

EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS IMATURAS DA POLPA DE
DENTE HUMANO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA
POR *Mycobacterium tuberculosis*

Gislane de Almeida Santos

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Campos dos Goytacazes-RJ
Março de 2018

EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS IMATURAS DA POLPA DE
DENTE HUMANO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA
POR *Mycobacterium tuberculosis*

Gislane de Almeida Santos

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-graduação em
Biotecnologia e Biociências do
Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia.

Orientadora: Dr.^a Elena Lassounskaia

Coorientador: Dr. Fabrício Moreira Almeida

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Campos dos Goytacazes-RJ

Março de 2018

EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS IMATURAS DA POLPA DE
DENTE HUMANO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA
POR *Mycobacterium tuberculosis*

Gislane de Almeida Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em, 01 de março de 2018.

Banca Examinadora:

Dr.^a Andrea Cristina Vetö Arnholdt – LBR/CBB/UENF
Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica) (UFRJ – Brasil)

Dr. Renato Augusto DaMatta – LBCT/CBB/UENF
Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica) (UFRJ – Brasil)

Dr.^a Regina Célia de Souza Campos Fernandes – FMC
Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias (UFRJ – Brasil)

Dr.^a Elena Lassounskaia – LBR/UENF (Orientadora)
Doutora em Imunologia (IEM – Rússia)

EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS IMATURAS DA POLPA DE DENTE HUMANO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA INFECÇÃO POR *Mycobacterium tuberculosis*

Gislane de Almeida Santos

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Elena Lassounskaia e coorientação do Dr. Fabrício Moreira Almeida, em colaboração com a Dr.^a Irina Kerkis do Laboratório de Genética, Instituto Butantan.

Apoio

- UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- LBR – Laboratório de Biologia do Reconhecer
- IB – Instituto Butantan
- FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Dedico este trabalho aos meus pais Jorge e Eliane e ao meu irmão George por todo o amor e apoio. Dedico também a todos aqueles que se desafiam a sair da sua zona de conforto para ir em busca dos seus sonhos.

Agradecimentos

- ✓ Primeiramente à Deus por ser meu guia e estar sempre à frente de todos os meus planos e sonhos;
- ✓ Aos meus pais Jorge e Eliane e meu irmão George, por serem minha motivação para conquistar todos os meus objetivos;
- ✓ Ao meu namorado Joaquim, por ser meu amor e melhor amigo. Por me apoiar sempre, por ser meu companheiro na discussão de artigos, de viagens, por compartilhar ideias, por me acompanhar aos finais de semana e feriados na UENF para fazer experimentos, por me fazer rir e ser minha melhor companhia pra maratona séries;
- ✓ À Prof.^a. Elena pela orientação desde a iniciação científica, por todos os ensinamentos que me ajudaram a crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Ser orientada pela senhora durante esses anos foi “muita” bom!!!
- ✓ Ao Fabrício, pela coorientação desde a iniciação científica, pela amizade, por sofrer comigo nos experimentos, por me ajudar a buscar soluções, por compartilhar ideias por me incentivar a não desistir. Seu “Não tem problema não” as vezes (só as vezes) é reconfortante!
- ✓ A Dr.^a Irina Kerkis pela colaboração e pelo importante suporte financeiro durante o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada por abrir as portas do seu laboratório sempre que precisei aprender ou realizar algum experimento;
- ✓ Ao grupo de pesquisa Elenetes: Giliane, Andreza, Nina, Igor, Anderson, Letícia e Efranci por todos os momentos de alegria, de muitas risadas e de apertos que passamos juntos no laboratório ou em viagens para congressos. Conviver com vocês me fez crescer e aprender a lidar com as diferenças. Agradecimento especial ao grupinho de horas e horas de trabalho no NB3: Fabrício, Thatiana, Sanderson e Vinícius por toda a ajuda nos experimentos *in vivo*;
- ✓ Aos técnicos Núbia, Verônica, Rita e Fernando por todo o suporte durante o desenvolvimento deste projeto;
- ✓ A técnica Juliana Azevedo por toda a ajuda com as aquisições e análises de citometria;
- ✓ A técnica Elisabete do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA/UENF), que ajudou no processamento e preparo dos tecidos para as técnicas de imunohistoquímica;

- ✓ Ao Eduardo Osório Frare, por isolar e cultivar as células-tronco humanas utilizadas neste projeto e ao Dener Madeiro de Souza, por me ensinar diversas técnicas de histologia. Agradeço também pelas risadas, por toda a ajuda nos experimentos e por sempre me receberem no Instituto Butantan com muito carinho e atenção, fazendo com que eu me sinta em casa;
- ✓ Aos meus amigos William, Larissa, Isabella, Tayane, Viviane Campos, Viviane Franco, Fernanda, Gabriela, Matheus, Luíza, Luan e Gabriel por fazerem parte dos melhores momentos que vivi na UENF e por proporcionarem as melhores histórias que um dia contarei aos meus filhos (ou não);
- ✓ Aos Professores Dr. Renato Augusto DaMatta, Dr.^a Andrea Cristina Veto Arnholdt e Dr.^a Regina Célia de Souza Campos Fernandes por aceitarem fazer parte da banca examinadora e a Dr.^a Thaís Louvain de Souza por revisar esta dissertação.
- ✓ A todos os professores e integrantes do LBR que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto;
- ✓ Aos que me apoiaram, me incentivaram e me ajudaram de alguma forma na realização deste projeto: Muito obrigada!!!

