa de 96 poços) células por poço.

3.3. Cultura bacteriana

Mtb cepa: H37Rv, H37Rv RFP ou H37Rv mCherry foi cultivada em meio 7H9 suplementado com 0,05% Tween80 e 10% de OADC a 37°C (7H9 completo). Bactérias na fase mid-log (OD 0,6–0,8) foram centrifugadas a 3075 x g por 10 minutos, ressuspensas em meio 7H9 fresco e congeladas a -80°C em alíquotas de $\sim 3 \times 10^8$ bacilos/ml para uso posterior.

3.4. Infecção de macrófagos *in vitro*

Alíquotas de Mtb H37Rv foram descongeladas e diluídas em meio 7H9 completo, sendo posteriormente cultivadas a 37°C por 4 dias. A concentração bacteriana do estoque foi determinada por espectrofotometria a 600 nm. Em seguida, uma alíquota foi centrifugada a 3075 x g por 10 minutos e então ressuspensa em meio RPMI completo. As bactérias foram sonicadas por 30 segundos e homogeneizadas para reduzir a aglomeração bacteriana. BMDMs foram expostos a cepa H37Rv RFP em diferentes multiplicidades de infecção (*multiplicity of infection* – MOI) por 4 horas, lavados com PBS livre de LPS e cultivados em meio RPMI completo na presença ou ausência de estímulos por diferentes períodos para realização dos ensaios.

3.5. Infecção *in vivo*

Camundongos C57BL/6, WT ($FPN^{flox/flox}$) ou $FPN^{flox/flox} LysM Cre^+$ entre 6 a 12 semanas de idade foram infectados por via intrafaríngeal com Mtb H37Rv (1000 CFU – alta dose). Brevemente, estoques congelados de bactérias com concentração previamente determinada foram descongelados, centrifugados para remoção do meio e ressuspensos em PBS contendo 0,05% Tween80. A solução foi sonicada para remoção de grumos bacterianos. Posteriormente, a concentração foi ajustada em água Milli-Q estéril e os animais foram inoculados com 30 μ l de solução bacteriana por via intrafaríngeal após anestesia com isoflurano. Um grupo separado de animais foi usado para determinar o inóculo bacteriano.

3.6. Quantificação bacteriana

As bactérias foram quantificadas em culturas de macrófagos ou homogenatos pulmonares por plaqueamento de diluições em série em placas de ágar Middlebrook 7H11 (Sigma) suplementadas com 10% meio de enriquecimento OADC e 100 U/ml

de Penicilina G (Sigma). O número total de micobactérias foi avaliado realizando contagens de CFU de culturas após 21 dias de incubação à 37°C.

3.7. Determinação da expressão de mRNA

O RNA total foi extraído de pulmões de camundongos infectados ou não por Mtb, homogeneizando o tecido em reagente Trizol e, em seguida, usando o kit Direct-zol RNA Miniprep de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi gerado por transcrição reversa de RNA total (1 µg de cada amostra de RNA) utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A expressão quantitativa de mRNA para diversos alvos foi determinada por reações de PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR Green PCR Master Mix. O Δ CT (19) ou $\Delta\Delta$ CT (limiar do ciclo) obtido foi utilizado para as análises.

3.8. Dosagem de citocina por ELISA

Os níveis de TNF α no sobrenadante de cultura celular de BMDM foram determinados utilizando o kit R&D Duoset ELISA (R&D Systems) segundo instruções do fabricante.

3.9. Quantificação de citotoxicidade celular pelo ensaio de LDH

Os níveis de morte celular por liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura celular de BMDM foram determinados utilizando o kit CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) segundo instruções do fabricante.

3.10. Preparação de suspensões unicelulares de pulmões e marcação para citometria

Camundongos foram injetados com 1 µg de anti-CD45 conjugado a FITC (CD45 IV) mais 10U de heparina sódica 3 a 5 min antes da eutanásia, para posterior distinção entre células presentes nos parênquimas e alvéolos ou na vasculatura pulmonar. Amostras de lóbulos pulmonares foram perfundidos com PBS e coletados de camundongos infectados ou não com Mtb. Posteriormente, as amostras foram digeridas com colagenase/DNAse IV (100 e 20 U/ml respectivamente) a 37°C por 30 minutos sob agitação (200 rpm). A reação enzimática foi interrompida pela adição de SBF (Gibco). As células pulmonares foram dispersas por passagem através de um

filtro de células de tamanho de poro de 100 µm e os eritrócitos rompidos pela adição de tampão de lise de ACK à temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (450 x g por 10 minutos) e ressuspensas em RPMI completo. As preparações de células resultantes foram contadas e então semeadas (2×10^6 células/poço) em placas de 96 poços de fundo redondo, marcadas com sonda de viabilidade e posteriormente com anticorpos conjugados a fluorocromos, com especificidade para diferentes moléculas de interesse. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSymphony A1.

3.11. Análise fenotípica de células infiltrantes pulmonares por citometria

Para análise de citometria, as células infiltrantes dos pulmões ou BMDMs foram caracterizadas de acordo com a marcação com sonda de viabilidade celular e com base na expressão de CD45 IV, CD45.2, CD11c, Siglec-F, CD11b, Ly6G, CD64, TCRβ, NK 1.1, CD19, HO-1, FPN, iNOS, CD3, CD4, CD8, CD44, Tbet, RORγt e FOXP3. As análises foram realizadas com a utilização do software FlowJo 10.4.2.

3.12. Detecção de ferroportina por imunofluorescência

A marcação de BMDMs foi realizada seguindo o protocolo *Immunofluorescent Staining of Intracellular Antigens on Cultured Cells* fornecido pela ThermoFisher. A solução de bloqueio foi preparada com PBS contendo BSA a 1%. A detecção de FPN foi obtida utilizando o anticorpo primário anti-FPN clone 1E11 (Amgen) a 1µg/ml, seguido de anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a Alexa Fluor 647 a 1 µg/ml. Para a marcação do núcleo celular foi utilizado DAPI. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica SP5 no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – USP.

3.13. Estatística

Todos os dados gráficos são apresentados como valores médios ± erro padrão da média (*standard error of mean* – SEM). As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0 usando o teste t de Student ou Mann-

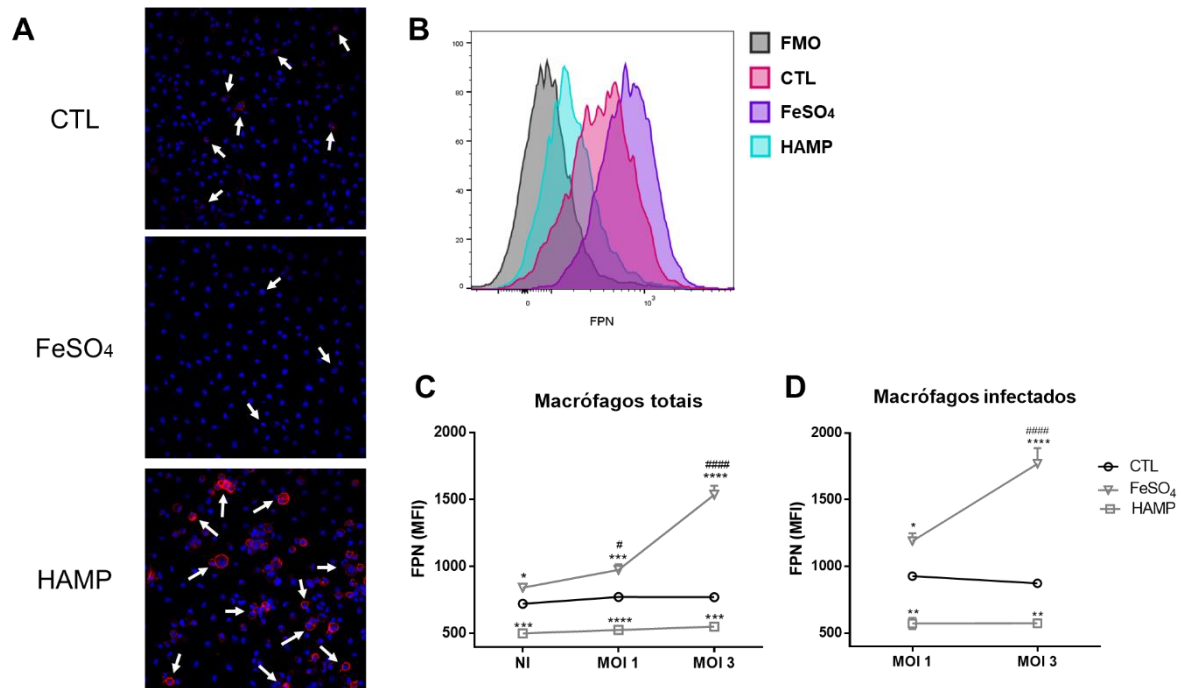
Whitney não pareado para comparação entre dois grupos. Análises de correlação foram realizadas utilizando-se o teste de Pearson. Também foi utilizado Two-Way ANOVA, teste de comparação múltipla. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ com asteriscos denotando o grau de significância (*= $p \leq 0.05$; **= $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$; ****= $p \leq 0.0001$).

4. Desenvolvimento

Como evidenciado na literatura, a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é capaz de estimular o acúmulo de ferro intracelular, o que prejudica a capacidade de células infectadas em controlar a replicação bacteriana em resposta à ativação por IFN- γ (COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021). O único transportador que realiza o transporte de íons de ferro para o ambiente extracelular descrito até o momento, é a ferroportina (FPN) (GANZ, 2016). Sendo assim, a diminuição de sua expressão na membrana de macrófagos infectados com Mtb pode favorecer o acúmulo de ferro nessas células. Como mencionado anteriormente, a expressão de FPN na membrana celular pode ser regulada negativamente de forma pós-traducional pela ação do hormônio hepcidina, que se liga ao transportador e induz sua internalização e degradação lisossomal (MICHELS; NEMETH; GANZ; MEHRAD, 2015). A hepcidina é transcrita como um pré-propeptídeo de 84 aminoácidos que é posteriormente clivado em sua forma ativa que contém 25 aminoácidos (HAMP-25) (ROCHETTE; GUDJONCIK; GUENANCIA; ZELLER *et al.*, 2015). Com base na sequência de aminoácidos da forma ativa da hepcidina murina, nós encomendamos comercialmente a síntese do peptídeo HAMP-25, para utilizá-lo em ensaios *in vitro* como uma ferramenta para reduzir a expressão de FPN na membrana de macrófagos derivados de medula óssea (*bone marrow-derived macrophages* - BMDM), e posteriormente avaliar o papel de FPN na resistência dessas células à infecção *in vitro* por Mtb. Paralelamente, obtivemos em colaboração com a empresa Amgen, dois clones de anticorpos específicos para a porção extracelular da FPN murina (ROSS; BISWAS; ROTTMAN; ALLEN *et al.*, 2017), para utilizá-los na quantificação da expressão da proteína na membrana celular. Esta colaboração se fez necessária, pois todos os anticorpos específicos para FPN murina comercializados por diferentes empresas, reconhecem uma porção intracelular da proteína, e, portanto, se ligam tanto à FPN expressa na membrana celular como na membrana de organelas intracelulares, o que adiciona um viés ao processo de detecção da expressão do transportador na membrana celular. Sendo assim, primeiramente testamos se o tratamento de BMDMs com HAMP sintética de fato resultaria na diminuição da expressão de FPN de membrana. Desta forma, foram utilizados BMDMs de camundongos C57BL/6 separados em três grupos: não tratado (CTL), tratados com hepcidina-25 sintética (HAMP) ou ferro (FeSO₄). Ao passo que se espera que HAMP diminua a expressão de FPN nas células (ANDREWS, 2008;

KIM; JEONG; LEE; KIM *et al.*, 2014), a administração de FeSO_4 serve como um indutor de sua expressão na membrana celular (ASPERTI; GRZYK; BRILLI; CASTAGNA *et al.*, 2018; MITRA; KO; CINGOLANI; NIEDERWEIS, 2019).

