

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE
RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**“Identificação de fatores inerentes aos macrófagos pulmonares e
hepáticos associados à capacidade de eliminação de *Mycobacterium
tuberculosis*”**

PRISCILLA MARIANE CARDOSO SILVA

**Monografia apresentada ao Departamento de
Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para a obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**Ribeirão Preto – SP
2014**

PRISCILLA MARIANE CARDOSO SILVA

“Identificação de fatores inerentes aos macrófagos pulmonares e hepáticos associados à capacidade de eliminação de *Mycobacterium tuberculosis*”

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Dr. Rogério Silva Rosada

**Ribeirão Preto – SP
2014**

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

Silva, Priscilla Mariane Cardoso.

“Identificação de fatores inerentes aos macrófagos pulmonares e hepáticos associados à capacidade de eliminação de *Mycobacterium tuberculosis*”. Ribeirão Preto, 2014.

78p. : il ; 30cm

Monografia, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Rogério Silva Rosada.

1. *Mycobacterium tuberculosis* 2. Fígado 3. Macrófagos 4. Células de Kupffer 5. Polarização

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Centro nacional de desenvolvimento científico e tecnológico CNPq
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

*Aos meus pais Lázaro e Jorgina, e à
minha irmã Victória.*

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Rogério Silva Rosada, pela oportunidade de estudar e aprender cada vez mais sobre esse tema. Agradeço também pela confiança, amizade, paciência e por muito me ensinar.

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva por possibilitar que este trabalho fosse desenvolvido junto a um excelente grupo de pesquisa.

A Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz que me indicou para esse projeto, contribuindo muitas vezes de forma direta ou indireta para a construção do mesmo.

As especialistas do laboratório Ana Paula Masson e Soares, Izaíra Tincane Brandão e Wendy Martin Rios, bem como ao meu colega de laboratório, Rodrigo, que sempre estiveram ao meu lado, ajudando e participando do meu crescimento profissional, vocês são exemplos de competência e pretendo preservar essa amizade durante toda a vida.

Aos meus amigos da Bio48, os persistentes e aqueles que desistiram, mas que de alguma forma estiveram comigo durante a graduação, transmitindo novas perspectivas e experiências. Principalmente Ana Maria Raymundi, Felipe André Silva, Juliana Murarolli Paixão, pela eterna companhia, paciência e risadas, podemos não continuar juntos, mas todos os momentos serão lembrados com imenso carinho e saudade.

Ao meu namorado Lucas, que sempre esteve presente ao longo desse caminho, dividindo os sonhos e as realidades, somando os ensinamentos proporcionados pela pesquisa, multiplicando as alegrias e subtraindo as preocupações e tristezas do caminho.

Aos meus pais Jorgina e Lázaro e a minha irmã Victória por me acompanharem desde o início nessa trajetória que escolhi, me apoiando e incentivando, sempre com uma grande atenção e amor.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

SILVA, P. M. C. “**Identificação de fatores inerentes aos macrófagos pulmonares e hepáticos associados à capacidade de eliminação de *Mycobacterium tuberculosis***”. 2014, 78f. Monografia – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

A tuberculose (TB) ainda é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. Está intimamente ligada à pobreza e à má distribuição de renda, além do estigma que implica na não adesão dos portadores e/ou familiares/contactantes. Segundo estimativas da OMS, um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e corre o risco de desenvolver a doença. Estes fatos acarretam em novos desafios para a comunidade científica no que se refere ao desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas para o controle da TB. O entendimento detalhado da participação e relevância dos diferentes elementos da resposta imune são necessários para alcançar tal objetivo. Nesse sentido, há casos clínicos em que quando a resposta imune não é eficaz em conter a disseminação do bacilo no pulmão, a infecção por Mtb pode se disseminar para outros órgãos, sendo classificada como TB extrapulmonar. Nessa conjuntura o fígado é um dos últimos órgãos a contrair a infecção muito embora receba um grande aporte sanguíneo. Por outro lado, sabe-se que a resposta imune no fígado é bastante eficaz contra uma variedade de patógenos, sendo o macrófago presente neste órgão (célula de Kupffer) um dos principais responsáveis por esse resultado. Considerando esse cenário, este trabalho visou elaborar métodos de separação celular, bem como comparar o comportamento do conjunto celular desses dois órgãos, pulmão e fígado, frente a infecção por Mtb. A extrapolação de um protocolo de isolamento de células de Kupffer para as células pulmonares garantiu o estabelecimento de uma nova metodologia, através de uma cultura mista de células pulmonares, capaz de garantir um excelente grau de pureza de macrófagos pulmonares. Como o referido protocolo produziu baixo rendimento e, visando avaliar a participação das células totais frente a infecção por Mtb, foram utilizadas células dos órgãos pulmão e fígado provenientes de camundongos não infectados. Essas células foram estimuladas com fatores pró ou anti-inflamatórios e posteriormente infectadas com Mtb, sendo avaliadas a capacidade fagocítica e microbicida das mesmas. Estes ensaios mostraram que a estimulação M1 (IFN- γ + LPS) ou M2 (IL-4 + IL-10) resultaram em maior capacidade fagocítica pelas células do fígado, o que não ocorreu para as células do pulmão. Por outro lado, enquanto predominantemente a estimulação por M2 potencializou a atividade microbicida pelas células do fígado, a estimulação por M1 prejudicou essa função. O resultado do presente trabalho adiciona achados que complementam a literatura vigente na qual o fígado, considerado um órgão predominantemente tolerogênico, é associado com uma alta capacidade de eliminação de diferentes patógenos (clearance).

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Fígado; Macrófagos.

ABSTRACT

SILVA, P. M. C. “**Identification of factors inherent to the lung and liver macrophages associated with the disposal capacity of *Mycobacterium tuberculosis***”. 2014, 78. Monograph - School of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Tuberculosis (TB) remains a serious public health problem with deep social roots being closely linked to poverty and unequal income distribution, beyond the stigma that implies the non-adherence of patients and / or family / contacts. According to WHO estimates, one third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and are under risk to develop the disease. These factors implies in new challenges for the scientific community, regarding the development of prophylactic and therapeutic measures to control TB. The detailed understanding of the role and the relevance of the different elements of the immune response are needed to achieve such objective. In this sense, there are clinical cases whose the immune response is not effective in containing the spread of the bacillus in the lung, and then the Mtb infection can spread to other organs. Such cases are classified as extrapulmonary TB. In this context the liver is one of the last organs to be infected, although receives a large blood supply. On the other side, it is well known that the immune response in the liver is highly effective against a variety of microorganisms. The resident macrophage in this organ (Kupffer cells) is one of the main responsible for this result. Considering this scenario, the goal of this work is develop methods for cell separation as well as to compare the behavior of the both cells, lung and liver, challenged with Mtb infection. Extrapolation of a protocol for isolation of Kupffer cells to the lung cells ensured the establishment of a new methodology, using a mixed culture of lung cells, guaranteeing a great purity of pulmonary macrophages. Since the protocol produced low yield, and to evaluate the contribution of total cells against Mtb infection, cells of the lung and liver organs from uninfected mice were used. These cells were stimulated with pro or anti-inflammatory factors and subsequently infected with Mtb and evaluated the phagocytic capacity and microbicidal activity of those cells. These assays showed that M1 (IFN- γ + LPS) or M2 (IL-4 + IL-10) stimulation resulted in increased phagocytic capacity by the liver cells, which did not occur to lung cells. Moreover, while predominantly the M2 stimulation potentiated the microbicidal activity by liver cells, the M1 stimulation impaired this activity. The result of the present work add findings to complement the existing literature in which the liver, considered predominantly a tolerogenic organ, is associated with a high-capacity elimination of different pathogens (clearance).

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Liver; Macrophage.

LISTA DE ABREVIATURAS

A.C	Antes de cristo
ACK	Tampão de Lise Cloreto de Amônio
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CPT	Centro de Pesquisa em Tuberculose
CR3	Receptor de complemento tipo 3
CO ₂	Dióxido de carbono
Células NK	Células Natural Killer
DC	Célula dendrítica
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Short-course</i>
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HSC	Célula hepática estelada
IFN- γ	Interferon gama
(IL)-4	(Interleucina) 4
KC	Células de kupffer
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolissacarídeo
LSEC	Célula endotelial sinusoidal
MDR	Cepas multi drogas resistentes
MHC	Complexo gênico de histocompatibilidade
MOI	Multiplicidade de infecção
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Polarização de macrófagos para respostas do tipo 1
M2	Polarização de macrófagos para respostas do tipo 2

NF-kB	Fator nuclear kappa B
NOD2 receptor-2	Domínio de ligação de nucleotídeos e oligomerização como
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	<i>Tampão</i> fosfato-salino
ROIs	Intermediários reativos de oxigênio
RPMI	Meios Roswell Park Memorial Institute
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose – multi drogas resistente
TB-XDR	Tuberculose - extensivamente drogas resistente
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Th1	Polarização das células T para respostas do tipo 1
Th2	Polarização das células T para respostas do tipo 2

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
G	Força centrífuga
L	Litros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
µg	Micrograma
µL	Microlitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Mycobacterium tuberculosis.....	1
1.2. Epidemiologia da tuberculose.....	2
1.3. Patologia da tuberculose.....	5
1.4. Imunopatologia da TB.....	6
1.4.1. Dinâmica dos macrófagos.....	7
1.5. A tuberculose no fígado.....	9
2. Objetivos.....	13
3. Metodologia.....	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Metodologia	14
Metodologia relacionada aos experimentos de isolamento celular – Parte I	
3.2.1. Eutanásia, operação, perfusão e remoção dos órgãos.....	14
3.2.2. Isolamento celular.....	15
3.2.3. Contagem celular e o plaqueamento.....	15
3.2.4. Preparação para a citometria.....	16
3.2.5. Marcação para a citometria.....	16
3.2.6. Resposta proliferativa a GM-CSF.....	17
3.2.6. Produção de citocinas.....	17
Metodologia relacionada aos experimentos de infecção com m. Tuberculosis – Parte II	
3.3. Obtenção celular.....	19
3.3.1. Tratamento das células com fatores solúveis pró e anti inflamatório.....	20
3.3.2. Infecção in vitro com M. tuberculosis.....	21
3.3.3. Atividade fagocítica.....	21
3.3.4. Atividade microbicida.....	22
3.3.5. Análises estatísticas.....	22
4. Isolamento dos macrófagos pulmonares e hepáticos (Parte I).....	23
4.1 Isolamento dos macrófagos do fígado.....	23
4.1.1. Acompanhamento do desenvolvimento da cultura mista de células do fígado.....	23
4.1.2. Avaliação dos marcadores de superfície celular.....	26
4.2. Isolamento dos macrófagos pulmonares.....	27
4.2.1. Acompanhamento do desenvolvimento da cultura mista de células do pulmão.....	27

4.2.2. Avaliação dos marcadores de superfície celular.....	31
4.2.3. Aspecto funcional das células isoladas.....	30
4.3 Discussão.....	33
4.4 Conclusão.....	37
5.Comparação do perfil das células provenientes do fígado e pulmão, envolvidos na resolução da infecção por <i>m. Tuberculosis</i> (Parte II).....	38
5.1. Atividade Fagocítica.....	38
5.1.1. Atividade fagocítica das células do fígado.....	39
5.1.2. Atividade fagocítica das células do pulmão.....	40
5.1.3. Comparação da atividade fagocíticas das células de ambos os órgãos.....	41
5.2. Atividade Microbicida.....	42
5.2.1. Atividade microbicida das células do fígado.....	42
5.2.2. Atividade microbicida das células do pulmão.....	43
5.2.3. Comparação da atividade microbicida das células de ambos os órgãos.....	44
5.3. Discussão.....	46
5.4. Conclusão.....	50
6. Referências Bibliográficas.....	51
7. Anexo A.....	58
8. Figuras Suplementares.....	59

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) representado na figura 1, foi isolado por Robert Koch em 1882, e é considerado um bacilo Gram-positivo. Porém, sua parede celular possui características peculiares, sendo composta por 60% de lipídios, incluindo LAM (lipoarabinomanana) e ácidos micólicos (Collins and Kaufmann, 2001) e além disso é seletiva à uma grande quantidade de substâncias, o que o torna um bacilo álcool-ácido resistente. Essa micobactéria é a responsável por causar a tuberculose (TB), uma doença muito antiga que tem acompanhado a humanidade ao longo da sua história. Assim como outras doenças, ao longo da história, apesar de exibir momentos de grandes epidemias e depois de recuo nas taxas de infecção, *Mtb* pode ter matado mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano (Daniel, 2006).

Pode-se supor que o gênero *Mycobacterium* originou-se há mais de 150 milhões de anos. Modernas técnicas de genética molecular e sequenciamento do genoma de várias cepas de *Mtb* permitiram uma estimativa mais rigorosa do tempo de origem das micobactérias. Esta estimativa é facilitada pela baixa taxa de mutação das mesmas. Desta forma, estima-se que um progenitor precoce de *Mtb* estava presente na África Oriental há 3 milhões de anos atrás, e que esses bacilos poderiam ter infectado os primeiros hominídeos naquele tempo (Gutierrez *et al.*, 2005). As linhagens modernas de *Mtb* parecem ter se originado de um ancestral comum a cerca de 20.000 - 15.000 anos atrás (Sreevatsan *et al.*, 1997). Os bacilos que circulam atualmente pertencem a seis grandes linhagens, uma análise baseando-se na taxa de mutação de *Mtb* indica que grande parte da diversidade presente nos dias atuais tiveram origem há aproximadamente 250 - 1000 anos atrás (Hirsh *et al.*, 2004; Gagneux *et al.*, 2006).

Esses dados revelam que desde a antiguidade o bacilo *Mtb*, causador da TB, tem estado presente na população humana. Fragmentos da coluna vertebral de múmias egípcias datadas de 2400 a.C. mostram sinais claros de TB (Zink *et al.*, 2001). A doença exemplifica um caso de co-evolução entre patógeno e hospedeiro (Hershkovitz *et al.*, 2008) e levando-se em

consideração esta mútua adaptação, pode-se compreender o caráter pandêmico da TB e o motivo pelo qual, na maioria dos casos, se manifesta após um grande período de latência. Desta forma, não é comum desenvolver a forma ativa da doença após o contato primário com o bacilo.

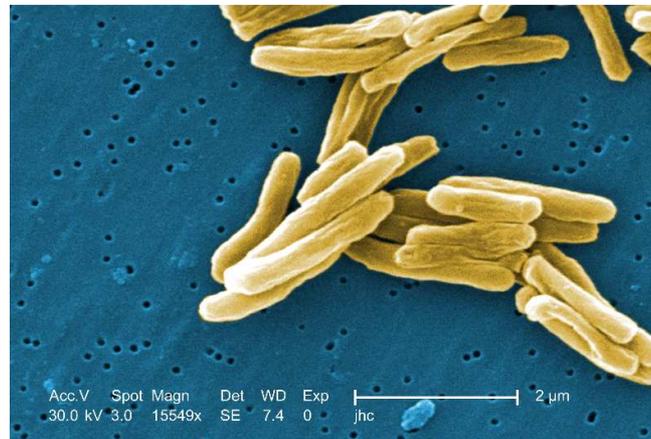


Figura 1. Foto de microscopia eletrônica de varredura do bacilo *Mtb*. (Imagem retirada do Centro de controle e prevenção de doenças, CDC/Dr. Ray Butler, créditos a Janice Haney Carr. <http://www.cdc.gov/media/subtopic/library/diseases.htm>)

1.2. Epidemiologia da tuberculose

A tuberculose ainda é um sério problema de saúde pública, com profundas raízes sociais (Ministério_Da_Saúde, 2013) que está intimamente ligada à má distribuição de renda e aos maus hábitos, que favorecem situações de maior vulnerabilidade, como o alcoolismo e tabagismo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial está infectada pelo Mtb e possui risco de desenvolver a doença (Who, 2008). O último relatório global de TB mostrou que aproximadamente nove milhões de pessoas ficaram doentes e que dois milhões morreram de TB até o ano de 2012. O mapa a baixo mostra a incidência dessa doença pelo mundo (Figura 2).

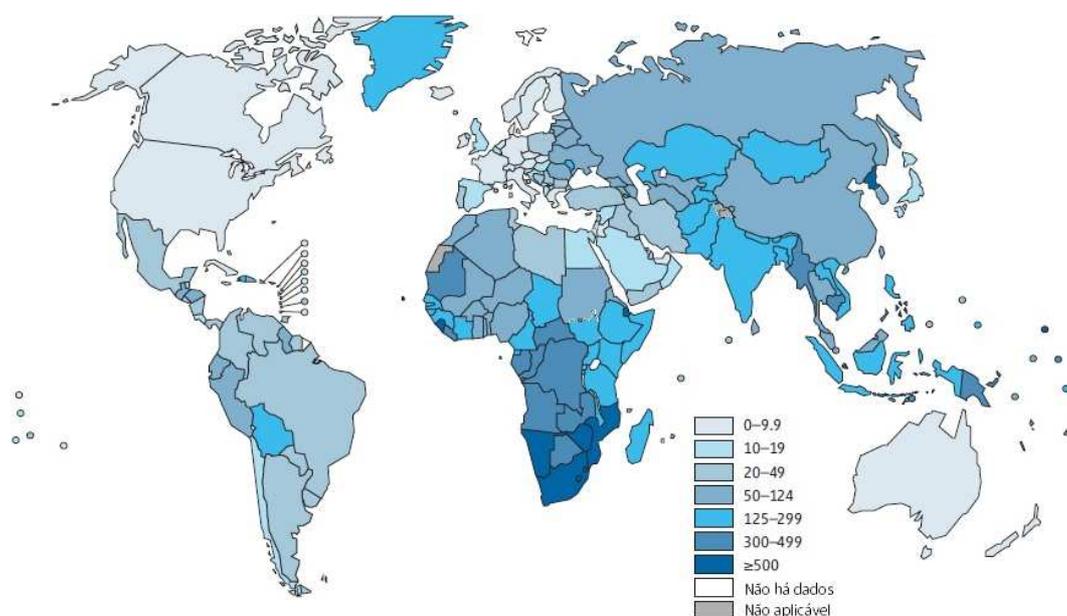


Figura 2. Mapa ilustrando a incidência de casos de tuberculose em 2012. Estimativa do número de novos casos de tuberculose (todas as formas) por 100 mil pessoas (Modificado de Global Tuberculosis Control, 2013. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).

O aumento global da incidência da TB alcançou seu pico em 2004 e foi seguido de uma lenta queda, compensado pelo crescimento da população. O número de casos continua aumentando anualmente, principalmente nas regiões menos desenvolvidas do globo, como África, Mediterrâneo Oriental e Sudeste Asiático. Atualmente, existe uma única vacina contra tuberculose aprovada e disponível para a população. A BCG (Bacilo Calmette-Guérin) é constituída por cepas vivas atenuadas do bacilo *M. bovis* e foi desenvolvida em 1921 por Albert Calmette e Camille Guérin.