Sumário

Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Epidemiologia da Tuberculose	1
1.2. Diagnóstico, prevenção e tratamento.....	3
1.3. Imunopatologia da tuberculose	5
1.4. Células-tronco mesenquimais e suas propriedades imunomoduladoras	9
1.5. CTMs e terapia adjuvante da TB.....	12
1.6. Indoleamina 2,3-dioxigenase como um mecanismo regulatório utilizado pelas CTMs	14
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivos gerais	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Cultivo de células-tronco imaturas da polpa de dente humano (CTIPDh)....	17
3.2. Cocultivo das CTIPDh e macrófagos RAW 264.7	17
3.3. Animais	18
3.4. Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
3.5. Infecção dos Camundongos.....	19
3.6. Tratamento dos camundongos infectados com as CTIPDh	19
3.7. Crescimento bacteriano <i>in vivo</i> e histopatologia	20
3.8. Imunohistoquímica	20
3.9. Isolamento das células pulmonares	21
3.10. Cocultivo de CTIPDh e células isoladas do pulmão de camundongos infectados.....	22
3.11. Cultura <i>ex vivo</i> e dosagem de citocinas	22
3.12. Avaliação da população celular por citometria de fluxo.....	22
3.13. Análises estatísticas.....	24
4. Delineamento experimental	25
5. Resultados.....	26
5.1. Efeitos das CTIPDh na produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados <i>in vitro</i> ;	26

5.2. Análise do perfil de citocinas produzidas <i>ex vivo</i> pelas células extraídas dos pulmões dos camundongos com ou sem tuberculose experimental (TB ⁻ e TB ⁺) em cocultivo com CTIPDh.....	27
5.3. Avaliação do crescimento bacteriano no pulmão e morbidade dos animais TB ⁺ CTIPDh ⁻ e TB ⁺ CTIPDh ⁺ após 28 dias de infecção	29
5.5. Análise da composição celular do infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos infectados por Mtb e tratados com CTIPDh.....	33
5.6. Análise do perfil de citocinas produzidas <i>ex vivo</i> pelas células dos pulmões dos camundongos infectados sob o efeito do tratamento com CTIPDh.....	36
6. Discussão	38
7. Conclusões	42
8. Referências.....	44
9. Anexos.....	53

Lista de figuras

Figura 1. Estimativa da taxa de incidência de Tuberculose no mundo no ano de 2016.	1
Figura 2. Coeficiente de incidência de tuberculose por Unidade Federada em 2015.	2
Figura 3. Estimativa da taxa de incidência de TB-RMD no mundo no ano de 2016...	3
Figura 4. Resposta Imunológica ao Mtb e formação do granuloma	6
Figura 5. Principais características da tuberculose: da infecção à defesa do hospedeiro	7
Figura 6. Estrutura e constituintes celulares do granuloma na tuberculose	8
Figura 7. Processo de diferenciação celular a partir de células-tronco mesenquimais para diversas linhagens celulares	10
Figura 8. Um resumo da gama de proteínas solúveis e de superfície celular que estão envolvidos nas atividades biológicas das CTMs	12
Figura 9. Estratégia de análise das subpopulações de leucócitos mielóides nos pulmões dos camundongos	23
Figura 10. Delineamento experimental do tratamento com CTIPDh dos camundongos C57BL/6 infectados com Mtb.	25
Figura 11. Avaliação da produção de citocinas mediadores pro- e anti-inflamatórios por macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados em cocultura com células-tronco imaturas de polpa de dente (CTIPDh)	27
Figura 12. Avaliação da produção de citocinas em cocultura de células extraídas do pulmão dos camundongos infectados e células-tronco imaturas de polpa de dente (CTIPDh)	28
Figura 13. Crescimento bacteriano nos pulmões e morbidade de camundongos C57BL/6 infectados com <i>M. tuberculosis</i> e tratados ou não tratados com CTIPDh .	29
Figura 14. Macropatologia pulmonar dos camundongos C57BL/6 no dia 28 p.i. com <i>M. tuberculosis</i> e tratados com células CTIPD humanas	30
Figura 15. Histopatologia e expressão deIDO pelas células do pulmão de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i> e tratados com células CTIPD humanas	32
Figura 17. Recrutamento de células mielóides na fase aguda da infecção nos pulmões de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i> e tratados ou não tratados com CTIPDh	34

Figura 18. Recrutamento de células-tronco mesenquimais intrínsecas na fase aguda da infecção nos pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e tratados ou não tratados com CTIPDh.....35

Figura 19. Produção de citocinas pelas células dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com *M. tuberculosis* e tratados ou não tratados com CTIPDh . 37