4.1. Figura 2. Padronização de marcação de FPN de membrana e indução de regulação de FPN de membrana.



BMDM de camundongos C57BL/6 foram cultivados a 5×10^5 ou 3×10^5 células por poço em placas de 24 ou 48 poços, respectivamente e separados em grupos que receberam os seguintes tratamentos por 24h: não tratado (CTL), hepcidina 25 (HAMP - 700nM) e FeSO_4 (50 μM). Detecção da expressão de FPN por imunofluorescência (**A**) e por citometria de fluxo (**B**) utilizando um novo anticorpo anti-FPN (clone 1E11) para a porção extracelular do transportador (ferroportina é mostrada vermelho e os núcleos das células em azul); a estratégia de *gate* pode ser encontrada no **Apêndice A**. (**C**, **D**) Expressão de FPN pela intensidade média de fluorescência (MFI) em macrófagos totais (**C**) ou infectados (**D**). Macrófagos infectados ou não (NI) com Mtb H37Rv RFP MOI:1 ou MOI:3, tratados ou não com FeSO_4 ou HAMP. Análise estatística: Two-Way ANOVA, teste de comparação múltipla. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$. * referente à comparação estatística entre os grupos CTL e tratado; # referente à comparação estatística entre infecções.

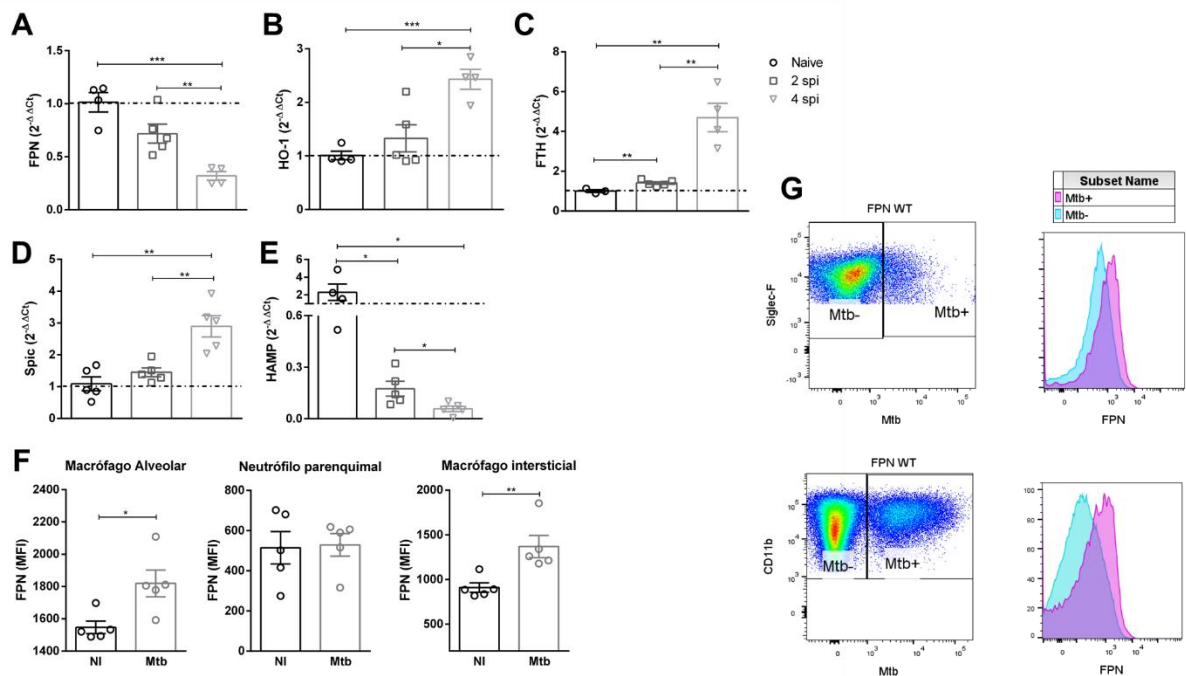
De fato, a incubação com HAMP resultou em diminuição da expressão de FPN, ao passo que o tratamento com o doador de ferro FeSO_4 induziu aumento de FPN de membrana, conforme observado por imunofluorescência (**Fig. 2A**) e citometria de fluxo (**Fig. 2B**). Posteriormente avaliamos se a infecção por Mtb seria capaz de alterar a expressão de FPN na superfície celular. Desta forma, BMDM foram ou não infectados com diferentes cargas bacterianas (MOI:1 ou 3) de uma cepa fluorescente de Mtb – H37Rv RFP, sendo posteriormente estimulados ou não com FeSO_4 ou HAMP (**Fig. 2C, D**). Não observamos diferença na expressão de FPN em macrófagos totais

ou dentro de populações infectadas no grupo CTL, entre células não infectadas ou infectadas com Mtb nos diferentes MOI (**Fig. 2C, D**). No entanto, os resultados mostram que a infecção com Mtb (NI, MOI:1 ou 3) induziu aumento da expressão de FPN em células suplementadas com ferro em comparação a macrófagos não tratados, de forma que a intensidade de expressão de FPN aumentou gradativamente com a infecção (**Fig. 2C, D**). Como esperado, o tratamento com HAMP foi capaz de reduzir a expressão de FPN, mesmo na maior dose de Mtb (**Fig. 2D**). Com base nos resultados preliminares obtidos, nota-se que HAMP é capaz de diminuir a expressão de FPN em macrófagos infectados ou não, sendo possível utilizá-lo como um bloqueador de FPN em experimentos futuros. Como descrito anteriormente, diversos trabalhos relatam que a infecção por patógenos (CASSAT; SKAAR, 2013; WEISS, 2005) leva a redução de FPN de membrana de forma a diminuir a biodisponibilidade de ferro extracelular. A HAMP consiste em um hormônio importante para essa modulação (SUKHBAATAR; WEICHHART, 2018), e, neste caso, em resposta à IL-6 produzida sistemicamente durante certas infecções, ocorre produção de HAMP por macrófagos, que age na FPN de membrana, diminuindo sua expressão Mtb (ABREU; ESSLER; LOY; QUINN *et al.*, 2018; ADANKWAH; NAUSCH; MINADZI; ABASS *et al.*, 2021; ARMITAGE; EDDOWES; GILEADI; COLE *et al.*, 2011; VIVEKANANDAN; ADANKWAH; ANIAGYEI; ACHEAMPONG *et al.*, 2023). Este mecanismo denominado como 'resposta imune nutricional' (GANZ; NEMETH, 2015; NUNEZ; SAKAMOTO; SOARES, 2018), apesar de eficiente contra bactérias exclusivamente extracelulares pode favorecer o crescimento e replicação de patógenos intracelulares, como é o caso do bacilo de Mtb (BOELAERT; VANDECASTEELE; APPELBERG; GORDEUK, 2007; GORDEUK; MCLAREN; MACPHAIL; DEICHSEL *et al.*, 1996; YANG; OUYANG; LU; HARYPURSAT *et al.*, 2022). De fato, nossos dados indicam que macrófagos aumentam expressão do transportador em resposta à infecção por Mtb, particularmente em situações em que os níveis intracelulares de ferro são aumentados (mediante suplementação com FeSO₄) (**Fig. 2B**). Este fenômeno pode representar um mecanismo protetor para o hospedeiro através de diferentes maneiras: a) por diminuir a disponibilidade de ferro intracelular para utilização pelo bacilo; b) por reduzir os efeitos prejudiciais do excesso de ferro livre intracitoplasmáticos tanto na supressão de mecanismos microbicidas dos macrófagos, como na indução de morte celular necrótica por ferroptose.

Simultaneamente, realizamos experimentos para caracterizar a expressão relativa de genes que possam estar envolvidos na regulação da expressão de FPN em homogenatos de pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com uma alta (1000 CFU) dose de Mtb em diferentes pontos após a infecção (**Fig. 3A, B, C, D e E**). Em paralelo, infectamos camundongos com alta dose de uma cepa de Mtb H37Rv fluorescente (mCherry), com o objetivo de avaliar a expressão proteica de FPN na superfície de subpopulações de células mielóides infectadas ou não a bactéria (mCherry⁺ ou mCherry⁻) por citometria de fluxo após o estabelecimento da doença (4 spi) (**Fig. 3F e G**). Contrariamente ao que observamos em uma cultura de macrófagos purificados *in vitro*, no tecido pulmonar como um todo, foi detectada uma diminuição na expressão de mRNA para FPN (**Fig. 3A**). Entretanto, ao analisarmos a expressão proteica individualmente nas populações de fagócitos pulmonares, observamos que a infecção por Mtb foi capaz de induzir FPN significativamente em macrófagos intersticiais bem como macrófagos alveolares, uma vez que nestas subpopulações, células infectadas apresentaram maior expressão de FPN quando comparadas às células não infectadas (**Fig. 3F e G**). Esta diferença, entretanto, não foi observada em neutrófilos parenquimais (**Fig. 3F**). Em concordância com estes resultados, encontramos uma diminuição significativa na expressão de mRNA para HAMP (**Fig. 3E**) e aumento de SPIC (**Fig. 3D**) às 2 e 4 spi em comparação a animais naive. Conforme mencionado, SPIC é um fator de transcrição importante na regulação de FPN, sendo capaz de induzir a transcrição gênica deste transportador através da ativação de TLRs por PAMPs (ALAM; DEVALARAJA; LI; TO *et al.*, 2020). A HO-1 é uma enzima crucial no metabolismo de ferro em macrófagos e o aumento de sua expressão durante a TB é bem descrito tanto na doença humana quanto em modelos experimentais (COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021; ROCKWOOD; COSTA; AMARAL; DU BRUYN *et al.*, 2017). Como esperado, observamos um aumento significativo na expressão de HO-1 durante às 2 e 4 spi em comparação a animais naive (**Fig. 3B**), sendo que o mesmo foi observado em relação à ferritina (FTH) (**Fig. 3C**). Embora não tenhamos quantificado diretamente ferro intracelular nestas células, estes resultados indicam que a infecção por Mtb pode estar gerando um acúmulo de do metal no citoplasma, uma vez que a liberação de ferro resultante da atividade de HO-1 induz aumento da expressão de FTH (DE OLIVEIRA; DENADAI; COSTA, 2022; REDDY; CHINTA; SAINI; GLASGOW *et al.*, 2018). Desta forma, com base nos dados apresentados, é possível que a regulação negativa de

HAMP e positiva de SPIC nos pulmões de animais infectados possa contribuir para o aumento da expressão de FPN em macrófagos infectados, conforme observado, o que pode atenuar o aumento dos níveis intracelulares de ferro nestas células, diminuindo a biodisponibilidade do metal para a bactéria, ou os efeitos prejudiciais para ativação de resposta microbicida, bem como sobre a morte celular necrótica por ferroptose.