Embora essa vacina seja utilizada em muitos países, principalmente em regiões com alto índice de TB, a sua eficiência é parcial. Desta forma a BCG é recomendada pela OMS em áreas de alta prevalência da doença, sendo capaz de prevenir a forma disseminada da TB, bem como outras manifestações da infecção em crianças (Roth *et al.*, 2006; Setia *et al.*, 2006). No entanto, nos adultos, o índice de prevenção da TB pulmonar pela BCG pode variar entre 0% e 80% (Svenson *et al.*, 2010). Existem estudos em andamento para a composição de outras vacinas, baseadas ou não no BCG, mas ainda não há nenhuma que possa substituí-la, ou pelo menos ser utilizada em associação para aumentar a sua eficácia (Barker *et al.*, 2009).

Além da disponibilidade de uma vacina contra a TB, existe também a opção terapêutica clássica composta pelas drogas Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol e Isoniazida. A terapia utilizada em pessoas com TB tem uma longa duração (3 a 6 meses) e pode provocar diversos efeitos colaterais. As dificuldades de acesso às drogas (em algumas localidades), além do abandono da terapia após a melhora inicial do quadro clínico, estão entre os principais fatores que fizeram com que a OMS implantasse um sistema supervisionado de terapia, o DOTS (do inglês *Directly Observed Treatment Short-course*). Essa orientação aumenta a probabilidade de cura dos doentes, pois garante um tratamento assistido. O *Stop TB Partnership* é um sistema internacional que incorporou o DOTS, visando aplicar esse sistema em todo o mundo, aumentando assim o sucesso do tratamento. Essa organização internacional possui diversas metas, sendo elas: eliminar a TB como problema de saúde global, até 2050, além de reduzir as taxas de prevalência e mortalidade da doença em 50% em relação às taxas de 1990, até 2015. Para que esse objetivo seja alcançado, as instituições envolvidas apoiam o desenvolvimento de novas terapias, diagnósticos, novas formas de prevenção, além de projetos sociais (Raviglione, 2006).

O DOTS foi responsável por melhoras na adesão e êxito na terapia contra a TB, no entanto, não evitou que o uso inadequado das drogas contribuísse na seleção de cepas multirresistentes (MDR) (Gandhi *et al.*, 2010). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil nos casos de TB com cepas resistentes o tratamento é prolongado, podendo ocorrer durante 24 meses, e apresentar mais efeitos colaterais. O custo dessa terapia é maior, bem como a sua chance de falhar.

Indicadores epidemiológicos revelaram que em 2012 cerca de 450 000 pessoas desenvolveram a TB multirresistente (TB-MDR) em todo o mundo, e estimou-se que neste mesmo ano cerca de 170 000 pessoas morreram infectadas com essa cepa multirresistente. O surgimento da epidemia de AIDS e o aparecimento de focos de TB multirresistente agravam ainda mais o problema da doença no mundo.

1.3. Patologia da tuberculose

A infecção se inicia por meio da inalação de aerossóis contendo bacilos viáveis por um indivíduo doente durante o espirro, tosse ou a fala. A TB acomete principalmente o trato respiratório inferior, sendo os pulmões o primeiro local de estabelecimento dos bacilos, contudo, podem existir outras formas de TB. A doença pulmonar ativa é caracterizada pela dor no peito, tosse intensa e prolongada por mais de três semanas, com produção de muco com ou sem a presença de sangue (indicativo de estágio avançado). Segundo a Organização Mundial da Saúde, o paciente ainda pode apresentar episódios de febre, perda de apetite, palidez, calafrios, cansaço, suores noturnos e emagrecimento.

A infecção pode permanecer na sua forma latente, tal fato ocorre com aproximadamente 90–95% das pessoas infectadas. Esses pacientes com Infecção latente permanecem assintomáticos e não transmitem o bacilo, no entanto são caracterizados como um reservatório do patógeno. A permanência das altas taxas de incidência e prevalência da TB, pode estar associada à infecção latente, visto que a qualquer momento, um fator que gere um quadro de imunossupressão pode levar à reativação da doença (Kaufmann, 2001).

O estabelecimento da infecção pulmonar depende da interação do patógeno com as células hospedeiras, geralmente os macrófagos alveolares e células dendríticas. Uma vez fagocitado, o microrganismo se estabelece no interior do fagossoma primário dessas células, onde está protegido dos fatores da imunidade humoral e pode manter o seu metabolismo (Korbel *et al.*, 2008). Para escapar da atividade microbicida da célula, o patógeno ativa mecanismos que corrompem a resposta imune. Mtb evita a fusão com o lisossoma e altera o pH endossomal, inibindo assim, a geração de formas ativas de radicais de nitrogênio e de oxigênio, além de diminuir a produção de citocinas inflamatórias (Flynn and Chan, 2003; Nguyen and Pieters, 2005). No entanto, existem outros componentes do sistema imunológico capazes de conter a disseminação do patógeno.

Nos casos em que a infecção assume um caráter latente, o bacilo Mtb induz a formação de uma reação inflamatória típica, onde há o acúmulo de células inflamatórias e da imunidade adaptativa ao redor do microrganismo,

iniciando a formação de granulomas, fenômeno coordenado principalmente por linfócitos T CD4+ ativados. A formação do granuloma no foco da infecção é um dos aspectos clínicos utilizados no diagnóstico da TB pulmonar (Hernandez-Pando *et al.*, 1997; Flynn and Ernst, 2000; Collins and Kaufmann, 2001). O granuloma, posteriormente, é envolto em fibras colágenas produzidas por fibroblastos, tal sistema pode restringir a disseminação dos bacilos por um longo tempo. No ambiente hostil com baixos níveis de oxigênio e de nutrientes, *Mtb* diminui seu metabolismo, caracterizando a fase de latência da infecção (Dheda *et al.*, 2005).

Assim, a interação da *Mtb* com as células do sistema imunológico estabelece uma rede de ativação e inibição de mecanismos cujos componentes ainda não estão totalmente estabelecidos em maiores detalhes.

1.4. Imunopatologia da TB

Os bacilos que chegam aos alvéolos são fagocitados por macrófagos e células dendríticas, o que é facilitado por interações do patógeno com diversos receptores. As células reconhecem os PAMP's (Pathogen-Associated Molecular Patterns) através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR). Além dos PRRs, outros receptores do sistema imune, como o CR3 (*Complement Receptor 3*), facilitam a entrada do bacilo na célula hospedeira, quando este está revestido por proteínas do Sistema Complemento, sem ocorrer a ativação da maquinaria responsável pela produção de ROS (*Reactive Oxygen Species*), que possuem atividade bactericida (Tailleux *et al.*, 2003).

O tipo de interação do bacilo com determinado repertório celular pode determinar o tipo de resposta subsequente. Os receptores do tipo DC-SIGN presentes nos macrófagos e nas células dendríticas, quando em contato com os PAMPs de *Mtb*, por exemplo a lipoarabinomana, podem induzir a produção da interleucina 10. A IL-10 é capaz de inibir a resposta imune do tipo 1 (Th1), a qual é de suma importância para a eliminação do patógeno, favorecendo assim a sobrevivência do mesmo (Kaufmann and Schaible, 2003; Neyrolles *et al.*, 2006). Por outro lado, o reconhecimento de PAMP's por meio dos receptores do tipo Toll (TLR - Toll-like receptors) promove a dimerização das suas porções citosólicas e recrutamento de uma série de moléculas adaptadoras, que atuam

em uma cascata de fosforilação no interior celular. O Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) está associado a um Inibidor de Kappa B (I κ B α) que deverá ser fosforilada para a liberação do NF- κ B. Este por sua vez desloca-se até o núcleo, para iniciar a tradução de sinais pró-inflamatórios, como o IL-12 e TNF (Tumoral Necrosis Factor) que contribuirão para ativar os macrófagos e torná-los aptos a eliminar o patógeno (Liu *et al.*, 2006; Kawai and Akira, 2010).

Uma das principais ações da IL-12, é ativar as células T naive, atuando juntamente com o antígeno e moléculas co-estimuladoras como sinal de ativação celular. Ela induz a polarização da resposta das células T CD4⁺ para Th1, estimula a produção de IFN- γ por essas células e reduz a supressão da produção de IFN- γ mediada por IL-4 (Cooper and Khader, 2008).

A produção de TNF- α , é dada pela ativação dos macrófagos e das células dendríticas, essa citocina é importante para a atividade antimicrobiana. Experimentos mostram que camundongos deficientes na produção dessa citocina, ou do seu receptor, têm aumentada sua susceptibilidade à infecção, e apresentam retardo no recrutamento de monócitos para o local da infecção, além de mudanças na organização dos granulomas (Flynn *et al.*, 1995; Bean *et al.*, 1999).

Outro mecanismo da defesa inata é a formação do fagolisossomo (fagossomos + lisossomo) e a produção de óxido nítrico (NO) e reativos intermediários do nitrogênio (RNI), além de outros radicais do oxigênio. A formação do NO e de RNI está ligada à resposta ao estímulo de IFN- γ e TNF- α . Para estas respostas *Mtb* possui dois grandes mecanismos de evasão, no qual o primeiro é a utilização de uma alquil hidroperóxido redutase - subunidade C (AhpC) que metaboliza peróxidos e peroxinitritos (Bryk *et al.*, 2002) e o outro é a utilização de duas proteínas do tipo “group I truncated hemoglobina” (trHbs), codificadas pelos genes *glbN* e *glbO*. Estas proteínas metabolizam o óxido nítrico em nitrato, diminuindo a toxicidade do NO (Milani *et al.*, 2001; Niemann and Tisa, 2008; Daigle *et al.*, 2009).

1.4.1 Dinâmica dos macrófagos

Os macrófagos desempenham função essencial na homeostase e na defesa do organismo, sendo caracterizados por elevada heterogeneidade

funcional (Geissmann *et al.*, 2010). Equivalente à dicotomia Th1 e Th2 de polarização das células T, os macrófagos podem ser polarizados pelo microambiente para montar respostas M1 e M2 (Biswas and Mantovani, 2010). Produtos microbianos, como o LPS, ou IFN- γ são capazes de ativar os macrófagos, produzindo uma resposta do tipo M1. Nessa ativação clássica, os macrófagos se tornam potentes efetores que matam microrganismos intracelulares e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. Com essa polarização, os índices de IL-12 e IL-23 se tornam elevados e induzem maior produção de óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de oxigênio (Sica, A and Mantovani, A, 2012). Em contraste, a ativação alternativa de macrófagos M2 é bem diversa, mas em geral, está envolvida na resposta Th2. Tal ativação, tem como função, a imunorregulação, o encapsulamento, a contenção de parasitas, além de promover a reparação tecidual, remodelação e progressão de tumores (Sica, A. and Mantovani, A., 2012).

Em todos os estágios da resposta imune, as citocinas produzidas participam dos processos reguladores, assim como da ativação de funções efectoras (North and Jung, 2004). O reconhecimento da micobactéria e posterior secreção de IL-12 por macrófagos, são processos iniciados antes da apresentação de antígenos do Mtb aos linfócitos T. Somado a isso, a IL-23, IL-18 e IL-27 também induzem a produção de IFN- γ , podendo a IL-18 e a IL-27 atuar em sinergia com a IL-12, aumentando sua atividade. Acredita-se que a IL-27 atue em uma fase precoce da resposta imune, precedendo a IL-12 na indução da produção de IFN- γ , enquanto que a IL-12 tem forte atuação na amplificação da produção de IFN- γ e na expansão de linfócitos Th1 em um estágio subsequente (Ottenhoff *et al.*, 2005). Tal cenário está ilustrado na Figura 3.

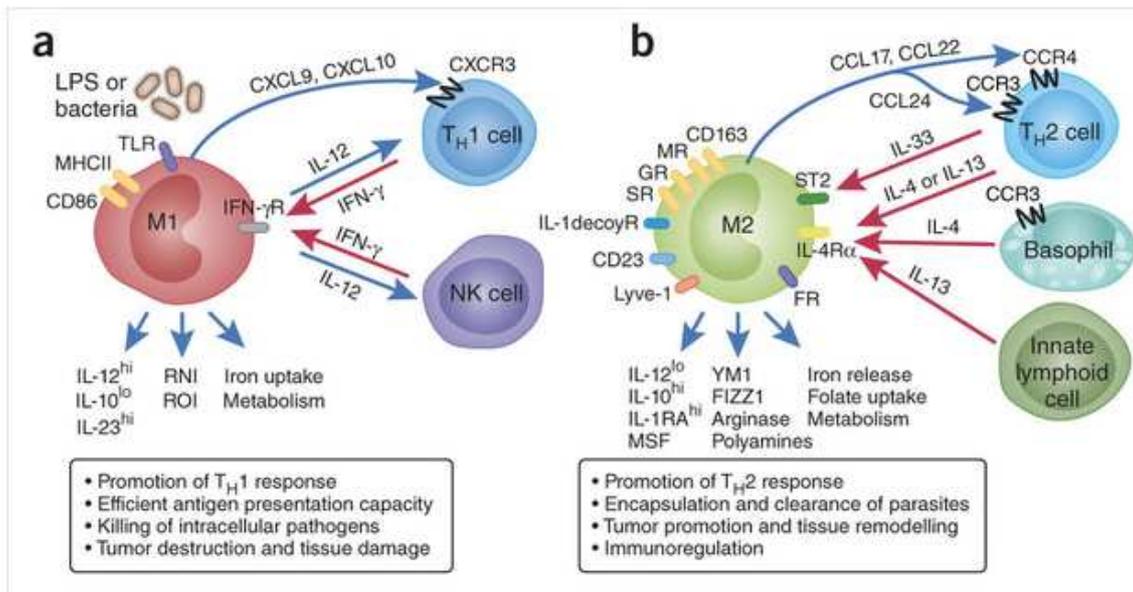


Figura 3. Representação do mecanismo de ativação do macrófago (a-M1 e b-M2). (Retirado de (Teixeira *et al.*, 2007; Biswas and Mantovani, 2010).

A capacidade bactericida do macrófago frente ao *Mtb* necessita ser previamente ativada, e o IFN- γ é o principal, e mais potente mediador desse processo (Ottenhoff *et al.*, 1998; Salgame, 2005). Devido a sua importância, defeitos nos genes para IFN- γ ou no seu receptor, predisõem indivíduos a infecções micobacterianas graves (Jouanguy *et al.*, 1996). Embora a capacidade de produção de IFN- γ possa variar entre indivíduos, alguns estudos sugerem que os níveis de IFN- γ estão diminuídos em pacientes com TB ativa (Lin *et al.*, 1996). Além disso, foi demonstrado que *Mtb* pode impedir que macrófagos respondam adequadamente ao IFN- γ (Ting *et al.*, 1999).

1.5. A tuberculose no fígado

Há casos em que a resposta imune não é eficaz em conter a disseminação do bacilo no pulmão. Assim, a infecção por *Mtb* pode se manifestar em outros órgãos, sendo classificada como TB extrapulmonar (Kaufmann, 1996; Apostolou *et al.*, 1999; Ulrichs *et al.*, 2004). Nesse sentido, a TB no fígado é uma das formas mais raras, sendo este um dos últimos órgãos internos a ser infectado. Corroborando os achados em pacientes, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, o Centro de Pesquisa em Tuberculose (CPT), mostraram que o número de unidades formadoras de colônia recuperadas do fígado de camundongos infectados por *Mtb* é cerca de 0,001 a

0.0001 vezes o número que é encontrado no baço e pulmão (Zarate-Blades *et al.*, 2009).

O fígado possui uma variedade de funções metabólicas e já foi descrito que apesar de ocorrer diversas alterações estruturais e funcionais após infecções, raramente são encontradas bactérias vivas em biópsias hepáticas (revisado por (Gregory and Wing, 2002)). O “clearance” rápido de bactérias da circulação sanguínea é geralmente atribuído aos macrófagos hepáticos residentes, também chamados de células de Kupffer (KC), os quais ocupam os sinusóides hepáticos.

Como o fígado recebe o sangue da 30% do sangue total/minuto provindos da circulação sistêmica e do intestino (Sheth and Bankey, 2001), esse órgão está sujeito à exposição de vários antígenos, resultando em um microambiente distinto de resposta imune (Crispe, 2009). O sangue que atravessa o sistema porta-hepático alcança uma rede de sinusóides de diâmetro extremamente pequeno, possibilitando o contato íntimo das células circulantes com uma série de células intra-hepáticas, como as KC (Racanelli and Rehermann, 2006), (Figura 4).

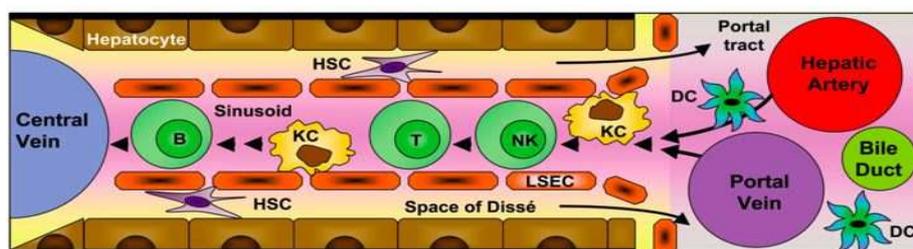


Figura 4. Representação da interação e disposição das células do sistema imune no fígado. DC, célula dendrítica; KC, célula de Kupffer; LSEC, célula endotelial sinusoidal; HSC, célula hepática estelada. (retirada de (Racanelli and Rehermann, 2006))

A localização das células de Kupffer favorece a fagocitose de detritos e microrganismos durante a passagem de sangue. Sua migração lenta ao longo dos sinusóides hepáticos causa frequentes perturbações e estase temporária no fluxo do sangue sinusoidal (Macphee *et al.*, 1995), facilitando assim o contato com os linfócitos. O fígado é seletivamente enriquecido em macrófagos (células de Kupffer) e células natural killer (NK), que são os principais componentes do sistema imune inato desse órgão. As células de Kupffer são ativadas por vários estímulos bacterianos, incluindo lipopolissacárido (LPS) e

superantígenos bacterianos. Citocinas derivadas das células de Kupffer, desempenham um papel-chave, modulando a diferenciação e proliferação de outras células.

Em resposta a concentrações fisiológicas de LPS, as células de Kupffer são importantes na manutenção da tolerância periférica, pois prontamente produzem TNF- α e IL-10 (Knolle *et al.*, 1995), as quais em conjunto, induzem a diminuição na expressão de MHC classe II apresentando antígenos bacterianos nas células endoteliais sinusoidais e células dendríticas e conseqüentemente, a diminuição da ativação de células T (Groux *et al.*, 1996). As células de Kupffer também produzem prostanóides, óxido nítrico, e intermediários reativos do oxigênio que também diminuem a ativação de células T (Roland *et al.*, 1994). Desta forma, a tolerância aos antígenos no espaço porta (Yu *et al.*, 1994), depende desses macrófagos, e a resposta pode ser prejudicada caso as células de Kupffer estejam suprimidas (Roland *et al.*, 1993).

Por outro lado, em infecções, essas células constituem um fator significativo na resistência do hospedeiro a infecções primárias e secundárias. Em particular, eles são conhecidos por iniciar e orquestrar a resposta imune inata no fígado. A IL-12 e IL-18, derivadas de células de Kupffer, por exemplo, regulam a diferenciação das células NK e promovem a expansão local de subpopulações de célula NK citotóxica, que expressam grandes quantidades de IFN- γ (Lauwerys *et al.*, 2000).