Lista de abreviaturas

- ❖ ADC – Albumina, dextrose e catalase
- ❖ AIDS – Síndrome da Imunodeficiência adquirida
- ❖ APCs- Células apresentadoras de antígenos
- ❖ BCG – Bacilo de Calmété-Guérin
- ❖ CBA – *Cytometric Beads Array*
- ❖ CCL - Quimiocina ligante (motivo C-C)
- ❖ CD - Grupamento de diferenciação
- ❖ CIP – Células isoladas do pulmão
- ❖ CTIPD – Células-tronco imaturas da polpa de dente
- ❖ CTIPDh - Células-tronco imaturas da polpa de dente humano
- ❖ CTMS – Células-tronco mesenquimais
- ❖ CXCL- Quimiocina ligante (motivo C-X-C)
- ❖ DMEM-F12 – Meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium F12*
- ❖ DO - Densidade ótica
- ❖ DOTS – Terapia de observação direta a curto prazo
- ❖ ESAT-6 – Alvo antigênico de secreção inicial 6 kDa
- ❖ HGF- Fator de crescimento de hepatócitos
- ❖ HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- ❖ HLA – Antígeno leucocitário humano
- ❖ IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase
- ❖ IFN - Interferon
- ❖ IHC - Imunohistoquímica
- ❖ IL - Interleucina
- ❖ KGF - Fator de crescimento de queratinócitos
- ❖ L.BCG – Lisado de bacilo Calmete-Guérin
- ❖ LPS - Lipopolissacarídeos
- ❖ Ly6C - Complexo de antígeno linfocitário 6, locus C
- ❖ Ly6G - Complexo de antígeno linfocitário 6, locus G
- ❖ MDR-TB – Tuberculose resistente à múltiplas drogas
- ❖ MF- Macrófagos
- ❖ MHC- Complexo principal de histocompatibilidade
- ❖ MO - Monócitos

- ❖ Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
- ❖ NK- *Natural killer*
- ❖ NO – Óxido nítrico
- ❖ OADC – Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
- ❖ OMS - Organização mundial de Saúde
- ❖ p.i – Pós infecção
- ❖ PA - Paraformaldeído
- ❖ PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico
- ❖ PBS – Tampão fosfato-salino
- ❖ PGE2 - Prostaglandina E2
- ❖ PPD - Derivado proteico purificado
- ❖ PRRs – Receptores de reconhecimento padrão
- ❖ PT – Prova tuberculínea
- ❖ RPMI – Meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*
- ❖ Sca-1 – Antígeno de células-tronco 1
- ❖ SFB - Soro fetal bovino
- ❖ TB - Tuberculose
- ❖ TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
- ❖ Th- *T helper*
- ❖ TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha
- ❖ T $\gamma\delta$ – Linfócitos T gama delta
- ❖ UFC- Unidades formadoras de colônia
- ❖ UT – Unidades tuberculíneas
- ❖ VCAM – Proteína de adesão vascular 1

Resumo

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa associada à inflamação exacerbada que contribui para a imunopatologia pulmonar necrótica que leva a formação de cavidades. Nestes casos hiperinflamatórios, um tratamento que tenha atividade anti-inflamatória, seria uma importante ferramenta para a redução da patologia e diminuição das sequelas. Devido as propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, as células tronco mesenquimais são potenciais candidatas ao tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas. Entretanto, os efeitos imunomoduladores destas células durante infecções crônicas como TB não foram analisados em detalhes. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito imunomodulador das células-tronco mesenquimais imaturas da polpa de dente humano (CTIPDh) sobre a atividade de macrófagos, bem como o papel destas células na modulação da resposta inflamatória exacerbada provocada pela infecção do hospedeiro por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Em testes de cocultivo celular, avaliamos os efeitos das CTIPDh na modulação da produção de citocinas por macrófagos estimulados *in vitro* e por células do infiltrado pulmonar isoladas dos camundongos infectados. As CTIPDh induziram a redução de mediadores pró-inflamatórios produzidos por macrófagos, como TNF- α e óxido nítrico, e aumentaram a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, demonstrando efeito regulador da resposta inflamatória. Avaliamos também os efeitos das CTIPDh na modulação da resposta inflamatória e na redução da patologia pulmonar induzida pela infecção por Mtb *in vivo*, através da infecção camundongos C57BL/6 com cepa hipervirulenta. Os resultados demonstraram que transplante de CTIPDh exerceu efeitos benéficos no controle da resposta hiperinflamatória induzida pelo Mtb através da inibição do recrutamento de células mieloides e da produção de citocinas inflamatórias, o que gerou impacto positivo na redução da patologia pulmonar e progressão da doença. Esses dados, podem contribuir para a elaboração de novas estratégias para terapia adjuvante da tuberculose pulmonar severa baseada na utilização das CTIPDh.