4.2. Figura 3. Caracterização da expressão de FPN e de marcadores associados à modulação de ferro em pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com alta dose de Mtb.

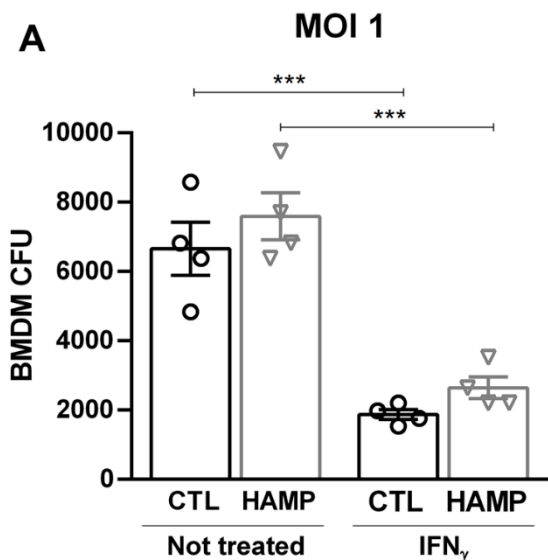


Camundongos C57BL/6 foram infectados ou não com 1000 CFU de Mtb H37Rv ou H37Rv mCherry. Expressão gênica por PCR em tempo real foi realizada em homogenatos pulmonares 2 ou 4 spi para FPN (**A**), HO-1 (**B**), FTH (**C**), Spic (**D**) e HAMP (**E**). A expressão de FPN por MFI, em diferentes tipos de células mielóides do infiltrado inflamatório pulmonar, foi realizada 4 semanas pós-infecção (spi); macrófago alveolar (MA), neutrófilo parenquimal (NP) e macrófago intersticial por citometria de fluxo (**F**, **G**); a estratégia de *gate* pode ser encontrada no **Apêndice B**. Análise estatística: teste t de Student. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$.

Uma vez que os dados anteriores mostraram que a infecção por Mtb acarreta no aumento da expressão de FPN na superfície celular de macrófagos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, nosso próximo objetivo foi avaliar se a ausência de FPN corroboraria para a replicação bacteriana. Para isso, foram utilizados BMDM de camundongos C57BL/6, os quais foram infectados com a cepa de Mtb H37Rv com MOI:1. Quatro

horas após a infecção, as células foram tratadas ou não com HAMP, com o intuito de bloquear a expressão de FPN, e estimuladas ou não com IFN γ (**Fig. 4A**). Observamos que, apesar de possuírem menos FPN na superfície celular (**Fig. 2D**), as células tratadas com HAMP não apresentaram diferença na carga bacteriana quando comparadas ao CTL (**Fig. 4A**). No entanto, a estimulação com IFN γ foi capaz de conter a replicação bacteriana em ambas as células tratadas ou não com HAMP (**Fig. 4A**). Esses resultados indicam que a diminuição da expressão de FPN induzido pelo tratamento com HAMP não interferiu com a resistência dos macrófagos à replicação bacteriana ou com sua atividade microbicida.

4.3. Figura 4. Efeito do tratamento com HAMP na replicação bacteriana de BMDM de camundongos C57BL/6 infectados com Mtb.

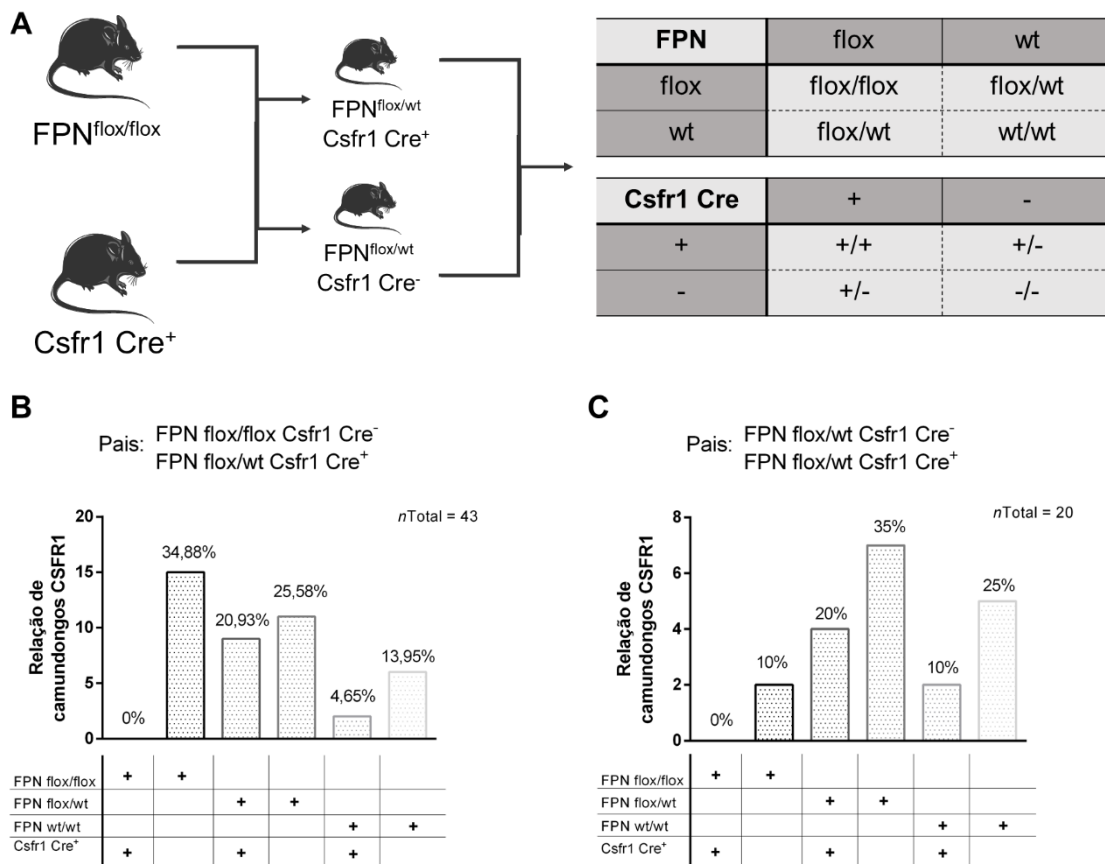


BMDM de camundongos C57BL/6 foram cultivados a 8×10^4 células por poço (placas de 96 poços) e infectados com Mtb H37Rv MOI: 1 ou 3, sendo posteriormente estimulados ou não com hepcidina 25 (HAMP – 700ng/ml) e tratados ou não com IFN- γ (100 U/ml) (**A**). A quantificação da carga bacteriana foi realizada 4h após a infecção no tempo 0 (T0) e 96h nas demais condições. Análise estatística: Two-Way ANOVA, teste de comparação múltipla. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$. * referente à comparação estatística entre os grupos CTL e tratado; # referente à comparação estatística entre infecções.

Entretanto, vale salientar que a cultura realizada para análise de carga bacteriana nos macrófagos é longa, com 96h de incubação. Uma vez que as células utilizadas eram derivadas de camundongos C57BL/6 tipo selvagem, é possível que a expressão de FPN de membrana possa ter sido restaurada após uma diminuição inicial em resposta à HAMP, introduzindo um viés na interpretação dos resultados.

Portanto, para caracterizar de maneira mais precisa o papel de FPN em macrófagos durante a infecção por Mtb, demos início à geração de um modelo animal de camundongos deficientes para a expressão de FPN apenas em leucócitos mieloides, com foco em macrófagos (COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021). Sendo assim, utilizamos o sistema Cre-LoxP para a geração de camundongos com deleção genética condicional para FPN (KIM; KIM; IM; FANG, 2018). Foram consideradas duas linhagens Cre⁺ para a depleção do gene de FPN flanqueado por regiões flox: Csfr1 Cre⁺ e LyzM Cre⁺. Inicialmente, utilizamos animais Csfr1 Cre⁺ para os cruzamentos. Dessa forma, camundongos FPN^{flox/flox} e Csfr1 Cre⁺ foram cruzados para a geração de animais experimentais wild-type (WT/ FPN^{flox/flox}) e knockout condicional (FPN^{flox/flox} Csfr1 Cre⁺) (**Fig. 5A**). Após o primeiro cruzamento, formamos dois casais para expansão da colônia e geração de animais com deleção condicional de FPN, um deles contendo um progenitor WT/ FPN^{flox/flox} e outro FPN^{flox/wt} Csfr1 Cre⁺, cuja estimativa para geração de camundongos FPN^{flox/flox} Csfr1 Cre⁺ deveria ser de 25% (**Fig. 5B**) e outro casal com progenitores WT/ FPN^{flox/wt} e FPN^{flox/wt} Csfr1 Cre⁺, para o qual a estimativa para geração de camundongos FPN^{flox/flox} Csfr1 Cre⁺ deveria ser de 12,5% (**Fig. 5C**). Porém, durante o processo de cruzamento, mesmo após a obtenção de diversas ninhadas, não foi possível obter nenhum camundongo KO condicional (**Fig. 5B, C**). Estes resultados demonstraram que a deleção genética de FPN em células Csfr1⁺ gera uma condição que é letal durante a fase embrionária, uma vez que obtivemos todos os outros genótipos possíveis entre os filhotes, com exceção de animais FPN^{flox/flox} Csfr1 Cre⁺.

4.4.Figura 5. Camundongos com o genótipo FPN^{flox/flox} Csfr1Cre⁺ não são viáveis.