Outras citocinas derivadas das células de Kupffer, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e ainda os leucotrienos promovem a infiltração e atividade antimicrobiana de neutrófilos (Gregory and Wing, 1998). Os neutrófilos podem eliminar as bactérias extracelulares que estão ligadas às células de Kupffer e hepatócitos através de fagocitose de superfície. Essa atividade dos neutrófilos, estimula outras células do sistema imunológico inato, através da secreção de citocinas inflamatórias e promove o afluxo e ativação de células T CD4+ e CD8+ (Gregory and Wing, 1998). Essas interações estão representadas na Figura 5.

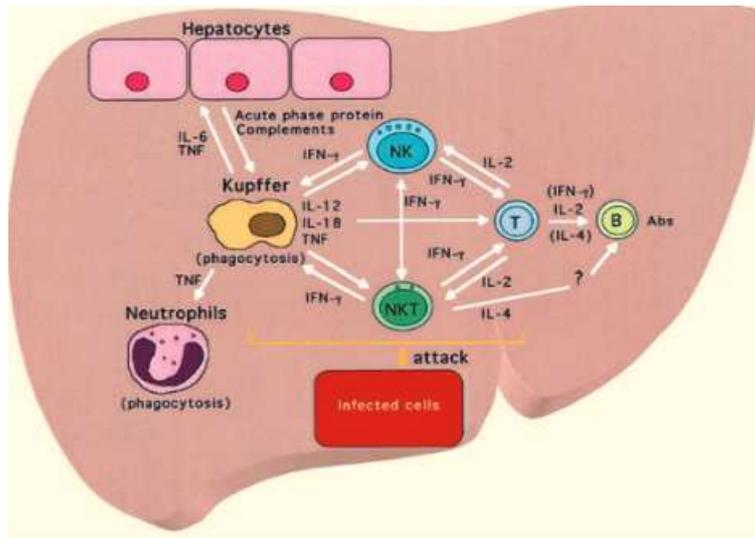


Figura 5. Representação da interação dos hepatócitos do fígado, células de kupffer, leucócitos e citocinas na inflamação no fígado (retirado de (Seki *et al.*, 2000)).

Mesmo com todas as informações já expostas, a literatura é escassa quando se trata da TB e a resposta imune no fígado. Tal fato impulsiona novas pesquisas e estudos a fim de contribuir com o conhecimento científico e esclarecer os fatores responsáveis pela maior capacidade microbicida das células do sistema imune neste órgão.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Há evidências de que na tuberculose experimental ocorre o espalhamento dos bacilos por diferentes órgãos, sendo o fígado um dos órgãos menos atingidos pela infecção, apesar de receber constantemente aporte sanguíneo proveniente de todo o organismo. Sabe-se também que em outros modelos de infecção, a resposta imune no fígado geralmente é eficaz, culminando na eliminação de uma variedade de patógenos. No entanto, muito pouco foi estudado em relação à resposta imune inata do fígado contra *Mtb* e porquê a resposta ser diferencialmente modulada em relação ao observado no pulmão, principal sítio de infecção pelo bacilo.

Sendo assim, este trabalho possui dois objetivos:

- 2.1. Identificar o método mais eficaz para isolar os macrófagos do fígado e pulmão. (Parte I)
- 2.2. Comparar a capacidade de células totais provenientes do fígado e do pulmão na resolução da infecção *in vitro* por *Mtb* (Parte II)

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos adultos machos da linhagem BALB/c, com peso entre 20 – 25 gramas, provenientes do Biotério Central – USP/RP. Eles foram mantidos em uma rack fechada, própria para animais, em uma sala com fluxo de ar controlado, adequada para manter os animais em experimentação, com ciclo de luz claro/escuro controlado e livre acesso à água e alimentação. Os experimentos foram realizados com aprovação do comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Processo número 020/2012).

METODOLOGIA RELACIONADA AOS EXPERIMENTOS DE ISOLAMENTO CELULAR – PARTE I

3.2. Metodologia

3.2.1. Eutanásia, operação, perfusão e remoção dos órgãos.

Iniciando todos os ensaios foi promovida a eutanásia do camundongo por meio da introdução intra peritoneal de Ketamina 01 a 1,5 microlitros por grama de peso, e 0,5 microlitros de xilazina por grama de peso. Após isso, foi realizada a assepsia do abdômen do animal com álcool iodado e em seguida com um par de tesouras o abdômen foi aberto, fazendo uma incisão mediana de 1 a 2 cm acima das patas traseiras, continuando até o esterno e prosseguindo com uma incisão horizontal. Com o auxílio de uma pinça, as partes que consiste em pele e camadas musculares foram fixadas com alfinetes. Para iniciar a perfusão foi necessário cortar a veia porta intestinal e inserir no coração uma seringa de 20 ml com uma agulha para perfusão. Primeiramente foi injetado 40 ml de Solução de Hanks tamponada livre de cálcio e magnésio (CMF-HBSS), a 37°C para remoção de células não aderentes e auxiliar a ação da enzima de digestão injetada em seguida, 20 ml de colagenase 0,02% diluída em HBSS, também a 37°C. Os órgãos de interesse (fígado e pulmão) já perfundidos foram removidos e colocados em

uma placa de petri estéril (35mm x 10mm), sendo imersos em 5ml de colagenase 0,02%. Os órgãos foram picotados e encaminhados para os respectivos protocolos de purificação celular.

3.2.2. Isolamento celular

O órgão picotado foi coletado em um tubo cônico de 50 ml, no qual foi adicionado mais colagenase 0,02% até completar o volume de 20 ml. Após esse procedimento, a solução foi suavemente homogeneizada com o auxílio de uma seringa e filtrada em filtro celular de 100 μ m. Esse conteúdo acondicionado em um tubo cônico de 50 ml e completado para o seu volume máximo com meio DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco), visando remover o tecido não digerido. O tubo foi, então, centrifugado a 50g, 4°C por 1 minuto, sem frenagem. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 50 ml de HBSS frio. Esse processo foi realizado 3 vezes após a última centrifugação o precipitado foi resuspendido em 1 ml de DMEM.

3.2.3. Contagem celular e o plaqueamento

O volume de 10 μ l da solução de células descrita anteriormente foi homogeneizado em um eppendorf junto com 90 μ l de tripan blue. Parte dessa solução (10 μ L) foi utilizada na montagem da câmara de Neubauer e analisada em microscópio óptico. Cada quadrante da câmara foi contado e ao final realizada a média dos valores obtidos (soma dos valores obtidos em cada quadrante dividido pelo número total de quadrantes contados). O resultado numérico foi a média dos quadrantes multiplicado pela grandeza da diluição (nesse caso 10 vezes) e pela constante da Neubauer (10^4), o que reflete a quantidade de células por ml. A partir do número de células que foram obtidas, a garrafa de cultura foi preparada com a solução celular conforme o seguinte padrão: uma garrafa de 75 cm² comporta aproximadamente uma densidade celular de $6,7 \times 10^4$ células por cm². Assim, após o plaqueamento, a garrafa de cultura foi mantida em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e o meio foi trocado em um intervalo de 2 a 3 dias. Entre o décimo segundo e décimo quarto dia do início do experimento, o crescimento da cultura de macrófagos

atingiu seu nível máximo, portanto, esse foi o período ideal de coleta das células.

3.2.4.Preparação para a citometria

A coleta dos macrófagos foi realizada no décimo segundo dia do experimento por meio de agitação, pois após esse período a cultura formou uma camada de fibroblastos que ancoravam os macrófagos. Desta forma, o processo físico provocado pela agitação com movimentos orbitais em “shaker” por 30 minutos a 120 rpm a 37°C, foi suficiente para fazer com que os macrófagos se soltassem temporariamente da camada de fibroblastos permanecendo no sobrenadante. Assim o sobrenadante foi coletado e a garrafa de cultura lavada duas vezes com PBS (Tampão fosfato-salino), esse conteúdo final foi depositado em uma placa de petri e incubado por 30 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Essa incubação visou selecionar os macrófagos, pois nesse pequeno intervalo de tempo esse tipo celular seria o único capaz de aderir a placa de petri, devido a sua grande capacidade de adesão.

Após esse período, a placa de petri foi lavada duas vezes com PBS e todo o conteúdo líquido foi descartado. Adicionou-se 3 ml de tripsina e incubou a placa a 37°C por mais 3 minutos. Esse processo químico foi utilizado para retirar os macrófagos que estavam aderidos na superfície da placa para realizar as marcações necessárias da citometria. Para inativar a tripsina foi necessário adicionar 6 ml de RPMI completo. O sobrenadante dessa placa de petri foi coletado em um tubo cônico de 15 ml e centrifugado a 450g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de PBS para a contagem das células (assim como descrito anteriormente) coletadas pós-aderência.

3.2.5. Marcação para a citometria

Após a obtenção e contagem das células (item 3.2.4), foi adicionado um volume de FcBlock proporcional seguindo instruções do fabricante (BD Biosciences), permanecendo por 30 minutos a 4°C. Esse processo bloqueia os receptores da porção Fc presentes na membrana celular, impedindo que os

anticorpos que serão adicionados se liguem pela porção Fc na célula, garantindo assim, a ligação pela sua especificidade (porção Fab). Durante essa incubação foi preparado uma solução de anticorpos diluídos em PBS em um eppendorf envolto em alumínio. Nesse experimento foram utilizados o CD11b-FITC e F4/80-PerCP-Cy5.5 (marcadores para macrófagos), ambos seguindo as diluições do fabricante. As células foram então, fracionadas em tubos para FACS contendo 1×10^6 células/mL e a solução de anticorpos foi distribuída nos tubos na qual haveria marcação. Houve novamente incubação por mais 30 minutos a 4°C para que a ligação dos anticorpos específicos as moléculas de interesse ocorresse. Após esse tempo, adicionou-se 2 ml de PBS com 2% de soro bovino fetal em cada tubo seguido de uma centrifugação de 10 minutos a 450g, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 100µl de PBS com 1% de formaldeído. Após todo esse processo, a amostra foi adquirida em um citômetro BD FACSCanto II.

3.2.6. Resposta proliferativa a GM-CSF

Os possíveis macrófagos já isolados como descrito no item 3.2.4 foram distribuídos em uma placa de 96 poços, em triplicata a uma densidade de 5×10^3 células/poço. Oito grupos receberam, junto com o meio DMEM, diferentes concentrações de GM-CSF recombinante (de 0,19-25ng/mL. Após incubação durante 4 dias em estufa a 37°C e 5% CO₂, o crescimento celular foi quantificado por um ensaio de conversão da resazurina, sendo a leitura realizada em um espectrofluorímetro (Gemini XPS).

3.2.6. Produção de citocinas

Os possíveis macrófagos, previamente isolados como descrito no item 3.2.4, foram distribuídos em uma placa de cultura de 96 poços, com a densidade de 1×10^6 células/poço em RPMI. No dia seguinte, o meio foi substituído por meio de crescimento contendo LPS a 10µg/mL. Após incubação de 30 horas a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante da cultura foi recolhido, adicionado a placa apropriada para o ensaio e diluído em tampão fornecido no kit. Em seguida, adicionou-se microesferas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura específicos. Após o período de ligação com as

respectivas citocinas contidas no sobrenadante, foram adicionados anticorpos biotinilados e estreptoavidina-PE. Nessa etapa, as microesferas passam pelo equipamento (Magpix - Luminex Corporation, Austin, TX, USA), o qual emite um laser que excita as moléculas fluorescentes e um segundo laser excita o complexo estreptoavidina-PE. Para detectar o conjunto de informações geradas, o software desta plataforma identifica cada microesfera e quantifica a fluorescência emitida, sendo estes valores associados à quantidade de citocina presente na amostra.

METODOLOGIA RELACIONADA AOS EXPERIMENTOS DE INFECÇÃO COM *M. tuberculosis* – PARTE II

A nova metodologia estabelecida foi uma variação e composição das demais já empregadas e dos protocolos rotineiros seguidos pelo laboratório. Após vários testes avaliando a rentabilidade, o novo método forneceu, com o uso de dois animais, células suficientes para um experimento que contempla a atividade fagocítica e microbicida. Tal metodologia está exposta na figura 6.

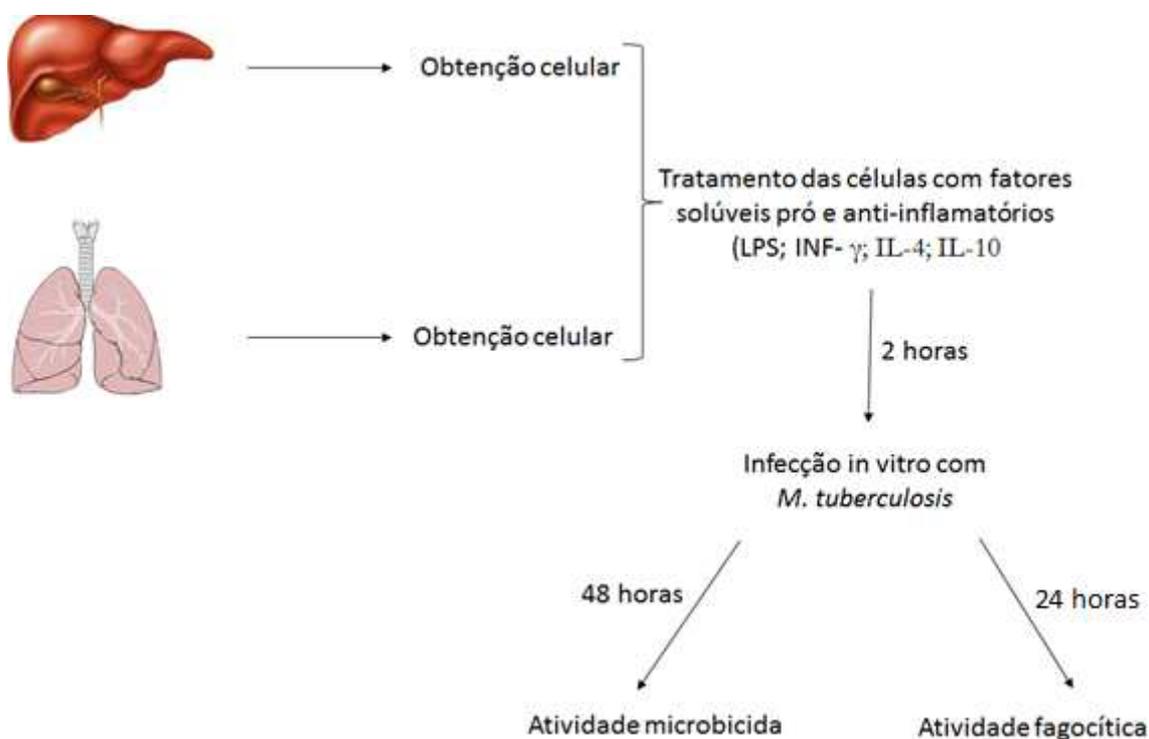


Figura 6. Desenho experimental representando as atividades a serem realizadas no projeto de pesquisa.

3.3. Metodologia

3.3.1. Obtenção celular

Iniciando todos os ensaios, foi promovida a eutanásia do camundongo por meio da introdução intra peritoneal de Ketamina 01 a 1,5 microlitros por grama de peso, e 0,5 microlitros de xilazina por grama de peso. Após isso, foi realizada a assepsia do abdômen do animal com álcool iodado e em seguida com um par de tesouras o abdômen foi aberto, fazendo uma incisão mediana de 1 a 2 cm acima das patas traseiras, continuando até o esterno e prosseguindo com uma incisão horizontal. Com o auxílio de uma pinça, as partes que consiste em pele e camadas musculares foram fixadas com alfinetes.

O fígado e o pulmão foram removidos e colocados em uma placa de petri estéril (35mm x 10mm) imersos em 2ml de meio RPMI incompleto. Os órgãos foram picotados e coletados em um tubo cônico de 50 ml, recebendo 1 ml de colagenase 0,02% e 7ml de meio RPMI incompleto. Os tubos seguiram para uma agitação com movimentos orbitais a 200 rpm por 30 minutos a 37°C. Após esse procedimento, a solução de cada órgão foi suavemente homogeneizada com o auxílio de uma seringa e filtrada em uma organza estéril. Esse conteúdo foi coletado em um tubo cônico de 50 ml no qual foi adicionado 10 mL de RPMI com 10% de Soro bovino fetal, visando remover o tecido não digerido e parar a ação enzimática da colagenase. Em seguida, o tubo foi centrifugado, a 400 g, 4°C por 10 minutos, com frenagem. O sobrenadante foi descartado e os precipitado do pulmão e fígado ressuspensos em 2,5mL e 5mL de ACK (Tampão de Lise Cloreto de Amônio), respectivamente. O tampão de lise de hemácias agiu por dois minutos e logo em seguida foi adicionado o dobro do volume de PBS em cada tubo. Uma nova centrifugação com frenagem, ajustada a 400 g, 4°C por 10 minutos, foi realizada, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 ml de meio RPMI com 2,5% de soro bovino fetal.

Dessa solução coletou-se 10µl da solução de células e colocou-se em um eppendorf junto com 90µl de tripan blue. A solução foi homogeneizada e montada em câmara de Neubauer utilizando 10 µl da solução final contida no eppendorf. A câmara de Neubauer seguiu para o microscópio, onde cada

quadrante foi contado e ao final realizada a média da soma dos valores obtidos dividido pelo número total de quadrantes contados. O resultado numérico será o produto da média multiplicado pela grandeza da diluição (nesse caso 10^1) e pela constante da Neubauer (10^4), refletindo a quantidade de células por ml. A partir do número de células que foram obtidas, planejamos a disposição e concentração das mesmas em uma placa de cultura de 96 poços.

Desenho da placa de cultura

A disposição das células na placa de cultura foi elaborada seguindo o valor obtido na contagem celular, segundo as interações com os estímulos e com os controles do experimento. Desta forma, elaborou-se um desenho de placa de cultura que foi comum a todos os experimentos (Figura 7).

		Fígado				Pulmão							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Infecção com <i>M. tuberculosis</i>	A	Cél.	+	LPS	INF- γ		Cél.	+	LPS	INF- γ		Mtb	
	B	Cél.	+	IL-4	IL-10		Cél.	+	IL-4	IL-10		Mtb + LPS INF- γ	
	C	Cél.					Cél.					Mtb + IL-4 IL-10	
	D	Cél.	Lisada				Cél.	Lisada					
	E	Cél.	Viva				Cél.	Viva					
	F											Saponina	
	G												Meio
	H	Cél.	sem lavagem				Cél.	sem lavagem					

Figura 7: Desenho da placa de cultura.