Palavras-chave: Inflamação, células-tronco, imunomodulação, tuberculose

Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease associated with exacerbated inflammation that contributes to the necrotic pulmonary immunopathology leading to cavity formation. In these hyperinflammatory cases, a treatment that has anti-inflammatory activity would be an important tool for the reduction of the pathology and reduction of the sequelae. Due to the anti-inflammatory and immunosuppressive properties, the mesenchymal stem cells are potential candidates for the treatment of inflammatory and infectious diseases. However, the immunomodulatory effects of these cells during chronic infections such as TB have not been analyzed in detail. The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of immature mesenchymal stem cells from the human tooth pulp (CTIPDh) on the activity of macrophages, as well as the role of these cells in the modulation of the exacerbated inflammatory response caused by infection of the host by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). In cell co-culture assays, we evaluated the effects of CTIPDh on the modulation of cytokine production by stimulated macrophages *in vitro* and pulmonary infiltrate cells isolated from infected mice. The results showed that the reduction CTIPDh induced proinflammatory mediators produced by macrophages such as TNF- α and nitric oxide production and increased anti-inflammatory cytokines such as IL-10, demonstrating regulatory effect of the inflammatory response. We also evaluated the effects of CTIPDh on the modulation of inflammatory response and reduction of pulmonary pathology induced by Mtb infection *in vivo* through infection with C57BL / 6 mice with hypervirulent strain. The results demonstrated that CTIPDh transplantation had beneficial effects in the control of hyperinflammatory response induced by Mtb by inhibiting the recruitment of myeloid cells and the production of inflammatory cytokines, which generated positive impact in reducing pulmonary pathology and disease progression. These data may contribute to the development of new strategies for adjuvant therapy of severe pulmonary tuberculosis based on the use of CTIPDh.

Keywords: Inflammation, stem cells, immunomodulation, tuberculosis

1. Introdução

1.1. Epidemiologia da Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença granulomatosa infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e por outras espécies de micobactérias como: *M. bovis* e *M. africanum*. A doença afeta geralmente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas pode afetar outros órgãos em casos de disseminação da bactéria (tuberculose extrapulmonar) (KAUFMANN, 2006).

A TB foi considerada no ano de 2015, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), uma emergência de saúde Global e vem causando problemas de saúde a milhões de pessoas a cada ano. Juntamente com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), a TB é uma das principais causas de morte ao redor do mundo (WHO, 2017). Somente no ano de 2016 foram relatados cerca de 6,3 milhões de novos casos e cerca de 1,3 milhões de mortes em todo o mundo (WHO, 2017). A doença afeta principalmente os países mais populosos da Ásia e África Subsaariana (**Figura 1**).

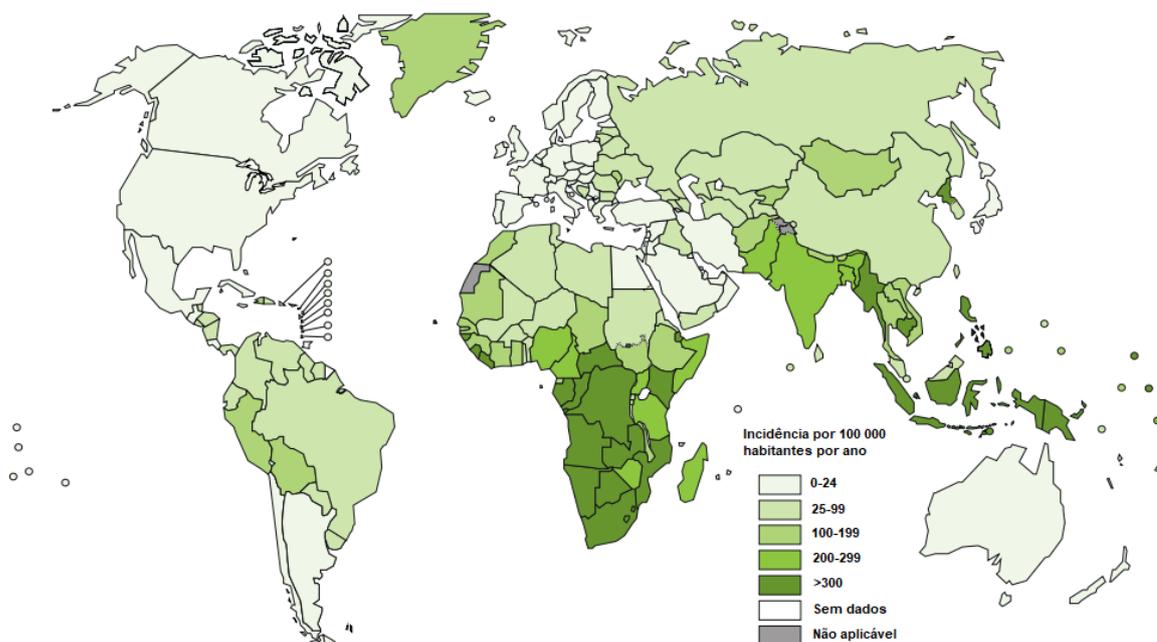


Figura 1. Estimativa da taxa de incidência de Tuberculose no mundo no ano de 2016. (Adaptado de *World Health Organization*, 2017)

O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. São registrados anualmente no país, cerca de 82 mil novos casos e 5.4 mil óbitos provocados pela tuberculose (WHO, 2017). O estado do Amazonas e do Rio de Janeiro são os que apresentam a maior da taxa de incidência

de TB. Dados recentes do Ministério da Saúde (2017) demonstram que a incidência de TB nestes dois estados é maior que 51 casos para cada 100 mil habitantes (**Figura 2**).