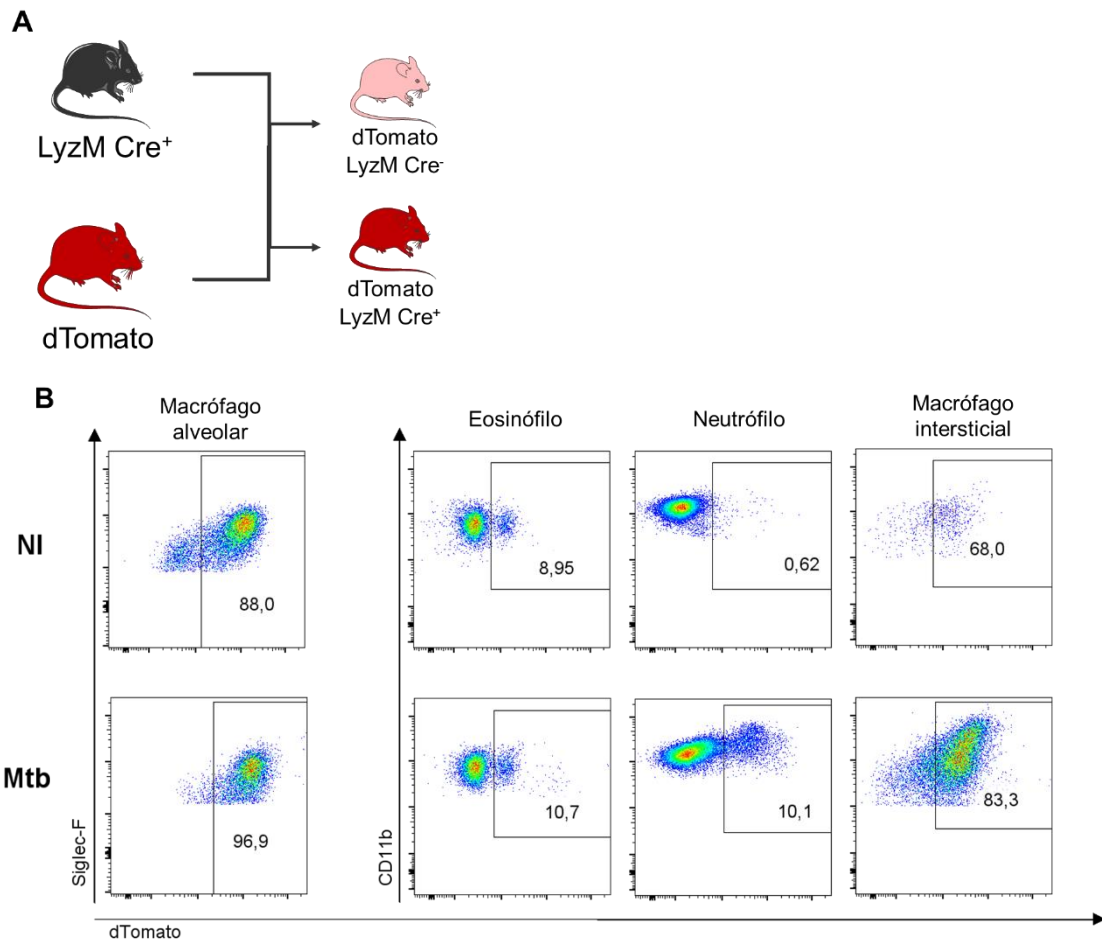
Representação ilustrativa do cruzamento entre animais FPN^{flox/flox} e Csfr1 Cre⁺ para a geração de animais geneticamente deficientes para FPN em células mielóides (**A**). Número e frequência de filhotes e seus respectivos genótipos resultantes da criação para geração de animais FPN^{flox/flox} Csfr1Cre⁺, advindos de pais (**B**) FPN^{flox/flox} Csfr1Cre⁻ x FPN^{flox/wt} Csfr1Cre⁺ (43 filhotes) e (**C**) FPN^{flox/wt} Csfr1Cre⁻ e FPN^{flox/wt} Csfr1Cre⁺ (20 filhotes).

Sendo assim, uma vez que não foi possível gerar camundongos FPN KO condicionais em células Csfr1⁺, a linhagem LyzM Cre⁺ foi utilizada como substituta para prosseguirmos com o projeto. A geração de camundongos FPN^{flox/flox} LyzM Cre⁺ (FPN LyzM⁺) se mostrou viável, e, como um primeiro passo antes de sua utilização, realizamos uma validação do modelo, para confirmar que animais FPN LyzM⁺ de fato apresentariam deleção de FPN em células macrófagos pulmonares durante a infecção por Mtb. Para isso, realizamos o cruzamento de camundongos LyzM Cre⁺ com uma linhagem que expressa o gene da proteína dTomato em um locus gênico expresso sistemicamente (**Fig. 6A**). A proteína dTomato inserida, neste caso, possui um stop códon em sua região promotora flanqueada por regiões flox. Uma vez que ocorra o

cruzamento com uma linhagem que expressa Cre recombinase, nos filhotes, o stop códon será removido pela ação de Cre recombinase nas células Cre⁺ (em nosso caso, LyzM Cre⁺), tornando estas células fluorescentes (16). Camundongos dTomato^{flox} LyzM Cre⁺ foram gerados e posteriormente infectados (Mtb) ou não (Naive) com 100 CFU da cepa H37Rv e avaliados 4 spi. Conforme evidenciado na Figura 6, LyzM Cre⁺ está presente em diversas populações mieloides, principalmente macrófagos alveolares e macrófagos parenquimais, e em menor frequência, em neutrófilos e eosinófilos. Além disso, observamos que a infecção por Mtb é capaz de induzir aumento na frequência de células em que ocorre recombinação, provavelmente pela indução da expressão de LyzM em células mieloides. Sendo assim, podemos concluir que este é um modelo adequado para ser utilizado na avaliação do papel de FPN em macrófagos pulmonares durante a infecção por Mtb.

Considerando as alterações encontradas na expressão de FPN em macrófagos *in vitro* e *in vivo*, bem como em marcadores associados à sua modulação em animais C57BL/6 durante a infecção por Mtb *in vivo*, em seguida iniciamos experimentos para avaliar se a deficiência de FPN em macrófagos causaria alteração na resistência à infecção por Mtb. Inicialmente, BMDM de animais WT e FPN LyzM⁺ foram cultivados e infectados com uma baixa dose (MOI:1) da cepa H37Rv RFP de Mtb, sendo posteriormente tratados ou não com FeSO₄ (50µM) (**Fig. 7**). Inicialmente buscamos confirmar a deficiência de FPN nas células de camundongos FPN LyzM⁺ em comparação às de animais WT. Como esperado, os animais WT apresentaram um MFI de FPN maior que os animais FPN LyzM⁺, especialmente sob tratamento com FeSO₄ (**Fig. 7A**). Apesar de observarmos uma expressão sutil do transportador nos animais FPN LyzM⁺, vale ressaltar que, conforme observado no modelo dTomato^{flox} LyzM Cre⁺, a deleção em macrófagos não é total (**Fig. 6B**).

4.5. Figura 6. Análise fenotípica de populações mieloides em pulmões de camundongos dTomato^{flox} LyzM Cre⁺ infectados ou não com Mtb

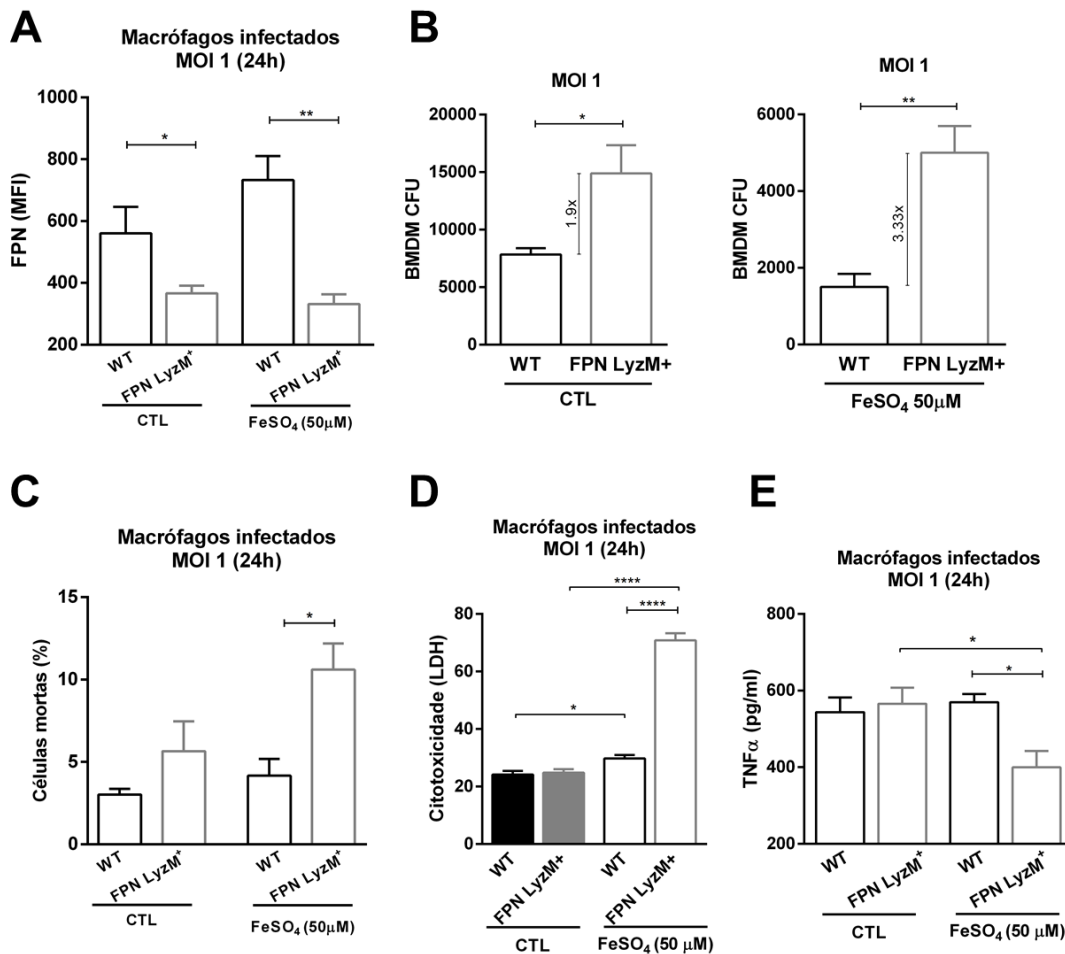


Camundongos dTomato LyzM Cre⁺ foram infectados (Mtb) ou não (Naive - NI) com uma baixa dose de Mtb (100 CFU) da cepa H37Rv e a análise fenotípica do infiltrado inflamatório pulmonar foi realizada 4 spi. Representação ilustrativa do cruzamento entre animais FPN^{flox/flox} e LyzM Cre⁺ para a geração de animais geneticamente deficientes para FPN em células mieloides (**A**). (**B**) Frequência de macrófagos alveolares (R3), eosinófilos (R4), neutrófilos (R5) e macrófagos parenquimais (R9) que sofreram recombinação por cre recombinase em pulmões de camundongos naive (painéis superiores) e infectados com Mtb, 4 spi (painéis inferiores); a estratégia de *gate* pode ser encontrada no **Apêndice C**.

Em seguida avaliamos se a deficiência de FPN iria interferir com o controle da replicação de Mtb por BMDM *in vitro*. Observamos que células FPN LyzM⁺ apresentaram maior suscetibilidade ao crescimento bacteriano que os macrófagos WT (média do número de bactérias foi 1,9x maior em macrófagos FPN KO) (**Fig. 7B**). Em um experimento separado, em que os macrófagos foram suplementados com ferro na forma de FeSO₄, observamos maior suscetibilidade ainda mais evidente à replicação bacteriana em macrófagos deficientes em FPN (média do número de bactérias foi 3,3x maior em macrófagos FPN KO) (**Fig. 7C**). Estes resultados demonstram que, diferente

de células WT, os macrófagos FPN LyzM⁺ são incapazes de induzir aumento da expressão de FPN na superfície celular. Possivelmente, essa falha no aumento da expressão de ferroportina pode estar levando o acúmulo de íons ferro no interior destas células (DONOVAN; LIMA; PINKUS; PINKUS *et al.*, 2005; WILLEMETZ; BEATTY; RICHER; RUBIO *et al.*, 2017) e, conseqüentemente, favorecendo o aumento da carga bacteriana. Este cenário ainda é agravado quando suplementamos estas células com ferro, mostrando que o acúmulo deste íon corrobora ainda mais para a replicação da Mtb em macrófagos (CHAO; SIEMINSKI; OWENS; GOULDING, 2019; COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021). Como mencionado anteriormente, a concentração elevada de íons de Fe²⁺ no interior da célula pode causar diversos distúrbios metabólicos e conseqüentemente estresse oxidativo (DE OLIVEIRA; DENADAI; COSTA, 2022; SOARES; HAMZA, 2016). A falha dos mecanismos antioxidantes é extremamente prejudicial para a célula, podendo resultar em peroxidação lipídica da membrana celular e conseqüente morte celular por ferroptose (AMARAL; COSTA; NAMASIVAYAM; RITEAU *et al.*, 2019).