3.3.2 Tratamento das células com fatores solúveis pró e anti inflamatórios

A escolha dos estímulos foi realizada segundo trabalhos de polarização celular. Desta forma, como fatores indutores da atividade fagocítica e microbicida utilizamos o LPS e INF- γ , e como fatores que diminuem a atividade fagocítica e microbicida foram utilizados a IL-4 e IL-10. Ao longo do trabalho

esses fatores foram tratados como M1 para o conjunto LPS e INF- γ e M2 para o conjunto IL-4 e IL-10. A concentração de todos os estímulos foi comum, de 20ng/mL, com exceção do LPS que foi de 200ng/mL. Assim foi preparado uma solução de estímulos pró inflamatórios e anti inflamatórios. Logo após o plaqueamento das células foi adicionado 50 μ L de cada solução de estímulo, seguindo as orientações do desenho da placa de cultura, e as células foram incubadas a 37°C em uma estufa com atmosfera de 5% de CO₂ pelo tempo designado em cada protocolo.

3.3.3 Infecção *in vitro* com *M. tuberculosis*

Os experimentos com *Mtb* foram realizados na sala de biossegurança nível 3 da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –USP. Para esse procedimento usamos *Mtb* H37Rv crescido em meio líquido 7H9 enriquecido com 10% de OADC por 9 a 10 dias, a 37°C. Após esse período *Mtb* foi preparado até atingir turbidez correspondente à escala padrão de McFarland nº1 (1×10^7 micobactérias/mL). A concentração de *Mtb* por célula foi padronizada com a realização de um experimento de multiplicidade de infecção (MOI), descrito no apêndice B, cujo resultado revelou que o ideal era utilizar 10 micobactérias para cada célula. Após esse teste, a concentração bacteriana foi acertada para 1×10^7 e centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em RPMI com antibiótico e 2,5% de soro bovino fetal para o volume final de 5mL. Seguindo o MOI (10:1) adicionamos 50 μ L de *Mtb* na placa de cultura conforme o desenho já previamente exposto e incubamos em uma estufa com atmosfera de 5% de CO₂ seguindo o tempo necessário para a atividade fagocítica e a microbicida.

3.3.4 Atividade fagocítica

A placa de cultura referente à atividade fagocítica permaneceu na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por duas horas, tempo suficiente para interação e fagocitose das micobactérias. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e guardado, e os demais poços foram lavados com PBS duas vezes para a retirada de *Mtb* que não foram fagocitados. Em seguida adicionou-se 100 μ L de saponina 0,05%, para a lise das células e mais 5 μ L de uma solução de

resazurina (1x – 1mg/mL). A placa foi novamente incubada no escuro, por 48 horas em uma estufa de CO₂. A leitura da atividade da resazurina foi feita em um espectrofluorímetro (Gemini XPS) e revelou se houve ou não a conversão dessa resazurina em resorufina pela atividade metabólica das micobactérias fagocitadas.

3.3.5 Atividade microbica

A placa de cultura referente à atividade microbica permaneceu na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por duas horas, tempo suficiente para interação e fagocitose das micobactérias. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado, e os poços foram lavados com PBS duas vezes, para retirada de Mtb que não foram fagocitados. Em seguida a placa de cultura permaneceu na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, nesse período espera-se que as citocinas microbicas já tenham interagido com *Mtb*. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e guardado, e os demais poços foram lavados com PBS duas vezes. Por fim foi adicionado 100 µL de saponina 0,05% para a lise das células e mais 5 µL de uma solução de resazurina (1x – 1mg/mL). Essa placa foi incubada por mais 48 horas no escuro em estufa de CO₂. A leitura da atividade da resazurina foi feita em um espectrofluorímetro (Gemini XPS) e revelou se houve ou não a conversão dessa resazurina em resorufina pela atividade metabólica das micobacterias que foram fagocitadas e sofreram com a atividade microbica das células de cada órgão.

3.3.6 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software (Graph Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), em que foi elaborado o teste One Way ANOVA, para a comparação entre os grupos com diferentes tratamentos em ambos os órgãos, com significância estabelecida em p<0,05.

Parte I

A observação do desenvolvimento das culturas de macrófagos permitiu extrapolar um protocolo que já foi aplicado a microglias e células de Kupffer, e agora para os macrófagos alveolares. O resultado desta extrapolação foi encorajador pois, até onde pudemos constatar, aplicamos essa metodologia de forma inédita em pulmão.

4. ISOLAMENTO DOS MACRÓFAGOS HEPÁTICOS E PULMONARES

O projeto constituiu-se em duas linhas principais, sendo a primeira parte concentrada em padronizações de metodologias de isolamento de macrófagos. Dentre as alternativas de isolamento de macrófagos do fígado (células de Kupffer), a técnica descrita por Kitani e colaboradores nos chamou a atenção por ser simples, barata e eficiente para nossos experimentos (Kitani *et al.*, 2010). Nesse sentido estabelecemos com sucesso a reprodutibilidade de tal técnica e, mais importante, pela primeira vez (até onde nós pudemos constatar na literatura) foi testado a mesma metodologia para a obtenção de macrófagos pulmonares

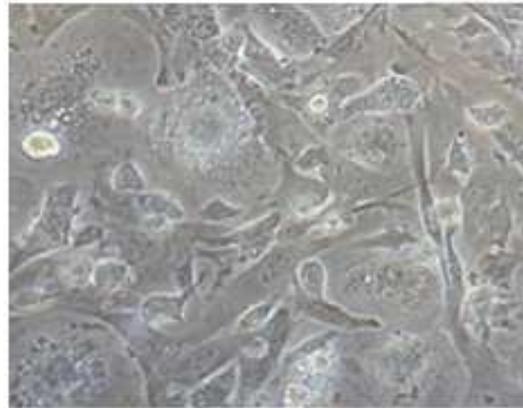
4.1 ISOLAMENTO DOS MACRÓFAGOS DO FÍGADO

As células de Kupffer (KC) são derivadas a partir da linhagem de monócitos, sendo considerados os macrófagos residentes do fígado. Embora KCs componham menos de 5% do volume do fígado, elas representam aproximadamente 80% da população de macrófagos residentes em todo o corpo. Sendo assim, o protocolo proposto por Kitani e colaboradores para obtenção dessa população celular (Kitani *et al.*, 2010) foi reproduzido com grande êxito, resultando nas características esperadas.

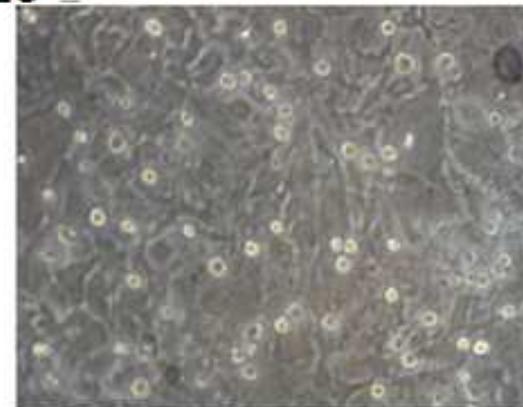
4.1.1 Acompanhamento do desenvolvimento da cultura mista de células do fígado.

Após a remoção e processamento das células provenientes do fígado, a incubação em cultura foi analisada e fotografada em diferentes períodos. De forma similar ao observado no trabalho de Kitani e colaboradores, nota-se através de microscopia que no sexto dia de cultura há um grande número de células, aparentemente muitos fibroblastos e algumas células de Kupffer (Figura 8, Dia 6). No décimo dia o número de prováveis KC é maior e é possível perceber que estas células (esféricas e mais brilhantes) estão ancoradas em uma camada de fibroblastos (mais alongadas e opacas) (Figura 8, Dia 10), sendo que no décimo segundo dia a cultura atinge o pico de confluência exibindo o maior número de macrófagos (Figura 8, Dia 12).

Dia 6



Dia 10



Dia 12

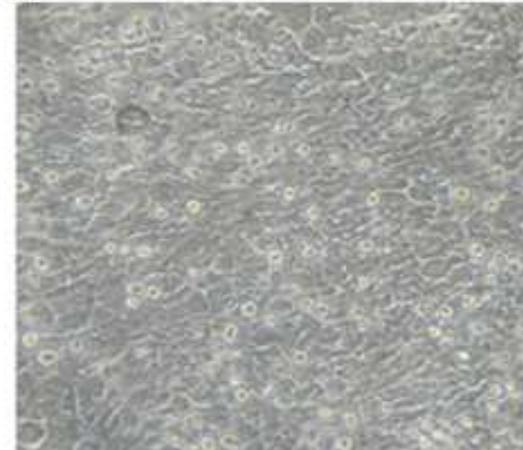


Figura 8. Fotos de microscopia da cultura mista de células do fígado. As fotografias revelam o desenvolvimento de possíveis macrófagos (células brilhantes) em cultura mista, atingindo o seu auge no décimo segundo dia. Ampliação: coluna da esquerda (100 x) e coluna da direita (400 x).

Dando continuidade ao protocolo, ao atingir a confluência na cultura foi averiguado o passo de agitação e desprendimento dos macrófagos e analisada a morfologia celular após a adesão dessas células em placa de cultura por 30 minutos. A Figura 9 (Após agitação) mostra que após a agitação das garrafas em “shaker”, as possíveis KC não estavam mais aderidas (sobrepostas) aos fibroblastos, sugerindo que estas haviam se desprendido. O sobrenadante contendo estas células foi recolhido e incubado por mais 30 minutos em placa de petri, sendo observado a predominância das células esféricas e brilhantes (possíveis KCs) (Figura 9, Após aderência), assim como no artigo de referência dessa metodologia (Kitani *et al.*, 2010).

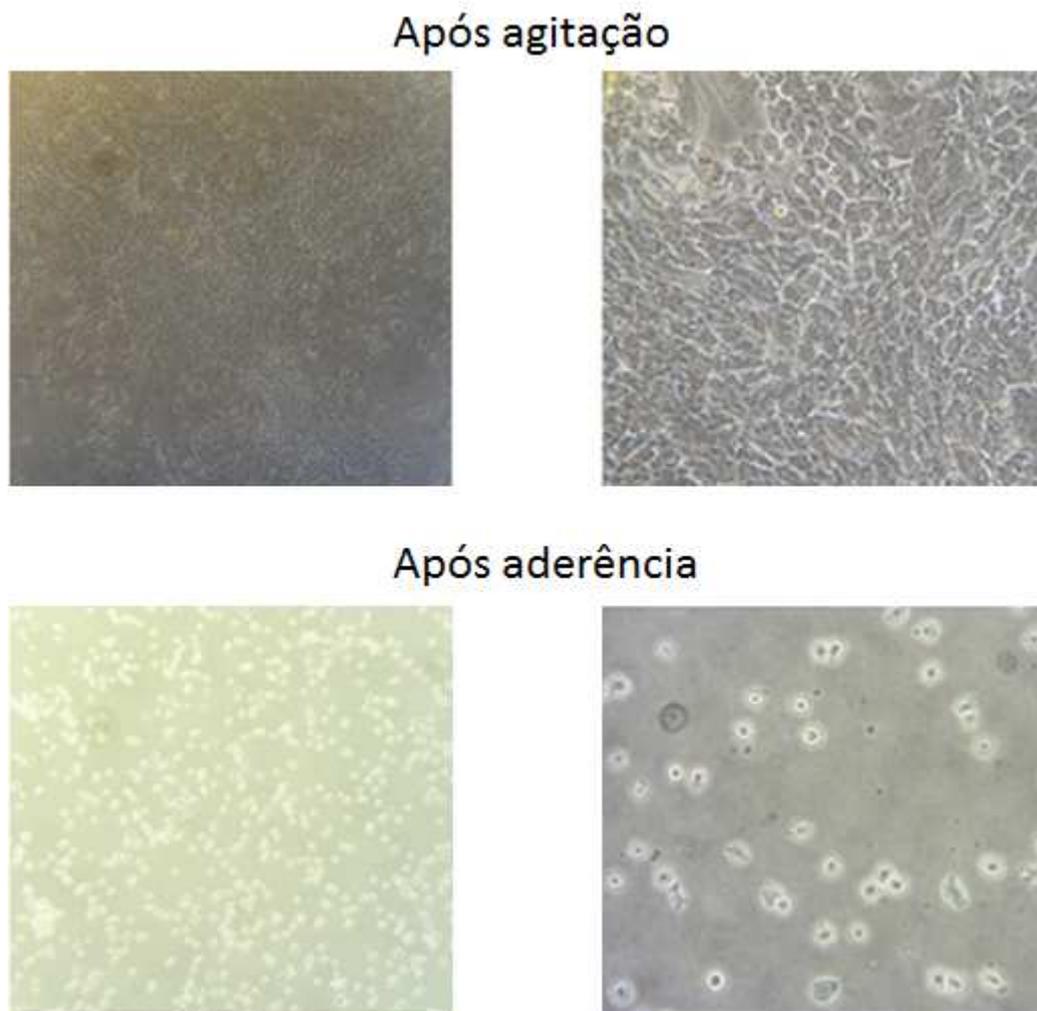


Figura 9. Fotos de microscopia da cultura mista nos momentos de coleta das células de interesse. As fotografias revelam a ausência ou presença dos possíveis macrófagos após o processo de isolamento e coleta celular. Ampliação: coluna da esquerda (100 x) e coluna da direita (400 x).

4.1.2. Avaliação dos marcadores de superfície celular

A citometria de fluxo foi um procedimento crucial para indicar se o tipo celular coletado de fato possuía marcadores característicos de macrófagos. Considerando a população total adquirida (Figura 10A), nota-se que 95,6% das células são positivas para os marcadores CD11b e F4/80 (Figura 10C). Ao se descontar a porcentagem de fluorescência inespecífica de 0,33% das células não marcadas (Figura 10B), conclui-se que o grau de pureza final foi de 95,2%. A presença concomitante desses dois marcadores predominantemente associados a macrófagos corrobora com o observado por Kitani e colaboradores e o alto grau de pureza dessa técnica (Kitani *et al.*, 2010).

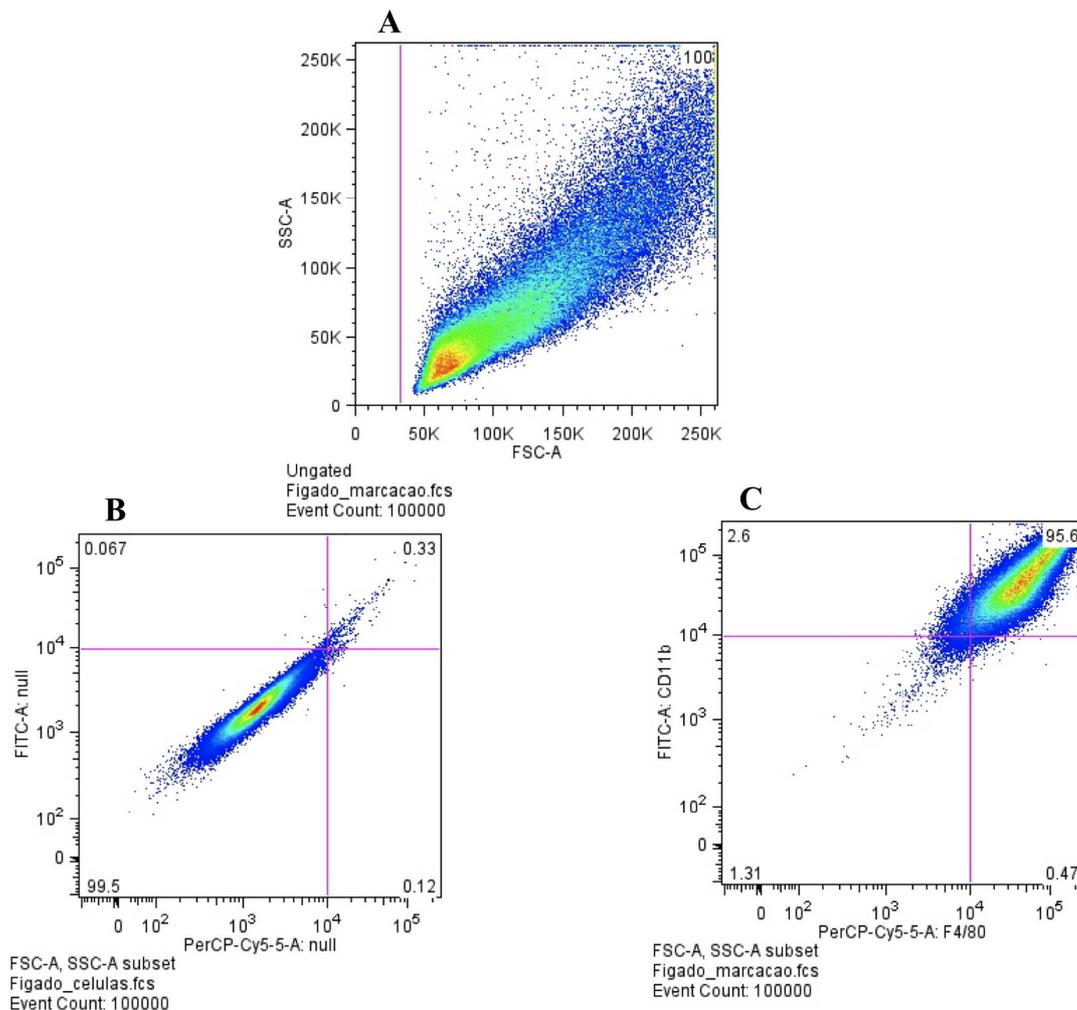


Figura 10. Análise da citometria de fluxo. A. Dot-plot expando as características de tamanho e granulidade das células. **B.** Dot-plot das células sem marcação. **C.** Dot plot das células marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80.

4.2. ISOLAMENTO DOS MACRÓFAGOS PULMONARES

Nesse ponto, a literatura disponibiliza várias metodologias, sendo a mais comum a digestão do pulmão, com posterior distribuição em placas das células totais e seleção dos macrófagos pulmonares por adesão. Apesar de simples e barata, essa técnica gera um conjunto celular com grau de pureza variável (muitas vezes abaixo de 90%), o que pode comprometer os resultados gerados a partir da cultura celular.

Visto que o protocolo desenvolvido por Kitani e colaboradores para separação de KCs (Kitani *et al.*, 2010) é baseado em outro protocolo de separação de micróglia (macrófago) do cérebro (Hassan *et al.*, 1991; Guillemin and Brew, 2004; Floden and Combs, 2007; Sugama *et al.*, 2009), os autores sugerem em seu artigo que esta metodologia poderia ser extrapolada para outros órgãos além dos 2 já estabelecidos. Sendo assim, optamos por adaptar esta metodologia ao pulmão visando obter macrófagos pulmonares com alto grau de pureza, com os resultados obtidos descritos a seguir.

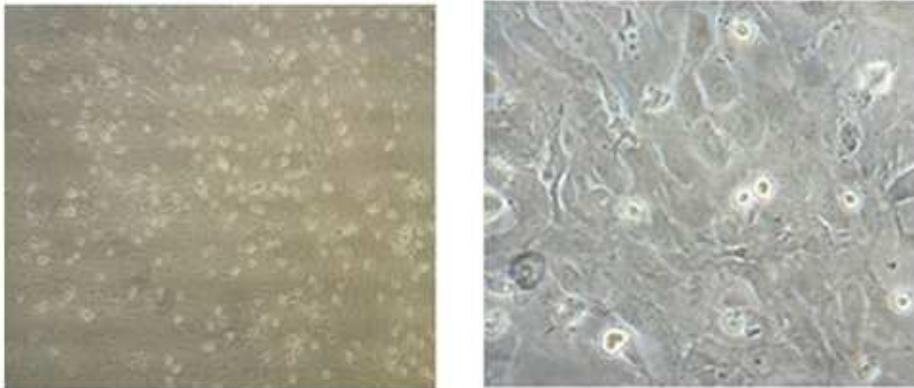
4.2.1. Acompanhamento do desenvolvimento da cultura mista de células do pulmão

De forma similar ao protocolo realizado para o fígado, o pulmão foi coletado, digerido e as células totais cultivadas em garrafa de cultura. Durante a incubação a cultura foi analisada e fotografada, a fim de certificar se as células pulmonares iriam se desenvolver de forma similar à cultura mista observada nas células do fígado. Sendo assim, o sexto, o décimo e o décimo segundo dia de cultura foram averiguados.