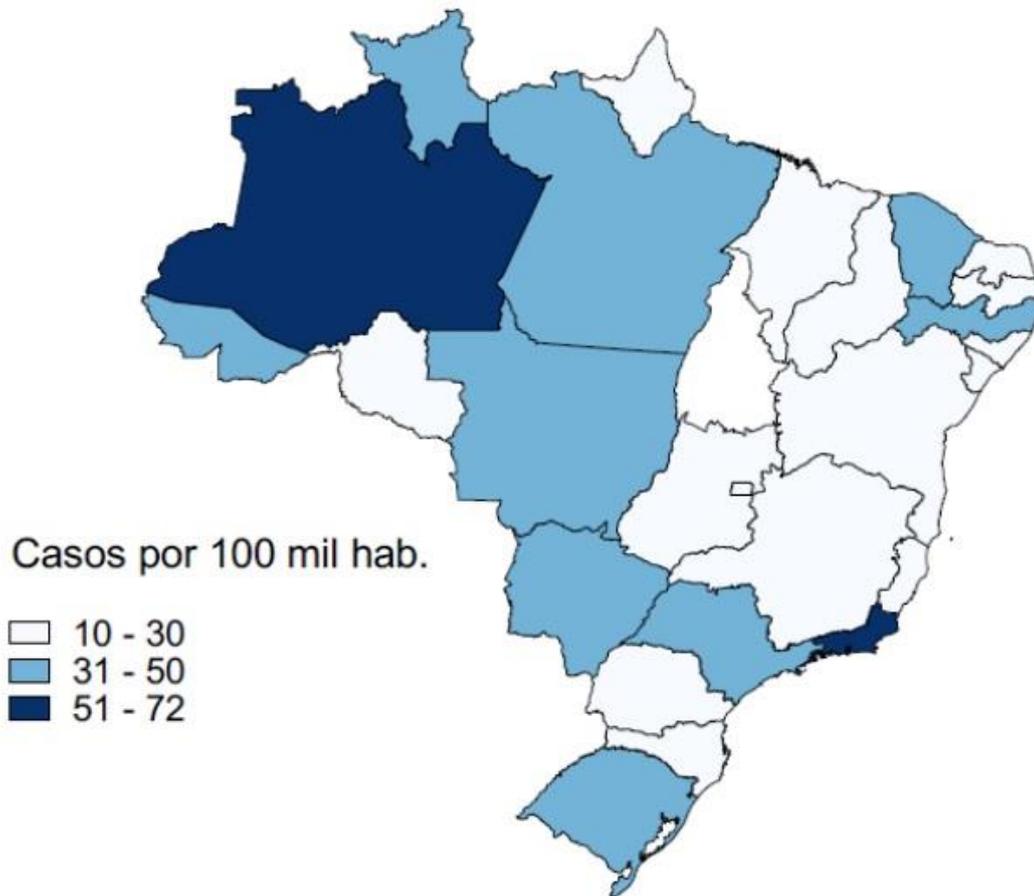


Figura 2. Coeficiente de incidência de tuberculose por Unidade Federada em 2015. Ministério de Saúde do Brasil 2017

A alta incidência de pacientes portadores do HIV é um dos fatores que colaboram para as elevadas taxas da doença (YOUNG, 2008). Em 2016 foram registrados em todo o mundo 476 774 novos casos e 37400 mortes entre indivíduos TB-HIV positivos. Nesse mesmo ano no Brasil foram registrados em torno de 11 mil novos casos e 1,9 mil mortes entre TB-HIV positivos (WHO, 2017).

Outros fatores como o surgimento de micobactérias resistentes a múltiplas drogas também colaboram para o aumento da prevalência da doença (YOUNG, 2008). Estima-se que em 2016, cerca de 4,1% (490 000) dos novos casos e 19% dos casos previamente tratados eram de TB provocada por cepa de Mtb resistentes a múltiplas drogas. Quase metade (47%) destes casos estavam na Índia, na China e na Federação Russa (**Figura 3**) (WHO, 2017).