4.6. Figura 7. Camundongos FPN^{flox/flox} LyzM Cre⁺ são mais suscetíveis à infecção por Mtb *in vitro*.



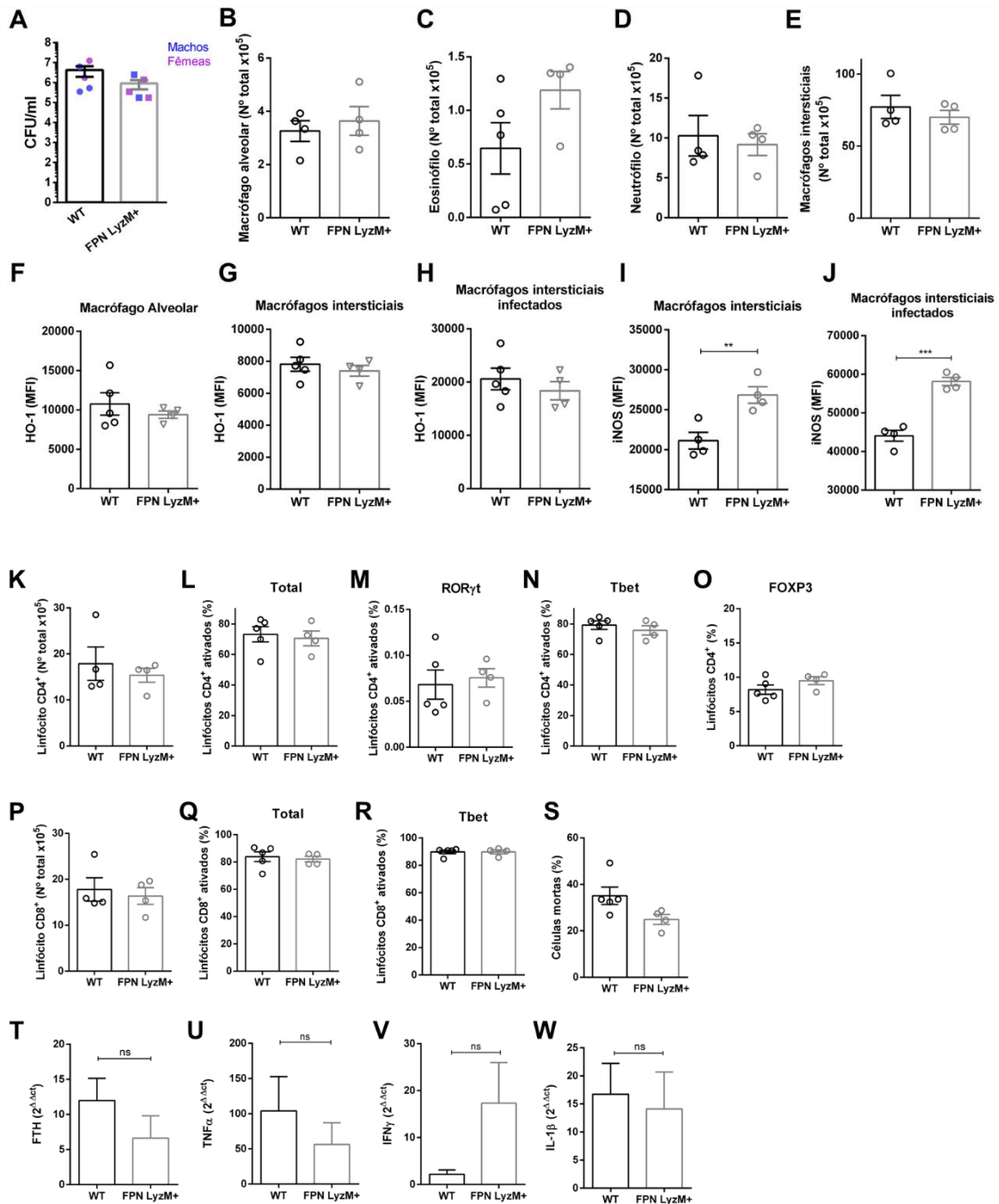
BMDM de camundongos FPN^{flox/flox} (WT) e FPN^{flox/flox} LyzM Cre⁺ (FPN LyzM⁺) foram cultivados a 3×10^5 (placa de 48 poços) ou a 8×10^4 (placa de 96 poços) células por poço e infectados com Mtb H37Rv RFP MOI: 1, sendo posteriormente estimulados (FeSO₄ - 50μM) ou não (CTL). A expressão de FPN em macrófagos CD11b⁺ foi quantificada por citometria de fluxo 24h após a infecção (**A**); a estratégia de *gate* pode ser encontrada no **Apêndice A**. A carga bacteriana entre os grupos CTL e FeSO₄ foi determinada em experimentos separados, 96h após a infecção por Mtb (**B**). Detecção de morte celular por citometria de fluxo (**C**) e citotoxicidade por LDH (**D**). Quantificação da produção de TNFα por ELISA (**D**) e de morte celular (**D**) foi detectada no sobrenadante. Análise estatística: teste t de Student. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$.

Sendo assim, buscamos avaliar se o possível acúmulo de ferro causado pela ausência de FPN poderia estar resultando em aumento de morte celular nestas células. Observamos que a infecção com Mtb (MOI:1) juntamente à suplementação com ferro resultou em aumento na frequência de macrófagos mortos no grupo deficiente em FPN em comparação a células WT (**Fig. 7C**). Este resultado foi refletido no ensaio de citotoxicidade pela liberação de lactato desidrogenase (LDH), um marcador modelo para quantificação de morte celular necrótica (KAYAGAKI; KORNFIELD; LEE; STOWE

et al., 2021; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018), que indicou haver mais morte celular em células deficientes em FPN em comparação a macrófagos WT mediante suplementação com ferro (**Fig. 7D**). Adicionalmente, observamos aumento de morte celular em ambos os grupos após a suplementação com FeSO₄, entretanto, a magnitude do aumento em morte de células foi maior no grupo deficiente em FPN (**Fig. 7D**). Foi demonstrado que mesmo uma baixa dose (MOI:1) de Mtb foi capaz de aumentar significativamente a frequência de BMDM mortos e reduzir os níveis de GSH, além de induzir aumento de ferro lábil e peroxidação lipídica por ROS 24h após a infecção (AMARAL; COSTA; NAMASIVAYAM; RITEAU *et al.*, 2019; NAMGALADZE; FUHRMANN; BRUNE, 2022). Corroborando com estes dados, nossos resultados demonstram que a ausência de FPN foi capaz de impactar negativamente na viabilidade de BMDM infectados por Mtb. Sendo assim, em conjunto com os dados publicados mencionados acima, nossos resultados sugerem que o acúmulo de ferro causado pela ausência de FPN em macrófagos possa levar estas células à ferroptose quando infectadas por Mtb, promovendo maior suscetibilidade à replicação bacteriana. Contudo, são necessários outros ensaios que detectem a presença de marcadores importantes para a caracterização de um fenótipo de morte celular por ferroptose. Por fim, também observamos uma redução significativa de TNF α no sobrenadante de macrófagos FPN LyzM⁺ tratados com ferro em comparação aos grupos FPN LyzM⁺ CTL e WT FeSO₄ (**Fig. 7E**). Foi demonstrado que Fe²⁺ é um indutor de TNF α através da ativação de NF- κ B (SHE; XIONG; LIN; ZANDI *et al.*, 2002; ZHANG; ZHANG; AN; GUO *et al.*, 2011). A indução desta citocina por ferro pode ser considerada bastante importante tendo em vista suas propriedades pró-inflamatórias e coestimuladoras (MA, 2001), além de contribuir para a eliminação de células infectadas com Mtb por induzir apoptose, uma forma de morte celular programada associada à proteção contra a infecção por Mtb (GAUTAM; MEHRA; AHSAN; ALVAREZ *et al.*, 2014). Entretanto, o provável acúmulo de ferro em macrófagos deficientes em FPN culminou em diminuição da produção de TNF α , o que também foi observado no homogenato de pulmões de animais GPX4^{flox/flox} CD45 Cre⁺ infectados com Mtb, em comparação a camundongos WT (AMARAL; FOREMAN; NAMASIVAYAM; HILLIGAN *et al.*, 2022). Sendo assim, é possível que a baixa produção de TNF α observada (**Fig. 7E**) possa estar correlacionada em uma tentativa de diminuir a morte celular presente em animais FPN LyzM⁺.

Por fim, buscamos investigar as diferenças *in vivo* entre camundongos WT e FPN LyzM⁺ 4 spi com uma alta dose (1000 CFU) de Mtb. Realizamos uma avaliação fenotípica em células mielóides e linfóides, bem como quantificação da carga bacteriana e expressão gênica de mRNAs envolvidos com o controle da infecção e modulação do metabolismo de ferro (**Fig. 8**). Para essa análise foram utilizados animais de ambos os sexos (machos e fêmeas) com o intuito de aumentar o número experimental por grupo. No entanto, este fator não foi um viés em nossos experimentos, visto que não observamos diferença entre os sexos quando avaliamos a carga bacteriana pulmonar (**Fig. 8A**). Independentemente deste fator, não observamos diferença no número de bactérias recuperadas dos pulmões de animais de ambos os grupos (**Fig. 8A**). Da mesma maneira, não foram detectadas diferenças no número total das populações de células mielóides: macrófagos alveolares (**Fig. 8B**); eosinófilos (**Fig. 8C**); neutrófilos (**Fig. 8D**) e

4.7. Figura 8. Análise fenotípica e quantificação bacteriana pulmonar de camundongos WT e FPN LyzM⁺ infectados com alta dose de Mtb.



Camundongos WT e FPN LyzM⁺ foram infectados com uma alta dose (1000 CFU) de Mtb H37Rv mCherry e eutanasiados 4 spi para análise. Carga bacteriana em homogenatos de pulmão (**A**). Quantificação do número total de células mielóides: macrófagos alveolares (**B**), eosinófilos (**C**), neutrófilos (**D**) e macrófagos intersticiais (**E**); a estratégia de *gate* pode ser encontrada no **Apêndice B**. Expressão de HO-1 (**F**, **G**, **H**, **I**) e iNOS (**J**, **K**) em macrófagos alveolares e intersticiais. Quantificação do número total de linfócitos CD4 (**L**) e CD8 (**Q**), bem como a frequência total de linfócitos ativados (**M**, **N**); a estratégia de *gate* pode ser encontrada no **Apêndice D**. Frequência de subpopulações de linfócitos: Tbet (**O**, **S**), RORγt (**N**) e FOXP3 (**P**). Quantificação de morte celular total por citometria de fluxo (**T**). Quantificação relativa de mRNA de FTH (**U**), TNFα (**V**), IFNγ (**W**) e IL-1β (**X**). Análise estatística: teste t de Student. * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; **** = p < 0.0001.