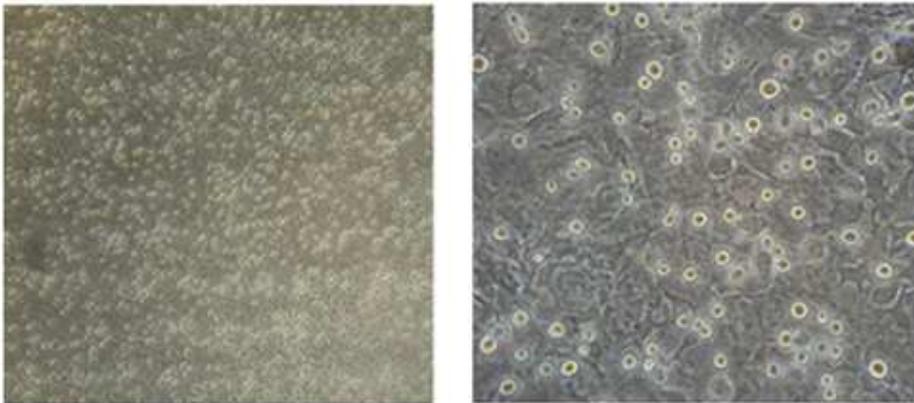
No sexto dia há grande número celular sendo a maioria aparentemente fibroblastos e alguns possíveis macrófagos (Figura 11, Dia 6). No décimo dia o número de prováveis macrófagos pulmonares (células esféricas e brilhantes) apresenta-se mais abundante e sobrepostas a uma densa camada de fibroblastos (células alongadas e opacas) (Figura 11, Dia 10). O décimo segundo dia, que está retratado pela Figura 11 (Dia 12), é marcado pelo ápice da cultura em número celular. Interessantemente, a cultura de células pulmonares exibiu desenvolvimento celular similar, quando observado ao

microscópio óptico, em relação ao protocolo da cultura de células hepáticas já bem descrito por Kitani e colaboradores (Kitani *et al.*, 2010).

Dia 6



Dia 10



Dia 12

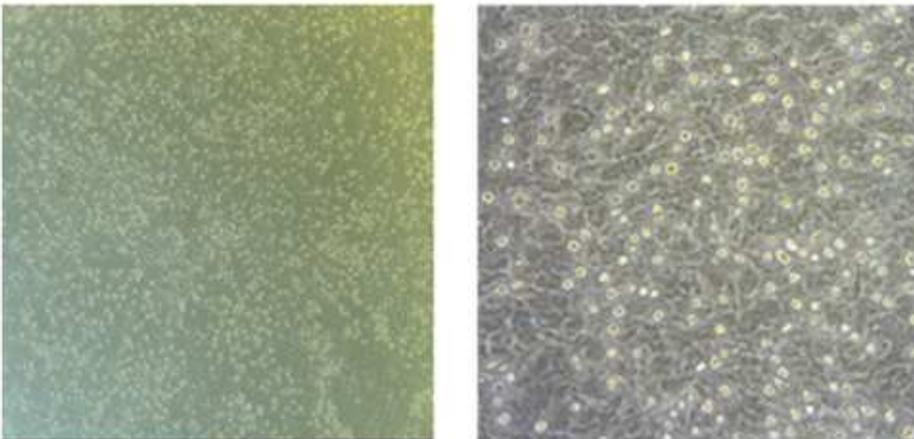


Figura 11. Fotos de microscopia da cultura mista de células do pulmão. As fotografias revelam o desenvolvimento de possíveis macrófagos (células brilhantes) em cultura mista, atingindo o seu auge no décimo segundo dia. Ampliação: coluna da esquerda (100 x) e coluna da direita (400 x).

Visto que houve êxito na fase inicial do protocolo, na sequência foi avaliado e fotografado o momento após a agitação, para remoção dos macrófagos da camada de fibroblastos, e também o período após a adesão de 30 minutos, para a seleção das células aderentes. As figura 12 (Após agitação) revela que após a agitação havia na placa de cultura apenas fibroblastos (comparando com a Figura 11, Dia 12) indicando que os possíveis macrófagos ficaram em suspensão no sobrenadante que foi recolhido. Esse sobrenadante foi incubado por 30 minutos em placa de petri, com a finalidade de selecionar apenas os macrófagos através da adesão. A Figura 12 (Após aderência) retrata as células que foram selecionadas por esse processo, exibindo características morfológicas de macrófagos.

Após agitação



Após aderência

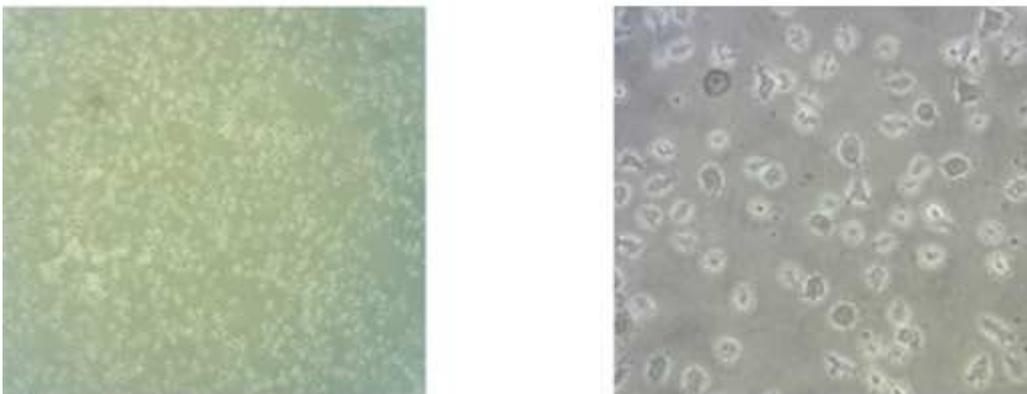


Figura 12. Fotos de microscopia da cultura mista nos momentos de coleta das células de interesse. As fotografias revelam a ausência ou presença dos possíveis macrófagos após o processo de isolamento e coleta celular. Ampliação: coluna da esquerda (100 x) e coluna da direita (400 x).

4.2.2. Avaliação dos marcadores de superfície celular

Seguindo o racional do protocolo já estabelecido para células provenientes do fígado, foi realizada a marcação dos possíveis macrófagos pulmonares (Figura 12, Após aderência) para citometria de fluxo. Da população total adquirida (Figura 13A), na qual nota-se certa homogeneidade, verifica-se que 99,2% das células adquiridas possuem marcadores característicos de macrófagos (CD11b e F4/80) (Figura 13C). Ao descontarmos a fluorescência inespecífica dessas células (0,68%, Figura 13B) obtemos o resultado final de 98,52% de pureza.

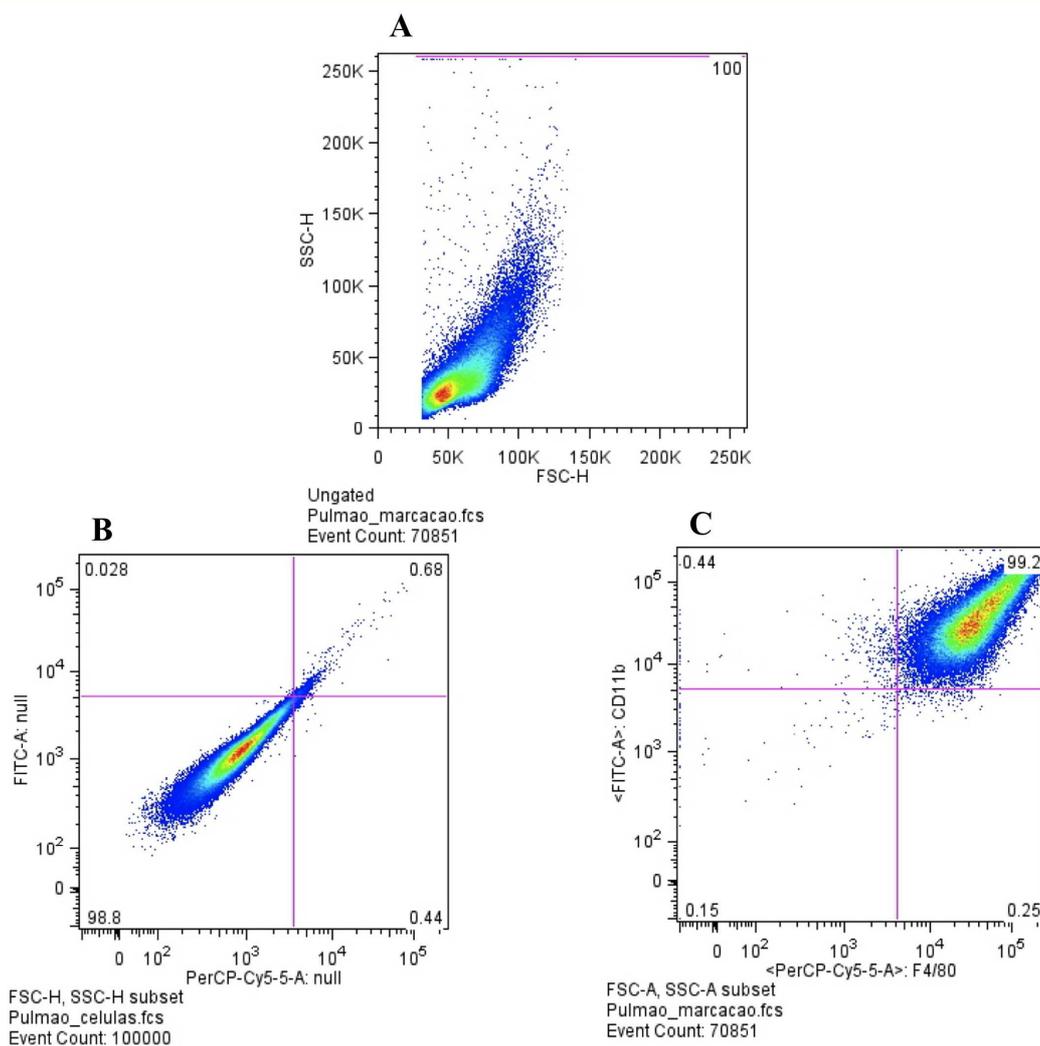


Figura 13. Análises dos dados provenientes do protocolo de isolamento através da cultura mista das células pulmonares. A. Dot-plot expando as características físicas das células. **B.** Dot-plot das células sem marcação. **C.** Dot plot das células marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80.

4.2.3. Aspecto funcional das células isoladas

Considerando as características e os marcadores para macrófagos presentes nessas células, o próximo passo foi averiguar alguns aspectos funcionais das mesmas.

Para tanto as células foram estimuladas *in vitro* com uma molécula pró-inflamatória, o PAMP LPS, e avaliada a produção de citocinas induzidas em cultura. A Figura 14 mostra que tanto IL-6 quanto TNF- α foram produzidos consistentemente pelos possíveis macrófagos isolados em resposta a estimulação, indicando que estes são funcionais nesse aspecto.

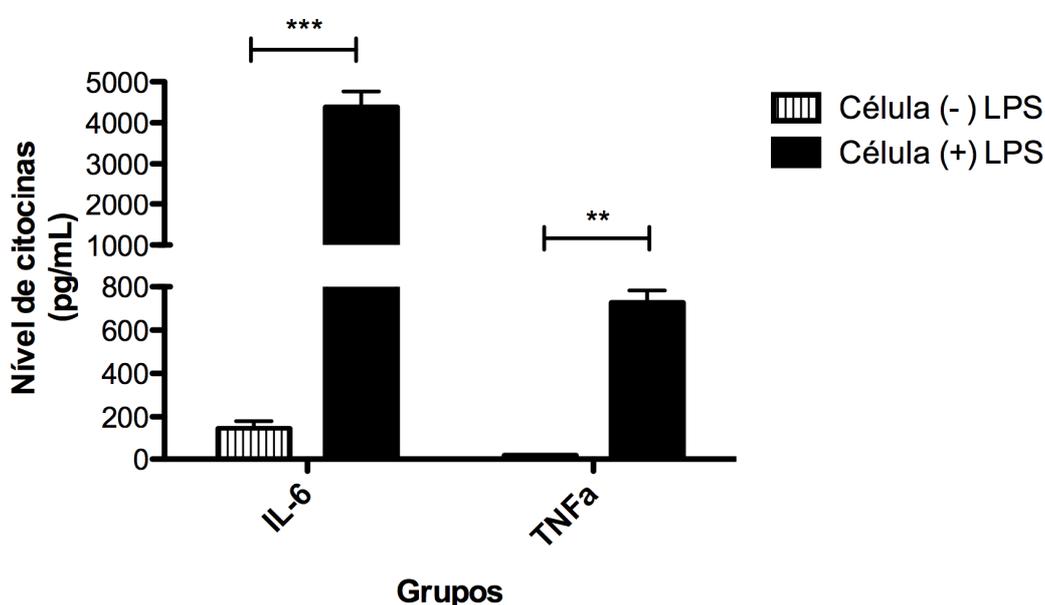


Figura 14. Dosagem da produção de citocinas em cultura de possíveis macrófagos pulmonares após estimulação com LPS. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Outra característica interessante a ser abordada é a capacidade proliferativa das células através de estímulo específico indutor. No caso dos macrófagos este é o GM-CSF, sendo a linhagem de macrófagos um dos principais alvos dessa molécula (Hamilton, 2008). Tal efeito foi confirmado pela Figura 15 na qual o grupo de células estimuladas exibem robusta resposta proliferativa, reforçando a hipótese dessas células isoladas serem macrófagos.

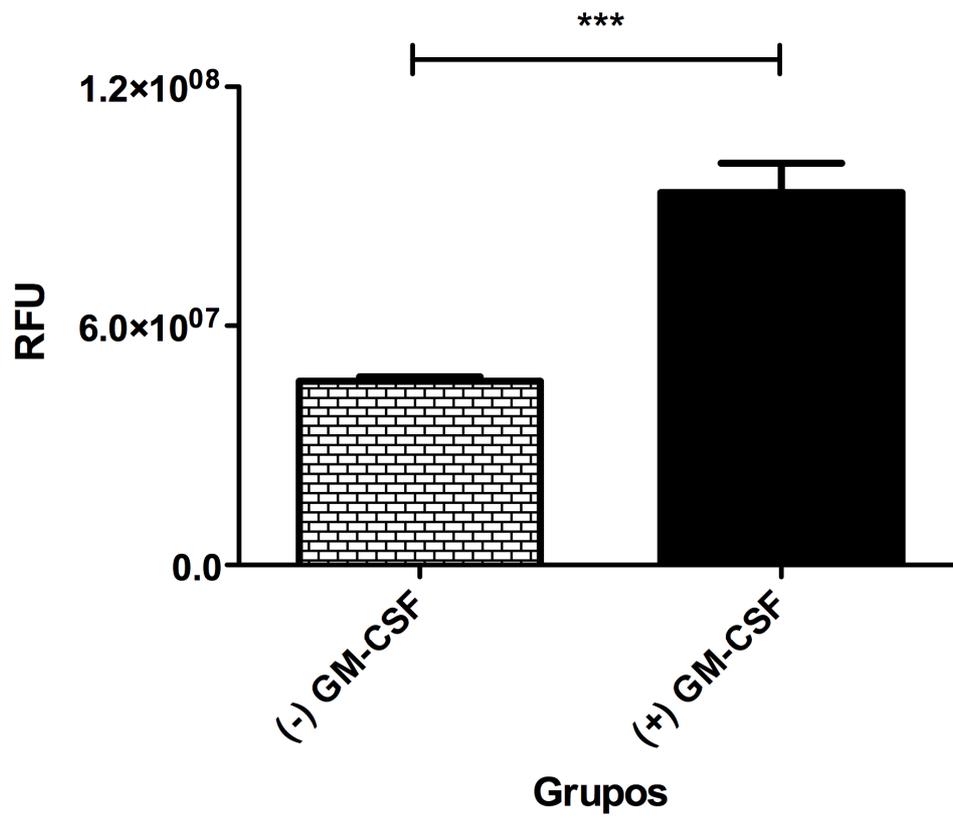


Figura 15. Resposta proliferativa dos possíveis macrófagos ao GM-CSF. Dados da conversão de resazurina em grupos celulares estimulados e não estimulados. *** $<p<0,001$

4.3 DISCUSSÃO

Quando o intuito do trabalho é o de avaliar a ação de determinado tipo celular isoladamente, recomenda-se trabalhar com amostras contendo o maior grau de pureza possível, a fim de diminuir a influência de que outros tipos celulares “contaminantes” possam exercer nos resultados obtidos. Nesse sentido, a metodologia na qual utiliza uma cultura mista de células do fígado publicada na revista científica “Journal of Immunological Methods” em 2010 por Kitani e colaboradores (Kitani, Takenouchi et al. 2010) nos pareceu simples e eficaz quando comparada às outras técnicas, as quais envolvem múltiplos gradientes de separação celular (laborosas e grau de pureza variável) (Froh, Konno et al. 2003) ou “beads” magnéticas (alto custo e pré-ativação celular em alguns casos) (Xu, Chen et al. 2012).

De acordo com os próprios autores, esse método já vem sendo aplicado há mais de 20 anos para separação de micróglia, que são macrófagos residentes do cérebro, sendo amplamente aceito pela comunidade científica (Hassan, Rifat et al. 1991, Guillemain and Brew 2004, Floden and Combs 2007, Sugama, Takenouchi et al. 2009). Interessantemente, este protocolo nunca havia sido utilizado em outros órgãos, o que levou os autores a testar no fígado. De forma consistente, eles demonstraram que foi possível obter alto grau de pureza de KCs, mantendo a funcionalidade e características responsivas dos macrófagos, assim como ocorria com o clássico método para isolamento da micróglia, sendo reprodutível a partir do fígado de ratos (Kitani, Takenouchi et al. 2010), bovinos (Kitani, Yoshioka et al. 2011) e publicado recentemente para suínos (Kitani, Yoshioka et al. 2014).

O primeiro passo para avaliar o emprego da metodologia em nossos experimentos foi testar a capacidade de execução da técnica. No artigo (Kitani, Takenouchi et al. 2010), a amostra do fígado digerido é cultivada após algumas centrifugações de baixa rotação, e as células de interesse são selecionadas de acordo com a sua adesão e proliferação sobre uma camada de fibroblastos à medida que a cultura prossegue. Como parâmetro do sucesso de reprodução da metodologia foram selecionadas duas técnicas abordadas no artigo de referência, sendo a análise microscópica e a citometria de fluxo.