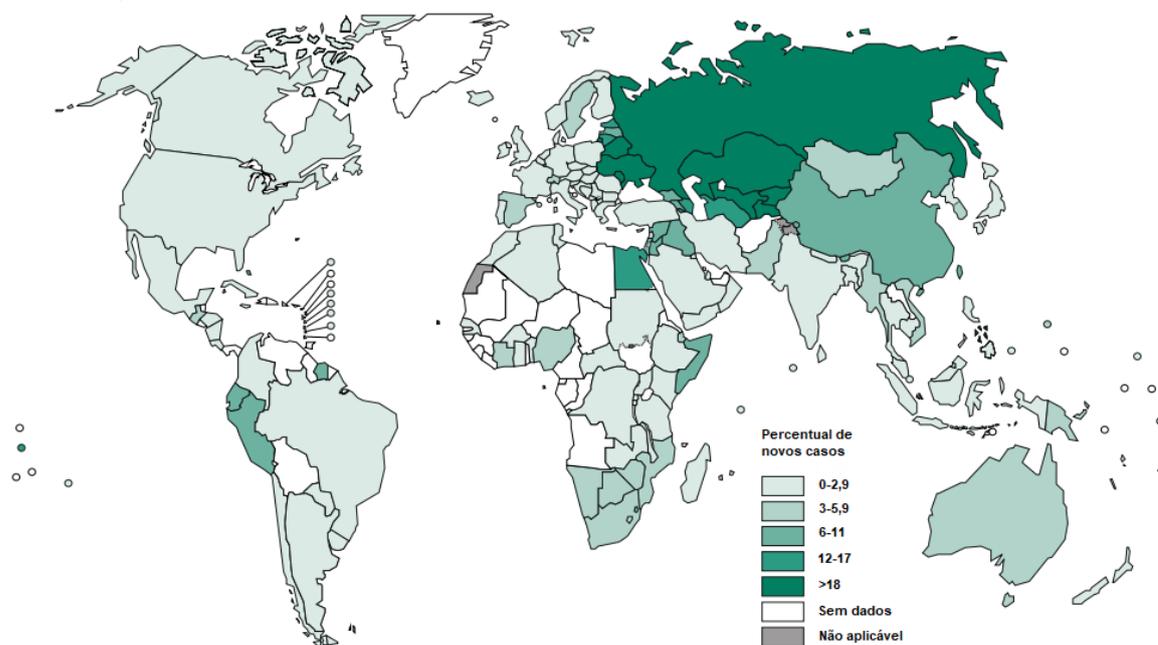


Figura 3. Estimativa da taxa de incidência de TB-MDR no mundo no ano de 2016. (Adaptado de *World Health Organization*, 2017)

1.2. Diagnóstico, prevenção e tratamento.

O diagnóstico primário da TB é baseado no quadro clínico do paciente. A TB pode apresentar diferentes manifestações clínicas dependendo do órgão acometido, desta forma, outros sintomas e sinais além de tosse devem receber devida atenção. A tuberculose pulmonar, pode se apresentar de forma primária ou pós-primária e os sintomas são tosse persistente com muco e eventualmente sangue ou não, febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento. As principais formas diagnosticadas de tuberculose extrapulmonar são TB pleural, empiema pleural tuberculoso, TB ganglionar periférica, TB meningoencefálica, TB pericárdica e TB óssea, sendo os sintomas e sinais dependentes dos órgãos ou sistemas acometidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011).

Outras formas importantes de diagnóstico são radiografia do tórax e prova tuberculínica (PT) que consiste na inoculação intradérmica de um derivado proteico

de *Mtb* para avaliar a resposta imunológica celular a este antígeno. A tuberculina utilizada no Brasil é a PPD (*Purified Protein Derivative*)-RT 23 que contém 2 unidades tuberculínea (UT) e possui equivalência biológica com 5UT de PPD-S, utilizada em outros países (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011). A PT não é específica, pois a reatividade ao derivado proteico reflete o contato anterior com *Mtb*, com outras micobactérias ou reatividade cruzada com a vacina BCG (Centro de Informação em Saúde para Viajantes – www.cives.ufrj.br).

A confirmação da doença exige o teste bacteriológico feito através da detecção do bacilo em materiais biológicos. A bacterioscopia pode ser feita através da coloração de Ziehl-Neelsen ou cultura do escarro para a confirmação da espécie de micobactéria por métodos bioquímicos e moleculares. Quando executada corretamente, a baciloscopia é capaz de identificar cerca de 60% a 80% dos casos de tuberculose pulmonar (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011).

O tratamento é feito preferencialmente com um coquetel de três antibióticos (o coquetel- RIP) por um período de seis meses que inclui as drogas: Rifampicina (R), Isoniazida (I) e Pirazinamida (P). A esse coquetel pode ser adicionado o antibiótico Estreptomicina ou Etambutol, os quais também são drogas de primeira linha. Para tratar pacientes com tuberculose resistente a múltiplas drogas (TB-MDR), são utilizadas drogas de segunda-linha, injetáveis, como Capreomicina, Canamicina ou Amicacina, e um grupo de fluoroquinolonas (por exemplo, Ciprofloxacina) que possuem maiores efeitos colaterais e devem ser administradas por mais tempo. Em casos de TB-RMD, as opções de tratamento são seriamente limitadas (SACCHETTINI; RUBIN; FREUNDLICH, 2008) razão disto, a OMS recomenda o tratamento supervisionado (DOTS - *Directly Observed Therapy Short-Course*) onde os agentes de saúde acompanham a ingestão dos medicamentos pelo paciente.

A vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* desenvolvida pelos cientistas franceses Albert Calmette e Camille Guérin entre 1908 e 1921 (FINE, 1999), é o método de prevenção mais utilizado, protegendo crianças contra as formas graves da tuberculose primária disseminada e da meningite tuberculosa. Apesar de proteger crianças e recém-nascidos, a vacina não previne a doença pulmonar em adultos de forma satisfatória e, portanto, não contribui para a redução da carga global de TB (KAUFMANN; HUSSEY; LAMBERT, 2010).

1.3. Imunopatologia da tuberculose

O Mtb é transmitido pelo ar quando pessoas com tuberculose pulmonar ativa expulsam o bacilo junto com gotículas ao falar ou tossir. Uma pessoa saudável se infecta ao inalar as gotículas contendo o bacilo, que migra pelo trato respiratório até chegar aos alvéolos pulmonares, onde são fagocitados por macrófagos alveolares e células dendríticas (**Figura 4.A e 4.B**) (OTTENHOFF; KAUFMANN, 2012).