Macrófagos intersticiais (**Fig. 8E**). Similarmente, não encontramos diferença no número de células linfóides: linfócitos T CD4⁺ (**Fig. 8K**) e CD8⁺ (**Fig. 8P**). Diversos trabalhos comprovaram a associação do aumento de HO-1 e ferro com a diminuição de FPN durante a infecção *in vivo* e *in vitro* (ABREU; QUINN; GIRI, 2018; COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021; MA; WU; ZHANG; LIU *et al.*, 2022; MA; FANG; CHEN; WANG *et al.*, 2022; REDDY; CHINTA; SAINI; GLASGOW *et al.*, 2018; WILLEMETZ; BEATTY; RICHER; RUBIO *et al.*, 2017). Entretanto, para nossa surpresa, não encontramos diferença significativa na expressão de HO-1 em macrófagos alveolares (**Fig. 8F**), e macrófagos intersticiais (**Fig. 8G**) ou mesmo dentro de macrófagos intersticiais infectados (**Fig. 8H**). Considerando que nosso modelo de estudo tem como alvo células mielóides, não esperávamos encontrar alterações nas populações de células linfóides durante a infecção. De fato, não observamos diferença no número total de linfócitos T CD4⁺ (**Fig. 8K**) e CD8 (**Fig. 8P**) totais, bem como nas frequências de suas subpopulações: T CD4⁺ ativadas (**Fig. 8L**), T CD4⁺ FOXP3 (**Fig. 8O**), T CD4⁺ ativadas RORγt⁺ (**Fig. 8M**) e T CD4⁺ ativadas Tbet⁺ (**Fig. 8N**); bem como T CD8⁺ ativadas (**Fig. 8Q**) e T CD8⁺ ativadas Tbet⁺ (**Fig. 8R**). Curiosamente notamos um aumento significativo na expressão de iNOS em macrófagos intersticiais (**Fig. 8I**), bem como em macrófagos intersticiais infectados com *Mtb* (**Fig. 8J**) em animais FPN LyzM⁺, em comparação ao grupo WT. Em concordância com os dados de carga bacteriana pulmonar (**Fig. 8A**), observamos uma redução sutil na morte celular nos infiltrado inflamatório pulmonar de animais FPN LyzM⁺ em comparação ao grupo WT (**Fig. 8S**). Os dados de expressão gênica quantificados por PCR em tempo real demonstram que não houve diferença significativa na expressão de FTH (**Fig. 8T**), TNFα (**Fig. 8U**), IFNγ (**Fig. 8V**) ou IL-1β (**Fig. 8W**). Em resumo, esses resultados podem sugerir que a possível redução na morte celular esteja associada à sutil redução na carga bacteriana em animais FPN LyzM⁺, causada pelo aumento de iNOS. Embora não tenhamos de fato quantificado os níveis de ferro citoplasmático em macrófagos do infiltrado pulmonar de camundongos de ambos os grupos, nossa hipótese era a de que a deleção de FPN induziria acúmulo de ferro e, sendo assim, diminuição da expressão de iNOS, conforme demonstrado anteriormente, *in vitro*, por nosso grupo (COSTA; AMARAL; NAMASIVAYAM; MITTEREDER *et al.*, 2021). Adicionalmente, também havíamos hipotetizado que a deleção de FPN em macrófagos poderia resultar em maior indução de morte celular por ferroptose dessas células nos pulmões de animais infectados, promovendo maior suscetibilidade à

infecção. Entretanto, os resultados iniciais obtidos em nossos experimentos in vivo não dão suporte a estas hipóteses, embora os resultados obtidos com a infecção de macrófagos in vitro sejam compatíveis com a mesma.

É possível, porém, que o tempo pós-infecção escolhido para avaliação dos parâmetros quantificados in vivo não seja o ideal para esta análise, e eventuais diferenças possam se tornar presentes ou serem melhor evidenciadas em pontos mais crônicos da infecção in vivo. Adicionalmente, também é possível que animais sujeitos a uma dieta com doses regulares de ferro não apresentem aumento significativo dos níveis intracelulares de ferro em macrófagos pulmonares, sendo necessário um maior consumo do nutriente para que este fenômeno ocorra. Por fim, embora não tenhamos realizado análises nos baços e fígados destes animais, é possível que, devido ao importante papel desempenhado por estes órgãos no metabolismo sistêmico de ferro, a deficiência de FPN em macrófagos possa favorecer a disseminação bacteriana para estes sítios, uma vez que já é descrito que camundongos FPN *LyzM*⁺ desenvolvem acúmulo de ferro em macrófagos esplênicos e hepáticos (DONOVAN; LIMA; PINKUS; PINKUS *et al.*, 2005; WINN; WOLF; COTTAM; BHANOT *et al.*, 2021; ZHANG; ZHANG; AN; GUO *et al.*, 2011), mesmo sob uma dieta com doses regulares de ferro, macrófagos de órgãos com, como baço e fígado, os quais não foram analisados em nossos experimentos. Sendo assim, são necessários experimentos adicionais para caracterizar de maneira mais completa o papel da expressão de FPN em macrófagos durante a infecção por *Mtb* in vivo.

5. Conclusão

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que, *in vitro*, a infecção por *Mtb* induz aumento da expressão de FPN em células macrófagos em ambiente rico em ferro. Adicionalmente, eles sugerem que a indução da expressão de FPN em macrófagos em resposta à infecção por *Mtb* tem um papel protetor para a célula do hospedeiro, resultando em melhor controle da replicação bacteriana, que está associado a uma menor indução de morte celular necrótica. Embora o mesmo efeito não tenha sido observado em experimentos *in vivo*, análises adicionais incluindo avaliação de pontos mais crônicos da infecção pulmonar com a inclusão de estudos de disseminação bacteriana para baço e fígado em animais submetidos a dietas ricas ou pobres em ferro são necessários para uma caracterização funcional adequada do papel desempenhado pela FPN em macrófagos durante a infecção *in vivo* por *Mtb*. Em conjunto, uma melhor compreensão do papel deste receptor durante a TB experimental pode identificar possíveis novos alvos para o desenvolvimento de terapias direcionadas ao hospedeiro para o tratamento da TB.

Referências

- ABREU, R.; ESSLER, L.; LOY, A.; QUINN, F. *et al.* Heparin inhibits intracellular Mycobacterium tuberculosis bacterial replication by reducing iron levels in human macrophages. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 7296, May 8 2018.
- ABREU, R.; QUINN, F.; GIRI, P. K. Role of the hepcidin-ferroportin axis in pathogen-mediated intracellular iron sequestration in human phagocytic cells. **Blood Adv**, 2, n. 10, p. 1089-1100, May 22 2018.
- ADANKWAH, E.; NAUSCH, N.; MINADZI, D.; ABASS, M. K. *et al.* Interleukin-6 and Mycobacterium tuberculosis dormancy antigens improve diagnosis of tuberculosis. **J Infect**, 82, n. 2, p. 245-252, Feb 2021.
- ALAM, Z.; DEVALARAJA, S.; LI, M.; TO, T. K. J. *et al.* Counter Regulation of Spic by NF-kappaB and STAT Signaling Controls Inflammation and Iron Metabolism in Macrophages. **Cell Rep**, 31, n. 13, p. 107825, Jun 30 2020.
- AMARAL, E. P.; COSTA, D. L.; NAMASIVAYAM, S.; RITEAU, N. *et al.* A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis. **J Exp Med**, 216, n. 3, p. 556-570, Mar 4 2019.
- AMARAL, E. P.; FOREMAN, T. W.; NAMASIVAYAM, S.; HILLIGAN, K. L. *et al.* GPX4 regulates cellular necrosis and host resistance in Mycobacterium tuberculosis infection. **J Exp Med**, 219, n. 11, Nov 7 2022.
- ANDREWS, N. C. Forging a field: the golden age of iron biology. **Blood**, 112, n. 2, p. 219-230, Jul 15 2008.
- ARMITAGE, A. E.; EDDOWES, L. A.; GILEADI, U.; COLE, S. *et al.* Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. **Blood**, 118, n. 15, p. 4129-4139, Oct 13 2011.
- ASPERTI, M.; GRZYK, M.; BRILLI, E.; CASTAGNA, A. *et al.* Sucrosomial((R)) Iron Supplementation in Mice: Effects on Blood Parameters, Hepcidin, and Inflammation. **Nutrients**, 10, n. 10, Sep 21 2018.
- BOELAERT, J. R.; VANDECASTEELE, S. J.; APPELBERG, R.; GORDEUK, V. R. The effect of the host's iron status on tuberculosis. **J Infect Dis**, 195, n. 12, p. 1745-1753, Jun 15 2007.
- CASSAT, J. E.; SKAAR, E. P. Iron in infection and immunity. **Cell Host Microbe**, 13, n. 5, p. 509-519, May 15 2013.
- CHAO, A.; SIEMINSKI, P. J.; OWENS, C. P.; GOULDING, C. W. Iron Acquisition in Mycobacterium tuberculosis. **Chem Rev**, 119, n. 2, p. 1193-1220, Jan 23 2019.
- COOPER, A. M.; SOLACHE, A.; KHADER, S. A. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. **Curr Opin Immunol**, 19, n. 4, p. 441-447, Aug 2007.
- COSTA, D. L.; AMARAL, E. P.; NAMASIVAYAM, S.; MITTEREDER, L. R. *et al.* Heme oxygenase-1 inhibition promotes IFN γ - and NOS2-mediated control of Mycobacterium tuberculosis infection. **Mucosal Immunol**, 14, n. 1, p. 253-266, Jan 2021.
- DE OLIVEIRA, J.; DENADAI, M. B.; COSTA, D. L. Crosstalk between Heme Oxygenase-1 and Iron Metabolism in Macrophages: Implications for the Modulation of Inflammation and Immunity. **Antioxidants (Basel)**, 11, n. 5, Apr 27 2022.