Nos primeiros dias de cultura foram observados, por microscopia de campo claro, muitos fibroblastos e algumas possíveis células de Kupffer, as

quais apresentam um grande brilho, resultado similar ao que foi visto no mesmo período do artigo (Figura suplementar S1-B). As demais fotografias da cultura se assemelham ao encontrado por Kitani, sendo que no décimo segundo dia a cultura atinge o seu auge exibindo o maior número de macrófagos (Figura 8, Dia 12; Suplementar S1-C). Nesse sentido a evolução da cultura mista de células do fígado ocorreu conforme o esperado. A microscopia também revelou detalhes posteriores sobre as células da cultura mista após o processo de retirada dos macrófagos. O processo de agitação promove uma instabilidade na adesão entre as células de Kupffer e os fibroblastos (estes aderidos à garrafa de cultura), sendo suficiente para que os macrófagos fiquem soltos no sobrenadante por um breve período. As fotografias desse procedimento mostram células esféricas bem delimitadas, com um contraste de fase brilhante, características de KC, semelhante ao encontrado no artigo de referência (Figura S2).

A segunda etapa consistiu em avaliar por citometria de fluxo os marcadores de superfície dessas células coletadas, utilizando marcadores característicos de macrófagos (CD11b e F4/80). A população adquirida apresentou mais de 95% de células com dupla marcação (Figura 10), constituindo um importante indício de que houve o isolamento de uma população de macrófagos do fígado (KC) com alto grau de pureza e corroborando com a faixa preconizada pelo artigo de referência, que é de 95 a 99% (Kitani, Takenouchi et al. 2010).

Visto que essa metodologia foi altamente reprodutível nas diversas repetições dos nossos experimentos e considerando a possibilidade de extrapolação da mesma já relatada em literatura entre diferentes órgãos, decidimos por testá-la em cultura de células provenientes do pulmão de camundongos.

Seguindo o mesmo racional, nota-se que as células provenientes do pulmão também formam uma lâmina de fibroblastos e por cima há a aderência de células que aparentemente são macrófagos (Figura 11, Dia 6). O fato dessa cultura seguir por vários dias seleciona alguns tipos celulares mais aderentes e a troca do meio a cada dois ou três dias faz com que se elimine células que não estão aderidas e até “debris” celulares que estão no sobrenadante (Figura 11, Dia 12). Neste período percebe-se notadamente como os possíveis

macrófagos estão ancorados na camada de fibroblastos, que se forma junto ao fundo da garrafa de cultura, expressando arranjo similar ao que ocorre com a cultura de células do fígado (Figura 8, Dia 12).

Como a análise fotográfica da cultura é apenas um dos parâmetros da caracterização, a realização da citometria de fluxo foi de suma importância para determinar a população isoladas de células do pulmão, de acordo com o protocolo aplicado. Surpreendentemente, a população adquirida revelou características morfológicas bem homogêneas e dupla marcação para macrófagos (CD11b e F4/80) bem consistente (Figura 13), sendo de 98,52% o grau de pureza da amostra. O conjunto de resultados indicou de forma robusta a hipótese de que as células isoladas tratavam-se de macrófagos pulmonares, gerados a partir de uma metodologia comum a isolamento de KCs e micróglia.

Seguindo o racional do artigo de referência, o próximo passo foi testar o aspecto funcional desses possíveis macrófagos pulmonares. O primeiro ensaio realizado foi o de detectar a produção de citocinas frente ao estímulo pró-inflamatório (LPS) nas células isoladas e cultivadas *in vitro*. As citocinas IL-6 e TNF- α , apresentaram-se com altos níveis nos grupos estimulados com LPS Figura 14, sendo ambas relacionadas a resposta de reações pró-inflamatórias e conhecidamente secretada principalmente por macrófagos.

Outra característica avaliada foi a capacidade proliferativa frente a estímulo específico. Nesse caso o GM-CSF, que é uma proteína produzida por diversas células, atua como um fator de crescimento estimulando o aumento no número de células, sendo os macrófagos um dos principais alvos dessa molécula (Hamilton 2008). Os resultados apontam para uma maior proliferação celular no grupo das células isoladas estimuladas com GM-CSF Figura 15, reiterando a possibilidade dessas células serem macrófagos. Além disso, como o GM-CSF tem caráter inibitório na proliferação de fibroblastos (Fitzgerald, Chi et al. 2004), esse ensaio exclui a possibilidade dessas células isoladas serem predominantemente fibroblastos.

Dessa forma, como todos os experimentos realizados com os possíveis macrófagos pulmonares foram baseados nos testes elaborados por Kitani e colaboradores (Kitani, Takenouchi et al. 2010), obtivemos de maneira inédita resultados extrapolados da metodologia estabelecida pelos autores em células do fígado e já consolidada na literatura. Há de se ressaltar que, em relação às

avaliações de ensaios funcionais, serão investigadas, futuramente, a capacidade fagocítica e microbicida das células isoladas, atestando definitivamente a classificação como macrófagos pulmonares provenientes de cultura mista, possibilitando a publicação desses resultados em uma revista científica.

4.4 CONCLUSÃO

O protocolo de cultura mista de células hepáticas nos garantiu excelente grau de pureza das células de Kupffer, dentro dos padrões propostos por Kitani e colaboradores. No artigo citado, há a sugestão de que outros pesquisadores devam testar esse protocolo em outros órgãos. Nosso trabalho evidenciou pela primeira vez que este método é perfeitamente aplicável ao isolamento de macrófagos pulmonares.

Parte II

Para compararmos a reação das células provenientes do fígado e pulmão frente à estímulos e a infecção por *M. tuberculosis*, o número de macrófagos obtidas foi um desafio durante grande parte do tempo, acarretando alterações metodológicas. Desta forma, iniciou-se uma nova etapa de padronizações para a obtenção e utilização do conjunto celular de cada órgão. A nova metodologia estabelecida foi uma variação e composição das demais já empregadas e dos protocolos rotineiros seguidos pelo laboratório.

5. COMPARAÇÃO DO PERFIL DAS CÉLULAS PROVENIENTES DO FÍGADO E PULMÃO, ENVOLVIDOS NA RESOLUÇÃO DA INFECÇÃO POR *M. TUBERCULOSIS*

Levando em consideração que, apesar do alto grau de pureza produzido pela metodologia de cultura de células mistas de pulmão, seu rendimento foi baixo (por volta de 1×10^5 / garrafa / animal) e que o trabalho principal (projeto de pós-doutorado proc FAPESP 2011/07455-8) no qual este projeto está inserido visa avaliar a resposta imune *in vivo* contra Mtb induzida no fígado e pulmão, priorizou-se a realização de cultura celular com as células totais desses órgãos.

Dessa forma foram realizados experimentos para comparar a capacidade fagocítica e microbicida das células provenientes de cada órgão e averiguar se a prévia exposição a diferentes indutores de resposta imune alterariam esse panorama. Cada experimento era composto por duas placas de atividade fagocítica e microbicida e os resultados originados pela leitura da conversão da resazurina, totalizando 24 poços para cada parâmetro analisado e que estão descritos a seguir.

5.1. ATIVIDADE FAGOCÍTICA

A fagocitose conferida pelas células do fígado ou pulmão foi averiguada e será apresentada nesse tópico, sendo subdividido por órgão, contemplados em figuras diferentes e também analisadas em conjunto.

A avaliação da atividade fagocítica teve como objetivo observar o quanto de Mtb seria englobada pelas células dos órgãos de estudo frente à exposição de diferentes estímulos. Os estímulos denominados de M1 (IFN- γ e LPS) e M2 (IL-4 e IL-10) utilizados nesse trabalho, tem um papel associado a ativação ou inibição de macrófagos, porém nesse caso por se tratarem de células totais, essa estimulação torna-se muito mais complexa, uma vez que os outros tipos celulares participarão da rede de interação da resposta imune contra Mtb.

A observação será quanto ao número maior ou menor de micobactérias no interior das células. A etapa de lavagem desse protocolo garante a retirada de Mtb que não foi interiorizada (além das células não aderentes) e, por fim, a lise das células ali presentes ocasiona a liberação do patógeno fagocitado e

esse por sua vez converte a resazurina em resorufina, indicando assim quantitativamente a atividade metabólica presente nos poços da placa de cultura.

5.1.1. Atividade fagocítica das células do fígado

As células provenientes do fígado mostraram diferenças significativas quanto a sua capacidade de fagocitar as micobactérias. A figura 16 evidencia essas diferenças entre os grupos de células, além de revelar um panorama geral do experimento e de seus conjuntos de controles. Os estímulos utilizados, independente de ser M1 ou M2, potencializaram a capacidade das células de fagocitar o microrganismo. Entretanto, não há diferença estatística que sustente a hipótese de que os estímulos M1 e M2 modulem de forma distinta a atividade fagocítica nas células do fígado.

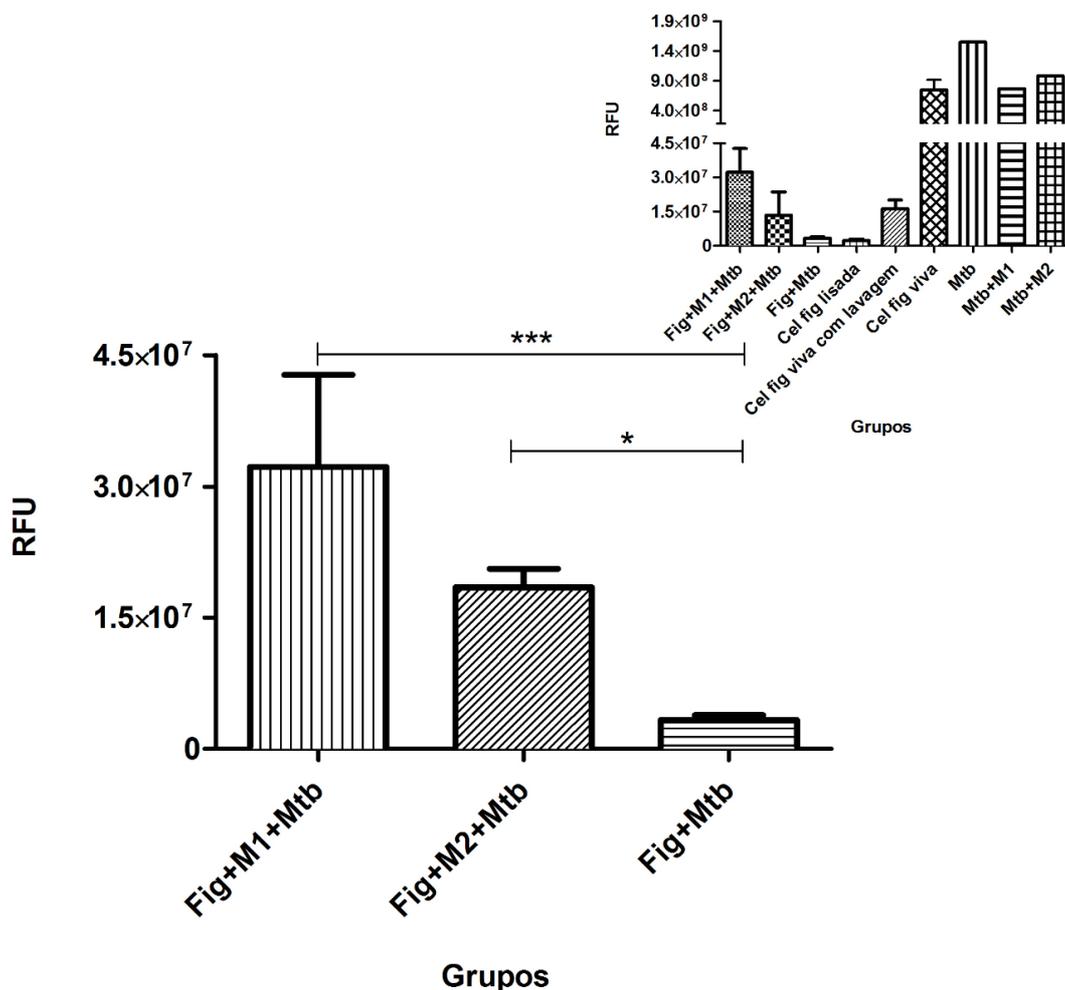


Figura 16: Atividade fagocítica das células do fígado. Dados da conversão de resazurina em grupos específicos das células do fígado e grupos controles, (já descontados os valores de leitura dos respectivos poços “background”). Trata-se de uma amostra representativa dos experimentos elaborados, tendo o “n” igual a 24 para cada parâmetro analisado. Grupos controles representados pelo gráfico menor. * p<0,05 e ***p<0,001

5.1.2. Atividade fagocítica das células do pulmão

As células dos pulmão responderam de forma distinta frente a estimulação. A figura 17 mostra os resultados das leituras da fagocitose dessas células, além um quadro geral junto com os grupos controles desse experimento. A análise estatística revelou que há diferenças na atividade fagocítica entre o grupo de células estimuladas com fatores considerados pró inflamatórios e os demais analisados. Desta forma, a estimulação com M1 foi responsável por tornar as células pulmonares mais propicias a fagocitar *Mtb*.

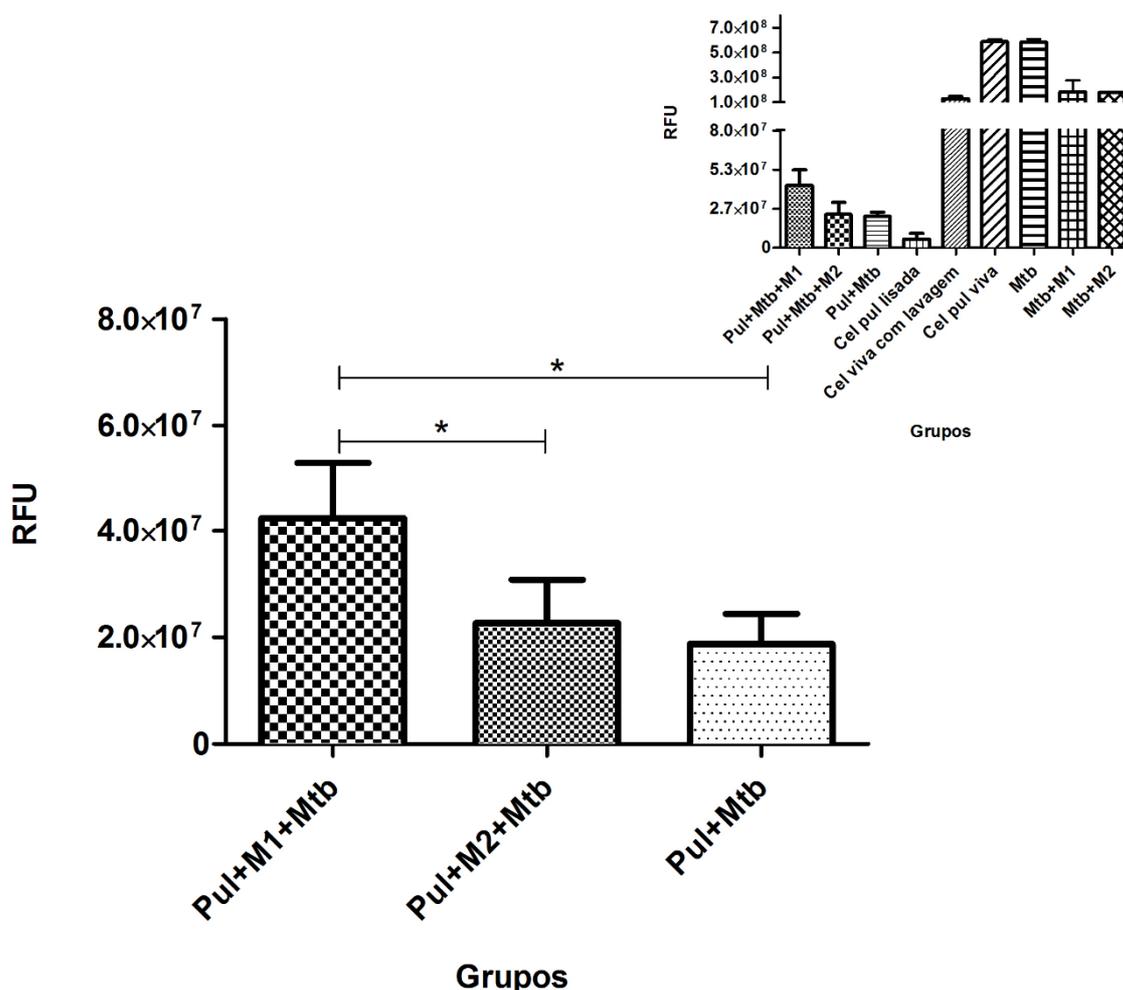


Figura 17: Atividade fagocítica das células do pulmão. Dados da conversão de resazurina em grupos específicos das células do pulmão e grupos controles, (já descontados os valores de leitura dos respectivos poços "background"). Trata-se de uma amostra representativa dos experimentos elaborados, tendo o "n" igual a 24 para cada parâmetro analisado. Grupos controles representados pelo gráfico menor. * p<0,05.

5.1.3. Comparação da atividade fagocíticas das células de ambos os órgãos

A atividade fagocítica dos órgãos de estudo aparentemente resultaram em diferenças. No entanto para observar e comparar essas variáveis foi necessário realizar uma razão entre os valores de células estimuladas pela média do grupo de células sem estímulos. Essa operação foi realizada para cada grupo de ambos os órgãos e permitiu a normalização dos valores e comparabilidade entre eles. A figura 18 revela as diferenças entre o fígado e pulmão, sendo que no fígado a influência de um fator de estimulação (M1 ou M2) altera de forma mais significativa a fagocitose. Somando a percepção da análise gráfica, a análise estatística mostra que o grupo de células do fígado tem uma atividade fagocítica maior que os grupos de células pulmonares.