Os receptores de reconhecimento padrões, expressos por macrófagos e células dendríticas, interagem com os ligantes do Mtb. Ao serem fagocitadas, as micobactérias alteram o tráfego de organelas intracelulares da célula hospedeira e impedem a fusão do fagossoma com o lisossoma, utilizando este mecanismo como uma forma de evasão a sua destruição pelo macrófago (FERRARI, 1999). Assim, a célula infectada se torna um ambiente favorável para a proliferação do patógeno. Até o início da imunidade adquirida, os macrófagos permanecem relativamente permissivos ao Mtb intracelular. Isso é identificado como um período de replicação bacteriana exponencial (RUSSELL, 2009). Os bacilos proliferam logaritmicamente nos macrófagos alveolares e células dendríticas e induzem a produção de mediadores inflamatórios tais como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 α e IL-1 β que ativam macrófagos e induzem a degradação da micobactéria (SCHAIBLE, 1998; AHMAD, 2011). As células dendríticas ativadas migram para o linfonodo através dos vasos linfáticos e apresentam os antígenos micobacterianos para as células T (**Figura 4.C**).

Uma vez que as células T antígeno-específicas se ativam através da apresentação de antígenos de Mtb pelas moléculas de MHC classe I e classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos nos linfonodos, os linfócitos efetores específicos proliferam e adentram a circulação sanguínea. A migração destas células para as áreas que contenham as micobactérias nos pulmões, inicia-se entre 15 e 18 dias após a infecção. A atração dos linfócitos efetores específicos para o tecido infectado é devido a fatores relacionados à lesão e pela produção local de quimiocinas (REILEY, 2008) (**Figura 4.C e 4.D**).

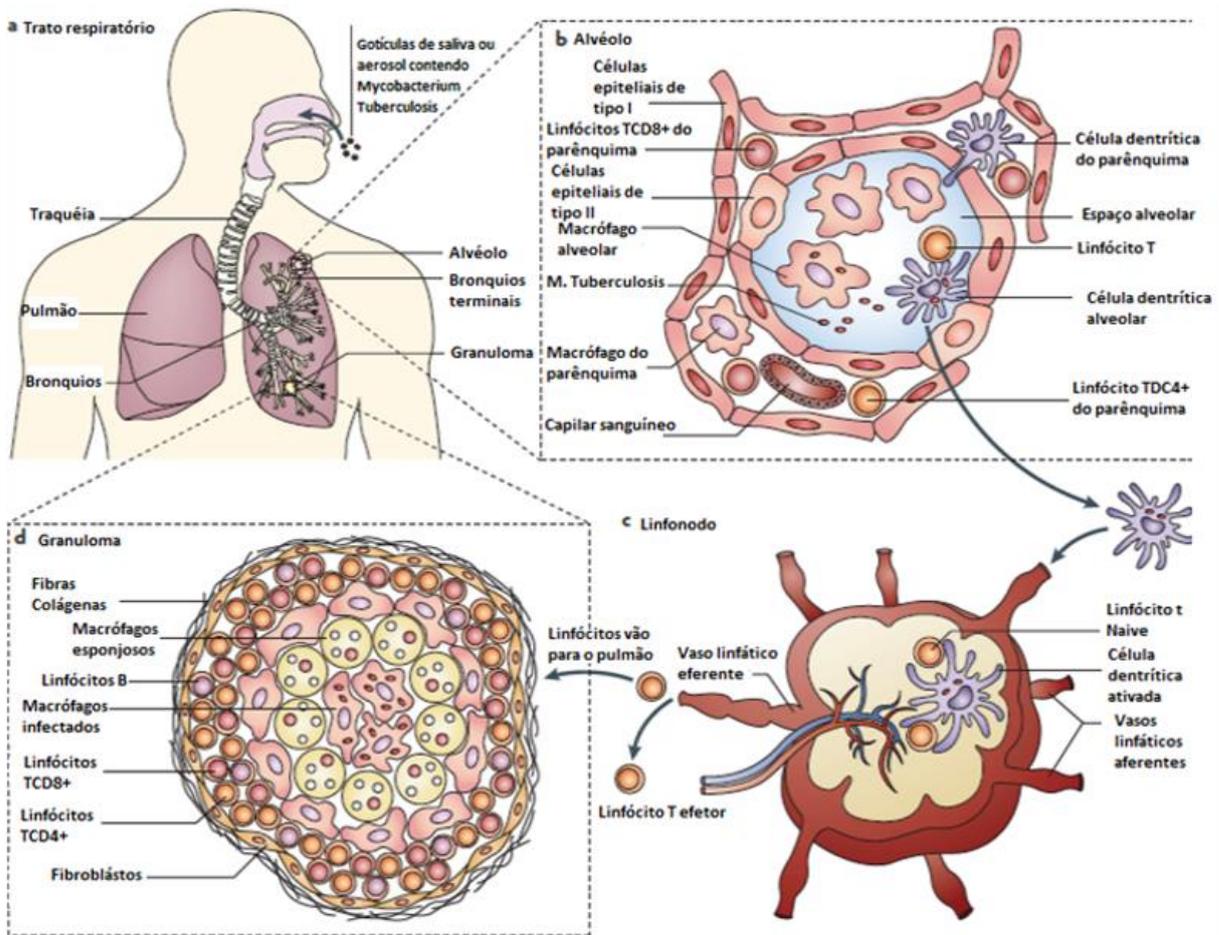


Figura 4. Resposta Imunológica ao Mtb e formação do granuloma. (Adaptado de GRIFFITHS, 2010)