- DONOVAN, A.; LIMA, C. A.; PINKUS, J. L.; PINKUS, G. S. *et al.* The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. **Cell Metab**, 1, n. 3, p. 191-200, Mar 2005.
- DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. **Semin Immunopathol**, 38, n. 2, p. 153-166, Mar 2016.
- ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, 12, n. 8, p. 581-591, Jul 13 2012.
- GANZ, T. Macrophages and Iron Metabolism. **Microbiol Spectr**, 4, n. 5, Oct 2016.
- GANZ, T.; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 8, p. 500-510, Aug 2015.
- GAUTAM, U. S.; MEHRA, S.; AHSAN, M. H.; ALVAREZ, X. *et al.* Role of TNF in the altered interaction of dormant Mycobacterium tuberculosis with host macrophages. **PLoS One**, 9, n. 4, p. e95220, 2014.
- GORDEUK, V. R.; MCLAREN, C. E.; MACPHAIL, A. P.; DEICHSEL, G. *et al.* Associations of iron overload in Africa with hepatocellular carcinoma and tuberculosis: Strachan's 1929 thesis revisited. **Blood**, 87, n. 8, p. 3470-3476, Apr 15 1996.
- HAWN, T. R.; SHAH, J. A.; KALMAN, D. New tricks for old dogs: countering antibiotic resistance in tuberculosis with host-directed therapeutics. **Immunol Rev**, 264, n. 1, p. 344-362, Mar 2015.
- KAYAGAKI, N.; KORNFELD, O. S.; LEE, B. L.; STOWE, I. B. *et al.* NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. **Nature**, 591, n. 7848, p. 131-136, Mar 2021.
- KIKUCHI, G.; YOSHIDA, T. Heme Degradation by the Microsomal Heme Oxygenase System. **Trends in Biochemical Sciences**, 5, n. 12, p. 323-325, 1980.
- KIM, D. K.; JEONG, J. H.; LEE, J. M.; KIM, K. S. *et al.* Inverse agonist of estrogen-related receptor gamma controls Salmonella typhimurium infection by modulating host iron homeostasis. **Nat Med**, 20, n. 4, p. 419-424, Apr 2014.
- KIM, H.; KIM, M.; IM, S. K.; FANG, S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. **Lab Anim Res**, 34, n. 4, p. 147-159, Dec 2018.
- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, 2018, n. 6, Jun 1 2018.
- LIN, P. L.; FLYNN, J. L. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. **Semin Immunopathol**, 37, n. 3, p. 239-249, May 2015.
- LOUNIS, N.; TRUFFOT-PERNOT, C.; GROSSET, J.; GORDEUK, V. R. *et al.* Iron and Mycobacterium tuberculosis infection. **J Clin Virol**, 20, n. 3, p. 123-126, Feb 2001.
- MA, C.; WU, X.; ZHANG, X.; LIU, X. *et al.* Heme oxygenase-1 modulates ferroptosis by fine-tuning levels of intracellular iron and reactive oxygen species of macrophages in response to Bacillus Calmette-Guerin infection. **Front Cell Infect Microbiol**, 12, p. 1004148, 2022.

- MA, R.; FANG, L.; CHEN, L.; WANG, X. *et al.* Ferroptotic stress promotes macrophages against intracellular bacteria. **Theranostics**, 12, n. 5, p. 2266-2289, 2022.
- MA, X. TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes Infect**, 3, n. 2, p. 121-129, Feb 2001.
- MAYER-BARBER, K. D.; BARBER, D. L. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 5, n. 12, Jul 17 2015.
- MICHELS, K.; NEMETH, E.; GANZ, T.; MEHRAD, B. Hepcidin and Host Defense against Infectious Diseases. **PLoS Pathog**, 11, n. 8, p. e1004998, Aug 2015.
- MITRA, A.; KO, Y. H.; CINGOLANI, G.; NIEDERWEIS, M. Heme and hemoglobin utilization by Mycobacterium tuberculosis. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 4260, Sep 18 2019.
- NAMGALADZE, D.; FUHRMANN, D. C.; BRUNE, B. Interplay of Nrf2 and BACH1 in inducing ferroportin expression and enhancing resistance of human macrophages towards ferroptosis. **Cell Death Discov**, 8, n. 1, p. 327, Jul 19 2022.
- NUNEZ, G.; SAKAMOTO, K.; SOARES, M. P. Innate Nutritional Immunity. **J Immunol**, 201, n. 1, p. 11-18, Jul 1 2018.
- OTTERBEIN, L. E.; SOARES, M. P.; YAMASHITA, K.; BACH, F. H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends Immunol**, 24, n. 8, p. 449-455, Aug 2003.
- PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annu Rev Pathol**, 7, p. 353-384, 2012.
- PHILPOTT, C. C.; JADHAV, S. The ins and outs of iron: Escorting iron through the mammalian cytosol. **Free Radic Biol Med**, 133, p. 112-117, Mar 2019.
- REDDY, V. P.; CHINTA, K. C.; SAINI, V.; GLASGOW, J. N. *et al.* Ferritin H Deficiency in Myeloid Compartments Dysregulates Host Energy Metabolism and Increases Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis Infection. **Front Immunol**, 9, p. 860, 2018.
- RIEDELBERGER, M.; PENNINGER, P.; TSCHERNER, M.; SEIFERT, M. *et al.* Type I Interferon Response Dysregulates Host Iron Homeostasis and Enhances Candida glabrata Infection. **Cell Host Microbe**, 27, n. 3, p. 454-466 e458, Mar 11 2020.
- ROCHETTE, L.; GUDJONCIK, A.; GUENANCIA, C.; ZELLER, M. *et al.* The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target? **Pharmacol Ther**, 146, p. 35-52, Feb 2015.
- ROCKWOOD, N.; COSTA, D. L.; AMARAL, E. P.; DU BRUYN, E. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Induction of Heme Oxygenase-1 Expression Is Dependent on Oxidative Stress and Reflects Treatment Outcomes. **Front Immunol**, 8, p. 542, 2017.
- ROSS, S. L.; BISWAS, K.; ROTTMAN, J.; ALLEN, J. R. *et al.* Identification of Antibody and Small Molecule Antagonists of Ferroportin-Hepcidin Interaction. **Front Pharmacol**, 8, p. 838, 2017.

- SAIGA, H.; SHIMADA, Y.; TAKEDA, K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. **Clin Dev Immunol**, 2011, p. 347594, 2011.
- SHE, H.; XIONG, S.; LIN, M.; ZANDI, E. *et al.* Iron activates NF-kappaB in Kupffer cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 283, n. 3, p. G719-726, Sep 2002.
- SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. **Microbiol Spectr**, 7, n. 4, Jul 2019.
- SOARES, M. P.; BACH, F. H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. **Trends Mol Med**, 15, n. 2, p. 50-58, Feb 2009.
- SOARES, M. P.; HAMZA, I. Macrophages and Iron Metabolism. **Immunity**, 44, n. 3, p. 492-504, Mar 15 2016.
- STOCKWELL, B. R.; FRIEDMANN ANGELI, J. P.; BAYIR, H.; BUSH, A. I. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, 171, n. 2, p. 273-285, Oct 5 2017.
- SUKHBAATAR, N.; WEICHHART, T. Iron Regulation: Macrophages in Control. **Pharmaceuticals (Basel)**, 11, n. 4, Dec 14 2018.
- VERMA, S.; CHERAYIL, B. J. Iron and inflammation - the gut reaction. **Metallomics**, 9, n. 2, p. 101-111, Feb 22 2017.
- VIVEKANANDAN, M. M.; ADANKWAH, E.; ANIAGYEI, W.; ACHEAMPONG, I. *et al.* Plasma cytokine levels characterize disease pathogenesis and treatment response in tuberculosis patients. **Infection**, 51, n. 1, p. 169-179, Feb 2023.
- WEISS, G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Haematol**, 18, n. 2, p. 183-201, Jun 2005.
- WHO. **Global Tuberculosis Report 2021**. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2021.
- WILLEMETZ, A.; BEATTY, S.; RICHER, E.; RUBIO, A. *et al.* Iron- and Hepcidin-Independent Downregulation of the Iron Exporter Ferroportin in Macrophages during Salmonella Infection. **Front Immunol**, 8, p. 498, 2017.
- WINN, N. C.; WOLF, E. M.; COTTAM, M. A.; BHANOT, M. *et al.* Myeloid-specific deletion of ferroportin impairs macrophage bioenergetics but is disconnected from systemic insulin action in adult mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 321, n. 3, p. E376-E391, Sep 1 2021.
- WU, X.; LI, Y.; ZHANG, S.; ZHOU, X. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease. **Theranostics**, 11, n. 7, p. 3052-3059, 2021.
- YANG, S.; OUYANG, J.; LU, Y.; HARYPURSAT, V. *et al.* A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Tuberculosis. **Front Immunol**, 13, p. 842858, 2022.
- ZHANG, Z.; ZHANG, F.; AN, P.; GUO, X. *et al.* Ferroportin1 deficiency in mouse macrophages impairs iron homeostasis and inflammatory responses. **Blood**, 118, n. 7, p. 1912-1922, Aug 18 2011.

Apêndice (s)

APÊNDICE A – Estratégia de *gate* de BMDM

R1 – Células

G1 – Células mortas

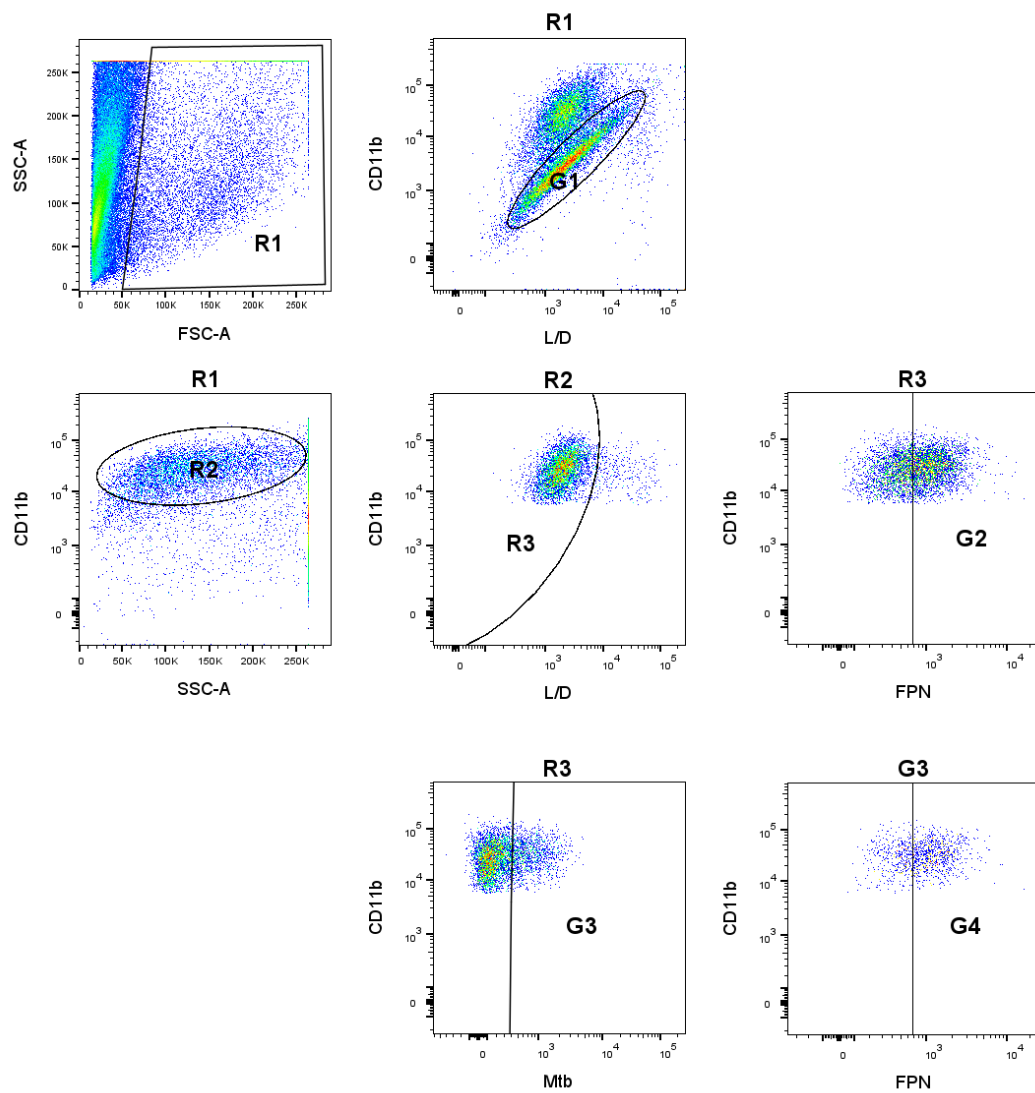
R2 – Macrófagos CD11b⁺

R3 – Macrófagos vivos

G2 – FPN total

G3 – Macrófagos infectados

G4 – Macrófagos infectados FPN⁺



APÊNDICE B – Estratégia de *gate* de células mielóides de animais C57BL/6, WT e FPN LyzM⁺