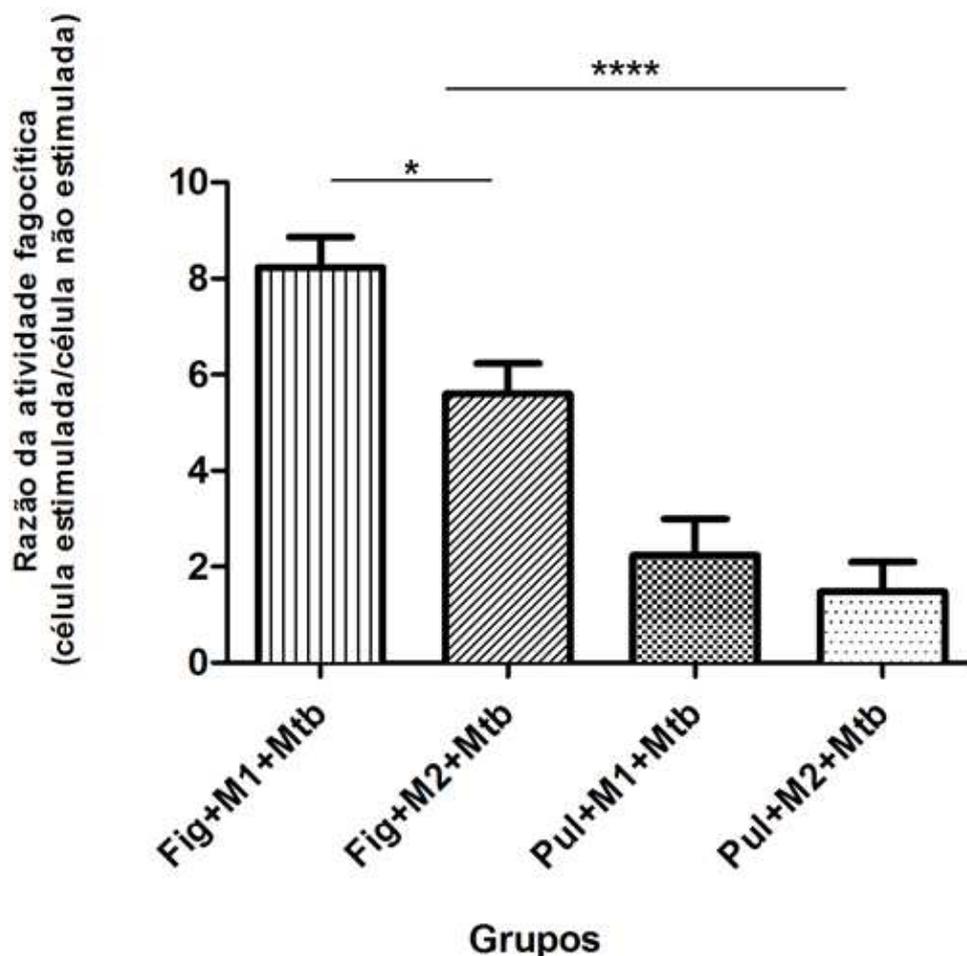


Figura 18: Comparação da atividade fagocítica das células hepáticas e pulmonares estimuladas frente a infecção por micobactéria. A razão entre as células estimuladas de cada órgão com as células não estimuladas de cada grupo foi realizado para que viabilizar a comparação das atividades de fagocitose de ambos os órgãos. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

5.2. ATIVIDADE MICROBICIDA

A capacidade das células em eliminar Mtb, aqui descrita como atividade microbicida, de cada órgão foi analisada através da conversão da resazurina em resorufina, indicando assim quantitativamente a atividade metabólica presente nos poços da placa de cultura. No entanto, esse valor absoluto deve ser subtraído da média da fagocitose (quantidade de bactérias que realmente estavam dentro da célula alvo), pois só assim é possível estabelecer o quão um dado grupo celular é capaz de eliminar o patógeno. Nesse sentido, os valores da atividade microbicida são expressos em porcentagem devido ao cálculo exigido, permitindo também que os grupos possam ser comparados entre si e entre os diferentes órgãos.

A avaliação da atividade microbicida teve como objetivo observar, de forma indireta, a capacidade das células aderentes em eliminar as micobactérias previamente fagocitadas, na ausência ou presença de diferentes estímulos. Desta forma, a capacidade microbicida conferida pelas células do fígado e pulmão foi averiguada e será apresentada nesse tópico, sendo subdividido por órgão, contemplados em figuras para análises posteriores.

5.2.1. Atividade microbicida das células do fígado

A atividade microbicida revelada pelas células do fígado mostraram diferenças estatísticas entre todos os grupos analisados. A figura 19 mostra como os fatores solúveis M1 e M2 modularam de forma distinta a capacidade microbicida das células provenientes do fígado. Os estímulos considerados reguladores (M2) auxiliaram de forma positiva a eliminação do Mtb, ou seja, as células que receberam esse tratamento aumentaram a sua capacidade microbicida, em comparação aos demais grupos desse órgão. De maneira análoga as células hepáticas que foram tratadas com fatores pró inflamatórios (M1) tiveram uma atividade microbicida superior ao grupo não estimulado.

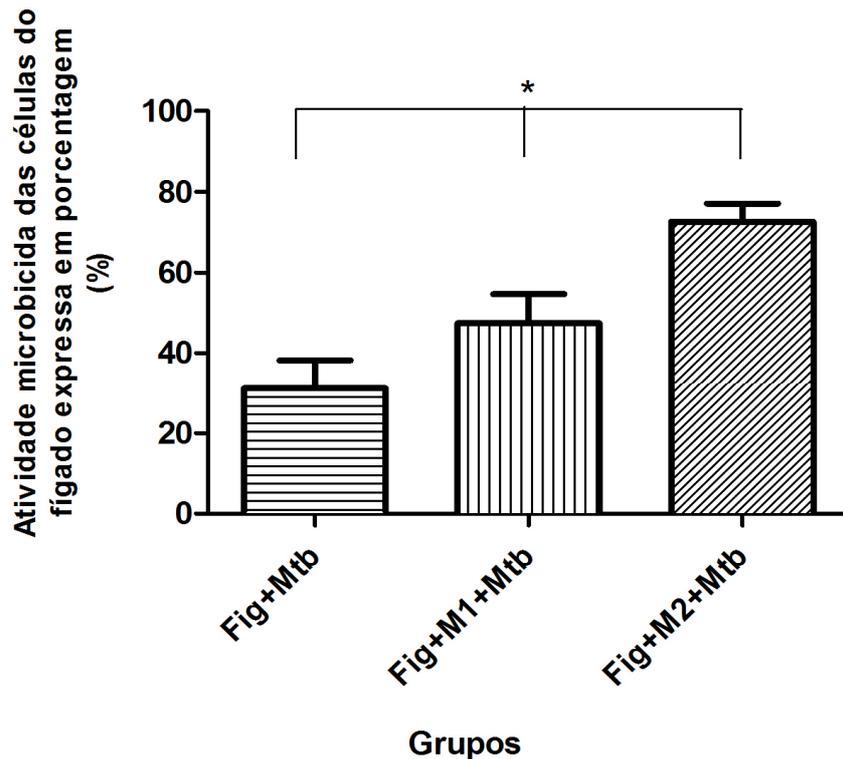


Figura 19: Atividade microbicida das células do fígado. Os valores referentes à atividade microbicida foram obtidos descontando o resultado de duas horas, correspondente à fagocitose, do resultado de 48 horas, correspondente à morte das bactérias fagocitadas. Esses resultados estão expressos em porcentagem e trata-se de uma amostra representativa dos experimentos elaborados, tendo o “n” igual a 24 para cada parâmetro analisado. * p<0,05

5.2.2. Atividade fagocítica das células do pulmão

As células pulmonares revelaram um comportamento distinto frente aos estímulos utilizados. A figura 20 expõe a atividade microbicida desses grupos de células em porcentagem, mostrando que quando as células foram tratadas com os fatores M2 a atividade microbicida foi inibida em relação às células não estimuladas

O grupo de células tratadas com os fatores M1 apesar de apresentarem um menor valor de atividade microbicida não é diferente do grupo sem estímulos, quando realizados os testes estatísticos, com nível de significância de cinco por cento.

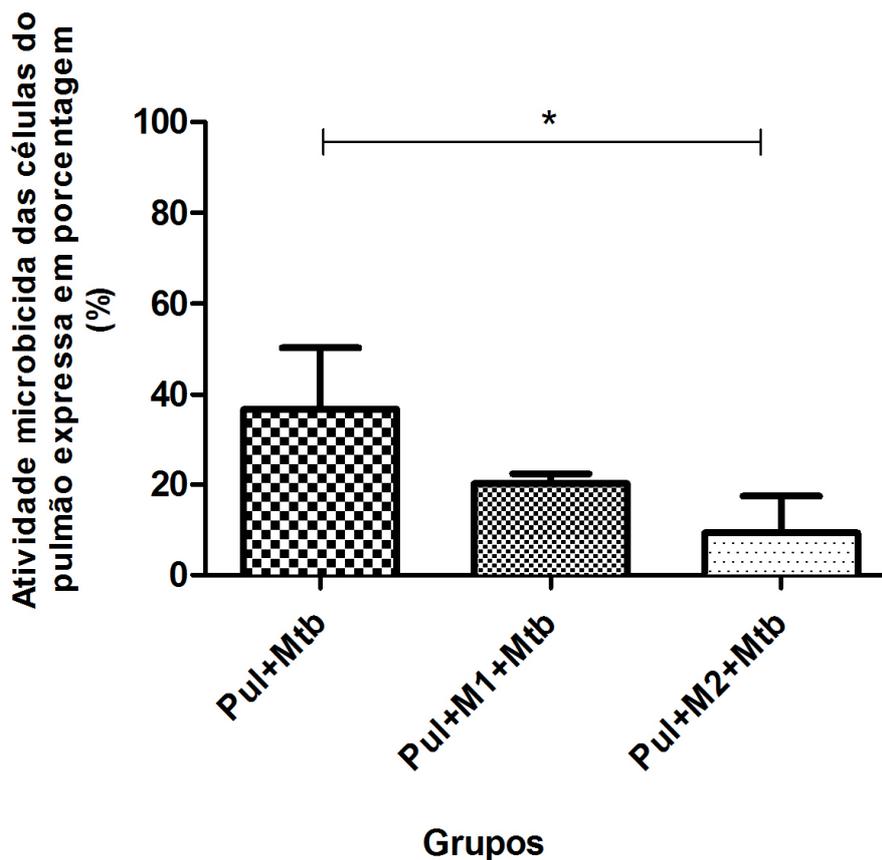


Figura 20: Atividade microbicida das células do pulmão. Os valores referentes à atividade microbicida foram obtidos descontando o resultado de duas horas, correspondente à fagocitose, do resultado de 48 horas, correspondente à morte das bactérias fagocitadas. Esses resultados estão expressos em porcentagem e trata-se de uma amostra representativa dos experimentos elaborados, tendo o “n” igual a 24 para cada parâmetro analisado. * $p < 0,05$

5.2.3. Comparação da atividade microbicida das células de ambos os órgãos

A observação e comparação da atividade microbicida dos órgãos estudados só foi possível após a realização de uma razão entre os valores obtidos a partir de células estimuladas, pela média do grupo de células sem estímulos. As figuras 19 e 20 já apresentavam uma aparente diferença entre a atividade microbicida do fígado e pulmão, no entanto, pela razão foi possível realizar uma análise estatística que permitisse afirmar tal distinção.

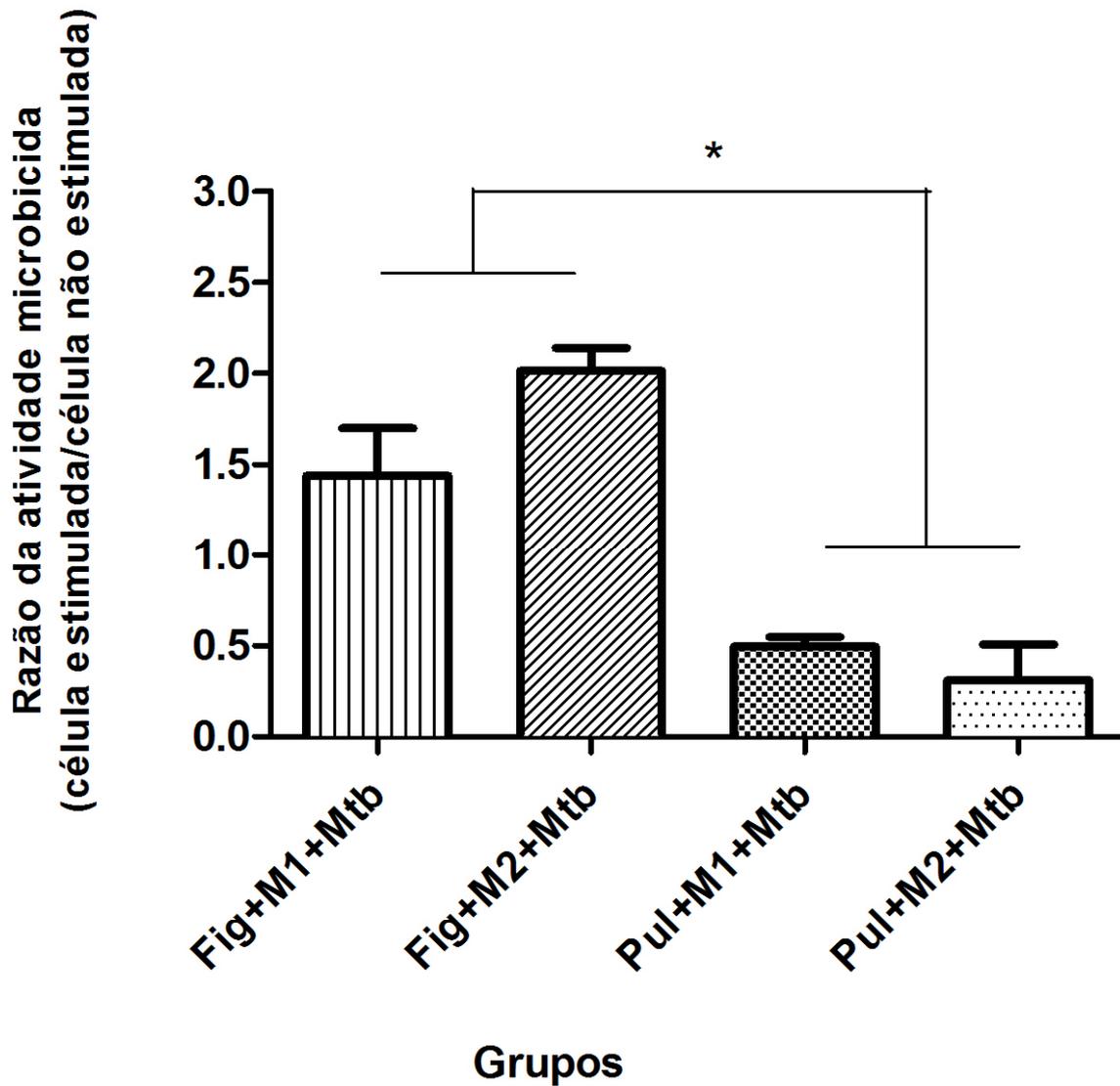


Figura 21: Comparação da atividade microbicida das células hepáticas e pulmonares estimuladas frente a infecção por micobactéria. A razão entre as células estimuladas de cada órgão com as células não estimuladas de cada grupo foi realizado para viabilizar a comparação das atividades de fagocitose de ambos os órgãos. * $p < 0,05$.

5.3. DISCUSSÃO

Com base em evidências apresentadas na literatura de que o fígado é um dos órgãos menos atingidos pela infecção pelo *Mtb*, apesar de receber constantemente aporte sanguíneo proveniente de todo o organismo, avaliamos neste trabalho se este fator seria explicado pela ativação diferencial das células de Kupfer, que garantiriam uma eficiente eliminação do bacilo no órgão. Na figura 16 é demonstrada a atividade fagocítica das células do fígado na presença de *Mtb*, quando estas células são diferenciadas no padrão M1, M2 ou não diferenciadas. Como pode-se observar, as células não diferenciadas do fígado tem baixa capacidade de fagocitar *Mtb*, o fato do fígado ser um órgão tolerogênico pode ter contribuído para esse tipo de atividade. Em situações fisiológicas, como o órgão entra constantemente em contato com antígenos não patogênicos, provenientes dos alimentos e microbiota, uma resposta imune exacerbada contra antígenos inofensivos poderia trazer prejuízos ao tecido (Tu *et al.*, 2008). No entanto, quando estimulado tanto por citocinas M1, quanto M2, observa-se o aumento significativo da sua capacidade fagocítica. Portanto, o fígado parece conciliar a capacidade tolerogênica com o importante papel de proteger o organismo de infecções. Desta forma, patógenos transmitidos pelo sangue e produtos bacterianos podem ser aprisionados e eliminados pelo fígado.

A rápida eliminação de antígenos a partir do sangue periférico é geralmente atribuída aos macrófagos hepáticos residentes, denominados células de Kupffer (KC), que revestem os sinusóides hepáticos (Cousens and Wing, 2000). Porém, estudos recentes indicam que a fagocitose por células de Kupffer não é o mecanismo principal pelo qual os organismos são eliminados. Em vez disso, a eliminação dependeria também da complexa interação de células de Kupffer e neutrófilos que estabelecem contato em resposta à infecção, e juntos eliminam o patógeno (Gregory and Wing, 2002). Baseado neste fato e na metodologia disponível, decidimos por trabalhar com as células totais do fígado, onde poderiam estar presentes neutrófilos e até mesmo de células natural killer (NK), que fazem parte da primeira linha de defesa. Após o tempo necessário para ocorrer a fagocitose, as células não aderentes foram eliminadas da cultura, assim como as bactérias não fagocitadas, e o resultado apresentado corresponde apenas às bactérias que foram interiorizadas pelas

células aderentes. Entretanto, a presença das demais células no início da cultura pode ter cooperado para o aumento da fagocitose observado.

Para entendermos a atividade fagocítica do fígado, avaliamos também a atividade de células do pulmão. O pulmão é um órgão que constantemente entra em contato com antígenos não próprios, provenientes do ar que entra pela via respiratória. A exposição a patógenos pela via respiratória geralmente culmina na sua eliminação pela imunidade inata, e na indução da resposta imune adaptativa, mais específica em conter futuras infecções. Como observamos na figura 17, os macrófagos proveniente do pulmão revelam que, mesmo sem estímulos, de forma basal, as células pulmonares tem alta capacidade de fagocitar *Mtb*. No entanto, quando essas células são estimuladas com fatores M1 essa capacidade é aumentada praticamente 2 vezes em relação aos demais grupos de estudo. Corroborando assim com a ideia de que estímulos M1 influenciam de forma significativa a resposta das células frente a esse patógeno, como foi mostrado anteriormente em outros trabalhos os quais evidenciaram que o crescimento da *Mtb* pode ser contido desde que haja a continua expressão de fatores pró-inflamatórios (Higgins *et al.*, 2009).

Desta forma, quando normalizamos e comparamos a atividade fagocítica entre os dois órgãos de estudo, observamos significativas diferenças (Figura 18). Analisando o quanto os estímulos M1 e M2 influenciam a capacidade fagocítica, temos que o fígado altera consideravelmente o seu perfil de acordo com o microambiente, enquanto o pulmão parece ser menos influenciado pela modulação. A fagocitose basal por células não diferenciadas era baixa, mas o prévio contato das células hepáticas com os fatores de diferenciação, principalmente com M1 potencializou bastante a atividade fagocítica das células, de tal forma que, quando em contato com *Mtb* elas reagem prontamente auxiliando na fagocitose desse antígeno. Por outro lado, no pulmão, a fagocitose basal das células não estimuladas já era bastante elevada e o estímulo para diferenciação celular induziu um pequeno aumento na fagocitose e ainda, não houve diferença quando utilizamos um microambiente de diferenciação M1 ou M2.