R1 – *Single cells*

R2 – Células vivas

R3 – Células infectadas

G1 – Morte celular

R4 – Leucócitos

G2 – Macrófagos alveolares

G3 – Macrófagos alveolares infectados

G4 – Eosinófilos

G5 – Neutrófilos

R5 – Neutrófilo parenquimal

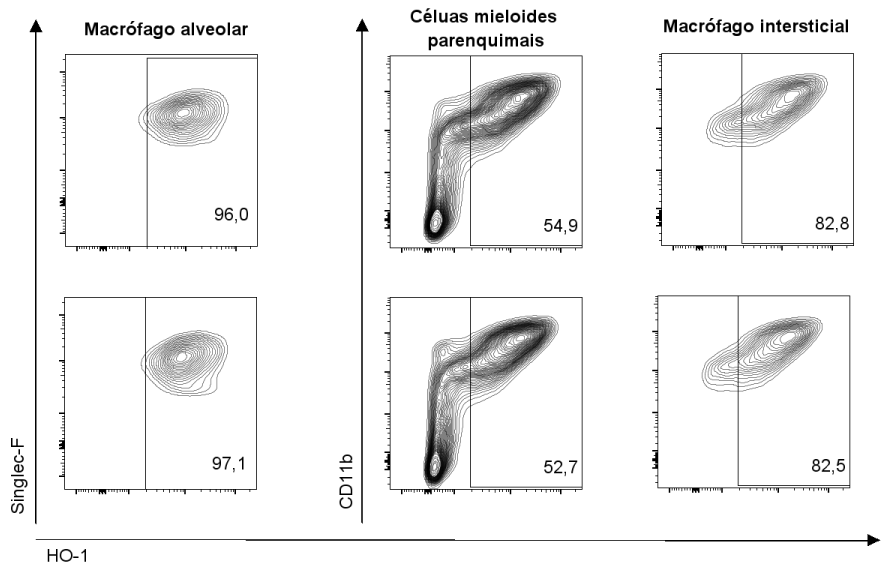
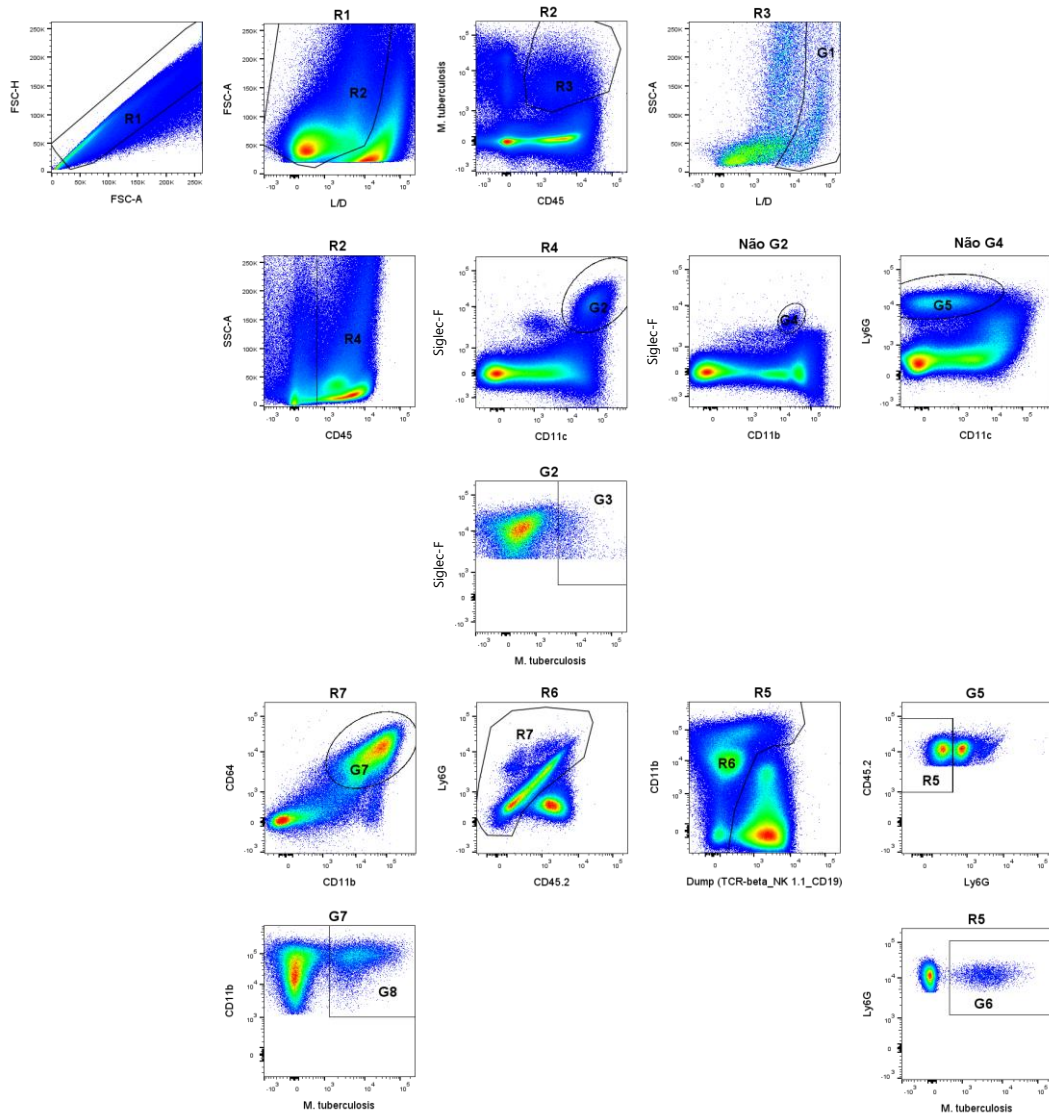
G6 – Neutrófilo parênquimal infectado

R6 – Células mielóides

R7 – Células mielóides parenquimais

G7 – Macrófagos/macrófagos ativados

G8 - Macrófagos infectados



APÊNDICE C – Estratégia de *gate* de células mielóides de animais dTomato LyzM Cre⁺

R1 – Células vivas

R2 – *Siglec* cells

R3 – Macrófagos alveolares

R4 – Eosinófilos

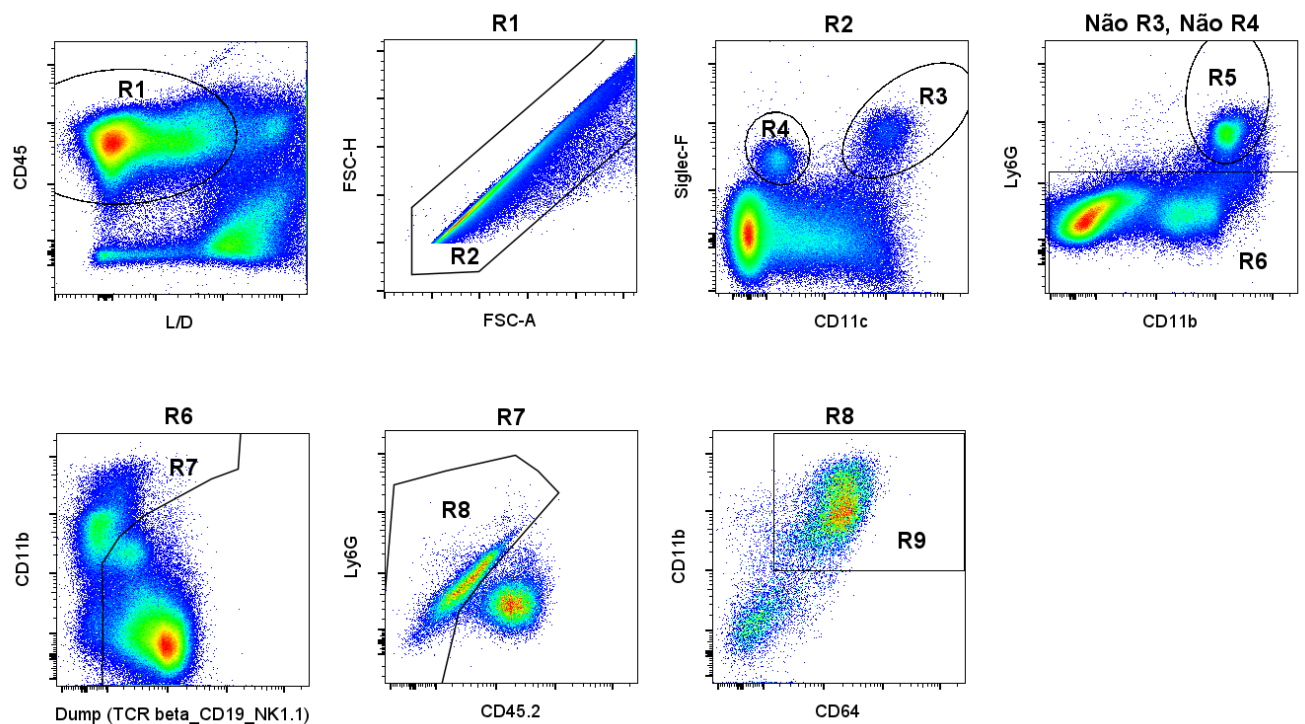
R5 – Neutrófilo

R6 – Não *gate* de neutrófilos

R7 – Células mielóides

R8 – Células mielóides parenquimais

R9 – Macrófagos parenquimais



APÊNDICE D – Estratégia de *gate* de células linfoides de animais WT e FPN LyzM⁺

R1 – *Single cells*

R2 – Células vivas

R3 – Células T CD4

R4 – Células T CD4 parenquimais

G1 – FOXP3

R5 – Linfócitos CD4 ativados

G2 – ROR γ t

G3 – Tbet

R6 – Células T CD8

R7 – Células T CD8 parenquimais

R8 – Linfócitos CD8 ativados

G3 - Tbet