Além da atividade fagocítica, avaliamos a atividade microbicida. Observamos, surpreendentemente, que apesar do estímulo M1 induzir maiores

taxas de fagocitose, é sob estímulo M2 que as células apresentaram maior capacidade de eliminar os bacilos. Esse achado corrobora com o fato de que por se tratar de um órgão mais tolerogênico, fatores como o M2 podem auxiliar de forma mais significativa a morte da micobactéria. Tal evidencia é antagônica ao que se espera da modulação provocada por esses estímulos. No entanto, o fígado de animais infectados com tuberculose apresentam uma recuperação de unidades formadoras de colônia em torno de 1.000 a 10.000 vezes menor do que o encontrado no baço e pulmão (Zarate-Blades *et al.*, 2009). Em nosso protocolo experimental, durante o tempo de fagocitose do *Mtb*, a cultura compreende células totais do órgão, que são retiradas da cultura apenas duas horas após a infecção *in vitro*. Sugerimos então, que durante este tempo as demais células em cultura possam ter produzido mediadores que contribuíram para a eliminação do patógeno. Curiosamente, as células pulmonares apresentaram um comportamento muito distinto, embora esteja descrito na literatura que o fator M1 esteja relacionado com a contensão e eliminação da *Mtb*, a atividade fagocítica desse grupo não se mostrou diferente dos demais.

O quadro comparativo da capacidade microbicida de ambos os órgãos de estudo evidenciou as diferenças descritas. Sendo que novamente os estímulos possuem maior influência sobre as células do fígado, enquanto que as células pulmonares sofreram uma redução de atividade microbicida com a ação dos mesmos. Os resultados obtidos podem estar associados à diferença no número de células que permaneceram aderidas após a lavagem para retirada das bactérias que não foram fagocitadas e que também retira as células não aderentes. O número total de células plaqueadas foi sempre o mesmo, mas neste protocolo, a proporção de macrófagos presentes neste “pool” celular pode ser diferente entre os órgãos. De forma que, diferenças na proporção de macrófagos presente em cada órgão pode ter refletido na capacidade microbicida do mesmo, juntamente com o outro fator de interferência já citado, que é a participação de outros grupos celulares nas 2 primeiras horas de cultura.

A nova metodologia permitiu-nos observar a atividade do órgão como um todo, favorecendo assim as interações que pode ocorrer entre todas as células ali presentes, até o momento da fagocitose. Essa observação da ação das células totais do órgão como um todo, se aproxima em partes, do modelo

in vivo de infecção, e posteriormente poderá ser relacionado com outro trabalho *in vivo* realizado em nosso laboratório.

5.4. CONCLUSÃO

Nosso trabalho mostrou que os estímulos M1 e M2 modulam de forma distinta as diversas funções das células do fígado e do pulmão. Demonstramos portanto, que as atividades celulares podem sofrer influências diferentes devido às particularidades de cada órgão. Assim, concluímos que as células do pulmão num estado basal fagocitam melhor as bactérias do que as do fígado, mas que as células do fígado respondem numa maior grandeza aos estímulos M1 e M2 para fagocitar o bacilo.

Entretanto, o fígado apresenta alta capacidade microbicida e ainda, apesar dos macrófagos M1 fagocitarem melhor, os macrófagos M2 do fígado foram mais capazes de matar o bacilo, em nossos estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOSTOLOU, I. et al. Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 9, p. 5141-6, Apr 27 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10220432 >.

BARKER, L. F. et al. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 331-8, Jun 2009. ISSN 1879-0372. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505813> >.

BEAN, A. G. et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J Immunol**, v. 162, n. 6, p. 3504-11, Mar 1999. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092807> >.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889-96, Oct 2010. ISSN 1529-2916. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856220> >.

BRYK, R. et al. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1073-7, Feb 2002. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11799204> >.

COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**, v. 103, n. 1, p. 1-9, May 2001. ISSN 0019-2805. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380686> >.

COOPER, A. M.; KHADER, S. A. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. **Immunol Rev**, v. 226, p. 191-204, Dec 2008. ISSN 1600-065X (Electronic). Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19161425 >.

COUSENS, L. P.; WING, E. J. Innate defenses in the liver during Listeria infection. **Immunol Rev**, v. 174, p. 150-9, Apr 2000. ISSN 0105-2896. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807514> >.

CRISPE, I. N. The liver as a lymphoid organ. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 147-63, 2009. ISSN 0732-0582 (Print). Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19302037 >.

DAIGLE, R. et al. Theoretical investigations of nitric oxide channeling in Mycobacterium tuberculosis truncated hemoglobin N. **Biophys J**, v. 97, n. 11, p. 2967-77, Dec 2009. ISSN 1542-0086. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19948126> >.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir Med**, v. 100, n. 11, p. 1862-70, Nov 2006. ISSN 0954-6111. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949809> >.

DHEDA, K. et al. In vivo and in vitro studies of a novel cytokine, interleukin 4 delta 2, in pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 4, p. 501-508, AUG 15 2005 2005. ISSN 1073-449X.

EXLEY, M. A.; KOZIEL, M. J. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. **Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 1033-40, Nov 2004. ISSN 0270-9139. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486982> >.

FLODEN, A. M.; COMBS, C. K. Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype. **J Neurosci Methods**, v. 164, n. 2, p. 218-24, Aug 2007. ISSN 0165-0270. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553568> >.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: living with the enemy. **Curr Opin Immunol**, v. 15, n. 4, p. 450-5, Aug 2003. ISSN 0952-7915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900278> >.

FLYNN, J. L.; ERNST, J. D. Immune responses in tuberculosis. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 4, p. 432-6, Aug 2000. ISSN 0952-7915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899019> >.

FLYNN, J. L. et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. **Immunity**, v. 2, n. 6, p. 561-72, Jun 1995. ISSN 1074-7613 (Print)
1074-7613 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540941> >.

GAGNEUX, S. et al. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 8, p. 2869-73, Feb 2006. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16477032> >.

GANDHI, N. R. et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet**, v. 375, n. 9728, p. 1830-43, May 2010. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488523> >.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-61, Feb 2010. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133564> >.

GREGORY, S. H.; WING, E. J. Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections. **Immunol Today**, v. 19, n. 11, p. 507-10, Nov 1998. ISSN 0167-5699 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9818544 >.

_____. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 2, p. 239-48, Aug 2002. ISSN 0741-5400 (Print). Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12149414 >.

GROUX, H. et al. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. **J Exp Med**, v. 184, n. 1, p. 19-29, Jul 1996. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691133> >.

GUILLEMIN, G. J.; BREW, B. J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 3, p. 388-97, Mar 2004. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612429> >.

GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog**, v. 1, n. 1, p. e5, Sep 2005. ISSN 1553-7366. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16201017> >.

HAMILTON, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 533-44, Jul 2008. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551128> >.

HASSAN, N. F. et al. Isolation and flow cytometric characterization of newborn mouse brain-derived microglia maintained in vitro. **J Leukoc Biol**, v. 50, n. 1, p. 86-92, Jul 1991. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2056249> >.

HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 90, n. 4, p. 607-17, Apr 1997. ISSN 0019-2805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9176116> >.

HERSHKOVITZ, I. et al. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3426, 2008. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923677> >.

HIGGINS, D. M. et al. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 89, n. 2, p. 149-57, Mar 2009. ISSN 1873-281X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19213603> >.

HIRSH, A. E. et al. Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 14, p. 4871-6, Apr 2004. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041743> >.

JOUANGUY, E. et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. **N Engl J Med**, v. 335, n. 26, p. 1956-61, Dec 1996. ISSN 0028-4793. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8960475> >.

KAUFMANN, S. H. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 6, p. 2272-9, Mar 19 1996. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8637862 >.

_____. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, Oct 2001. ISSN 1474-1733. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905811> >.

KAUFMANN, S. H.; SCHAIBLE, U. E. A dangerous liaison between two major killers: Mycobacterium tuberculosis and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. **J Exp Med**, v. 197, n. 1, p. 1-5, Jan 2003. ISSN 0022-1007. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12515808> >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010. ISSN 1529-2916. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404851> >.

KITANI, H. et al. A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells. **J Immunol Methods**, v. 360, n. 1-2, p. 47-55, Aug 31 2010. ISSN 1872-7905 (Electronic)

0022-1759 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600081> >.

KNOLLE, P. et al. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. **J Hepatol**, v. 22, n. 2, p. 226-9, Feb 1995. ISSN 0168-8278. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790711> >.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes Infect**, v. 10, n. 9, p. 995-1004, Jul 2008. ISSN 1286-4579. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762264> >.

LAUWERYS, B. R. et al. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. **J Immunol**, v. 165, n. 4, p. 1847-53, Aug 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print). Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10925263 >.

LIN, Y. et al. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. **Infect Immun**, v. 64, n. 4, p. 1351-6, Apr 1996. ISSN 0019-9567. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8606100> >.

LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-3, Mar 2006. ISSN 1095-9203. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497887> >.

MACPHEE, P. J.; SCHMIDT, E. E.; GROOM, A. C. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. **Am J Physiol**, v. 269, n. 5 Pt 1, p. G692-8, Nov 1995. ISSN 0002-9513. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7491960> >.

MILANI, M. et al. Mycobacterium tuberculosis hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O₂ diffusion to the heme. **EMBO J**, v. 20, n. 15, p. 3902-9, Aug 2001. ISSN 0261-4189. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483493> >.

MINISTÉRIO_DA_SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>. 2013. Accessed on: 03/01/2013.

NEYROLLES, O.; GICQUEL, B.; QUINTANA-MURCI, L. Towards a crucial role for DC-SIGN in tuberculosis and beyond. **Trends Microbiol**, v. 14, n. 9, p. 383-7, Sep 2006. ISSN 0966-842X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876999> >.

NGUYEN, L.; PIETERS, J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 5, p. 269-76, May 2005. ISSN 0962-8924. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866031> >.

NIEMANN, J.; TISA, L. S. Nitric oxide and oxygen regulate truncated hemoglobin gene expression in Frankia strain Ccl3. **J Bacteriol**, v. 190, n. 23, p. 7864-7, Dec 2008. ISSN 1098-5530. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820019> >.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 599-623, 2004. ISSN 0732-0582 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15032590 >.

OTTENHOFF, T. H.; KUMARARATNE, D.; CASANOVA, J. L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunol Today**, v. 19, n. 11, p. 491-4, Nov 1998. ISSN 0167-5699 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9818540 >.

OTTENHOFF, T. H. et al. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 85, n. 1-2, p. 53-64, 2005 Jan-Mar 2005. ISSN 1472-9792. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15687028> >.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S54-62, Feb 2006. ISSN 0270-9139 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16447271 >.

RAVIGLIONE, M. C. The Global Plan to Stop TB, 2006-2015. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 10, n. 3, p. 238-9, Mar 2006. ISSN 1027-3719. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16562699> >.

ROLAND, C. R. et al. Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. **Transplantation**, v. 55, n. 5, p. 1151-8, May 1993. ISSN 0041-1337. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388586> >.

_____. Outcome of Kupffer cell antigen presentation to a cloned murine Th1 lymphocyte depends on the inducibility of nitric oxide synthase by IFN-gamma. **J Immunol**, v. 153, n. 12, p.

5453-64, Dec 1994. ISSN 0022-1767. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527442> >.

ROTH, A. E. et al. Beneficial non-targeted effects of BCG--ethical implications for the coming introduction of new TB vaccines. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 86, n. 6, p. 397-403, Nov 2006. ISSN 1472-9792 (Print)

1472-9792 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901755> >.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 374-80, Aug 2005. ISSN 0952-7915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963709> >.

SEKI, S. et al. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. **Immunol Rev**, v. 174, p. 35-46, Apr 2000. ISSN 0105-2896. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807505> >.

SETIA, M. S. et al. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 3, p. 162-70, Mar 2006. ISSN 1473-3099. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500597> >.

SHETH, K.; BANKEY, P. The liver as an immune organ. **Curr Opin Crit Care**, v. 7, n. 2, p. 99-104, Apr 2001. ISSN 1070-5295 (Print). Available at: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11373518 >.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 787-95, Mar 2012. ISSN 1558-8238. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378047> >.

_____. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-795, MAR 2012 2012. ISSN 0021-9738.

SREEVATSAN, S. et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 18, p. 9869-74, Sep 1997. ISSN 0027-8424. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9275218> >.

SUGAMA, S. et al. Possible roles of microglial cells for neurotoxicity in clinical neurodegenerative diseases and experimental animal models. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 8, n. 4, p. 277-84, Sep 2009. ISSN 2212-4055. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754411> >.

SVENSON, S. et al. Towards new tuberculosis vaccines. **Hum Vaccin**, v. 6, n. 4, p. 309-17, Apr 2010. ISSN 1554-8619. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372087> >.

TAILLEUX, L. et al. How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by Mycobacterium tuberculosis. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 259-63, Jun 2003. ISSN 0966-842X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823942> >.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 3, p. 323-34, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1806-3756. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906795> >.

TING, L. M. et al. Mycobacterium tuberculosis inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. **J Immunol**, v. 163, n. 7, p. 3898-906, Oct 1999. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490990> >.

TU, Z. et al. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells. **J Exp Med**, v. 205, n. 1, p. 233-44, Jan 2008. ISSN 1540-9538. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18195076> >.

ULRICHS, T. et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. **J Pathol**, v. 204, n. 2, p. 217-28, Oct 2004. ISSN 0022-3417 (Print)

0022-3417 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15376257 >.

WHO. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**. World Health Organization. Geneva, Switzerland: 2008, p.304. 2008

YU, S.; NAKAFUSA, Y.; FLYE, M. W. Portal vein administration of donor cells promotes peripheral allospecific hyporesponsiveness and graft tolerance. **Surgery**, v. 116, n. 2, p. 229-34; discussion 234-5, Aug 1994. ISSN 0039-6060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8047989> >.

ZARATE-BLADES, C. R. et al. Comprehensive gene expression profiling in lungs of mice infected with Mycobacterium tuberculosis following DNAhsp65 immunotherapy. **J Gene Med**, v. 11, n. 1, p. 66-78, Jan 2009. ISSN 1521-2254 (Electronic). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19035575 >.

ZINK, A. et al. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 355-66, Apr 2001. ISSN 0022-2615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289521> >.

7. Anexo A

Multiplicidade de infecção (MOI)

A multiplicidade de infecção é um procedimento que visa estabelecer quantas micobactérias devem ser inseridas na cultura por células. Desta forma, foi elaborado um ensaio usando a técnica da resazurina, em que as micobactérias fagocitadas convertem a resazurina em resorufina através da sua atividade metabólica da Mtb. A obtenção celular e a infecção seguiram o protocolo descrito na metodologia, o que diferiu foi o desenho da placa de cultura que nesse experimento apresentava um gradiente com as micobactérias, assim como na figura abaixo.

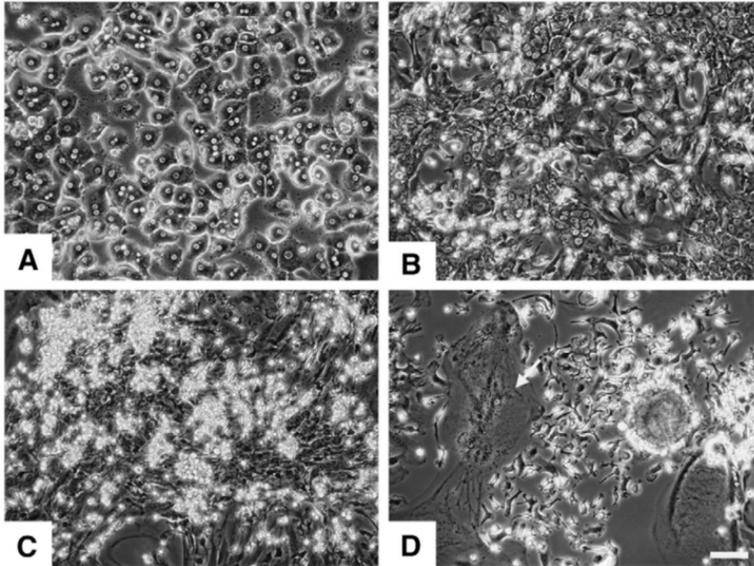
		Fígado				Pulmão							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Infecção com <i>M. tuberculosis</i>	A	Cél.	10Mtb:1 célula			Cél.	10Mtb:1 célula					Mtb	(10:1)
	B	Cél.	5Mtb:1 célula			Cél.	5Mtb:1 célula					Mtb	(5:1)
	C	Cél.	2,5Mtb:1 célula			Cél.	2,5Mtb:1 célula					Mtb	(2,5:1)
	D	Cél.	1Mtb:1 célula			Cél.	1Mtb:1 célula					Mtb	(1:1)
	E	Cél.	Viva			Cél.	Viva						
	F	Cél.	Lisada			Cél.	Lisada						
	G		Saponina				Saponina						
	H		Meio				Meio						

Figura 10: Desenho da placa de cultura da multiplicidade de infecção (MOI).

Por fim, com os resultados provenientes da leitura da resazurina percebemos que o ideal para a interação com as células alvo desse estudo é utilizar 10 Mtb por célula. Logo, cada poço deve conter 1×10^6 micobactérias.

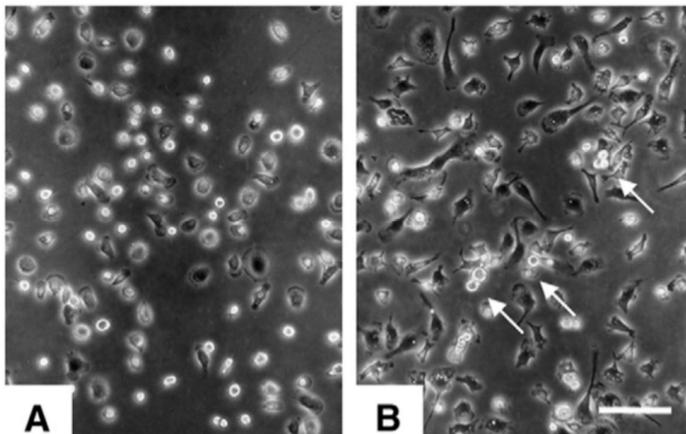
8. FIGURAS SUPLEMENTARES (fonte: Kitani e colaboradores 2010):

S1



Primary culture of rat liver cells and proliferation of macrophage-like cells on the fibroblastic cell sheet. After one day of culture, parenchymal hepatocytes spread on the flask's surface, and showed typical polygonal cobblestone-like morphology with one or two round nuclei (A). Parenchymal hepatocytes lost their epithelial cell morphology within a few days in culture, and transformed into more flattened fibroblastic cells. Around day 6, phase contrast-bright, round macrophage-like cells started to proliferate on the fibroblastic cell sheet (B). The growth of the macrophage-like cells continued and reached maximum levels around day 12 (C). The number of macrophage-like cells declined around day 19, when the fibroblastic cell sheet also started to degenerate (D). Colonies of macrophage-like cells occupied empty spaces of the culture flask, and multinuclear giant cells were observed (D, arrow). Scale bar = 100 μ m.

S2



Selective isolation of macrophage-like cells by the shaking and attachment method. Cells were suspended into the culture medium by shaking the flasks, subsequently transferred into non-tissue culture grade plastic dishes, and incubated at 37 °C. As early as 10 min after plating, macrophage-like cells attached to the dish surface (A), while other contaminating fibroblastic cells remained suspended. After rinsing with PBS, a highly purified macrophage population was obtained. These cells gained typical macrophage morphology after 40 min of culture (B), and mitotic cells were frequently observed (arrows).