Os linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T γ δ desempenham um papel importante na proteção contra a Mtb (KAUFMANN, 2001). As células T CD4⁺ produzem mediadores imunes (IFN- γ , IL-2 e linfotóxina alfa) (ROACH, 2001), células T CD8⁺ e as células T γ δ liberam granzimas e perforinas que exercem um efeito direto sobre os macrófagos infectados (**Figura 5**). As células T periféricas reconhecem os antígenos de Mtb (ESAT-6 e Mtb-39) que estimulam a produção de IFN- γ e TNF- α , iduzindo a contenção da infecção (FENHALLS, 2002; CACCAMO, 2006; PENG, 2008). Entretanto, uma porcentagem dos bacilos fica latente e sobrevive dentro do tecido necrótico ou dos fagossomas dos macrófagos (PANDEY; SASSETTI 2008).

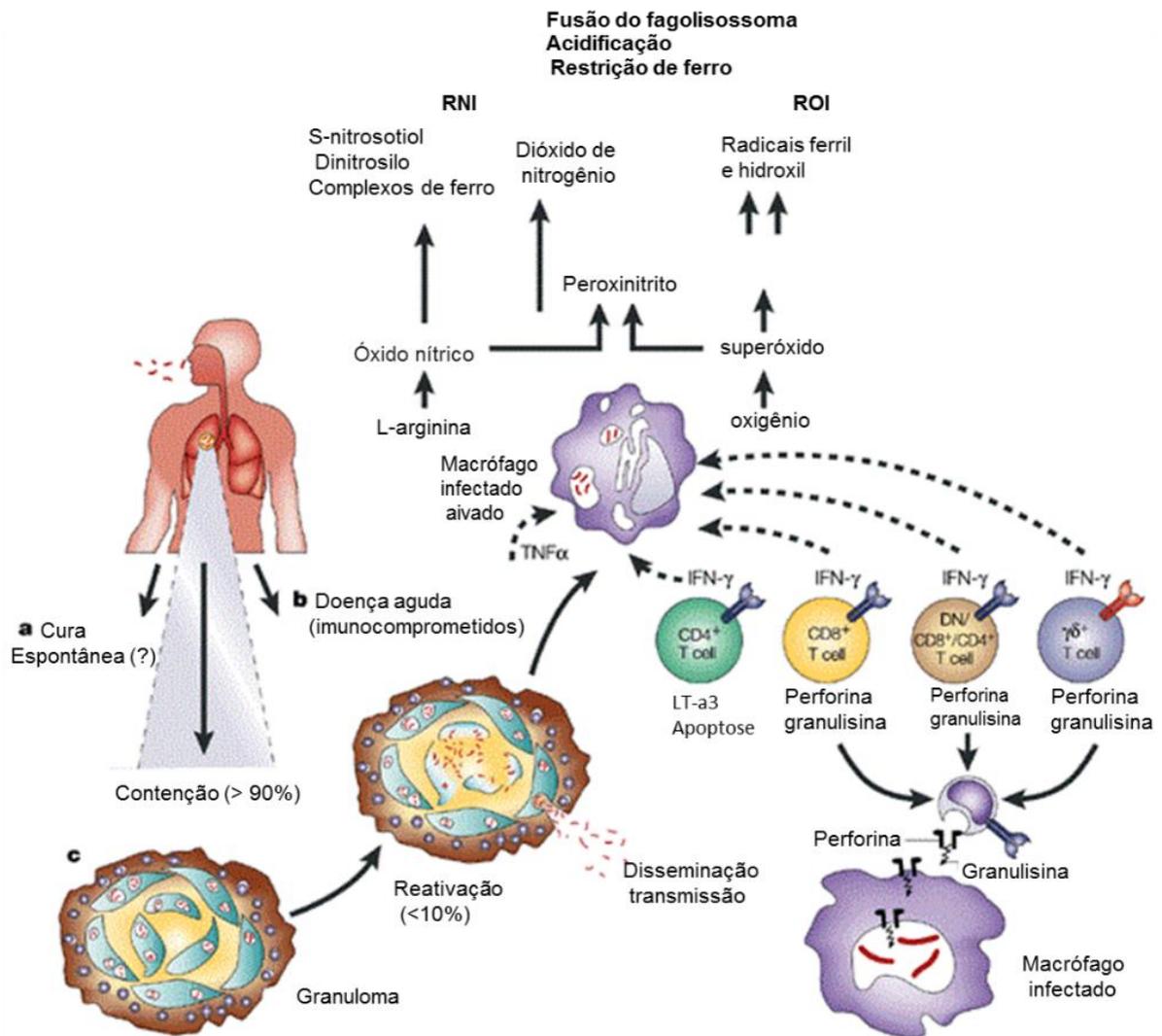


Figura 5. Principais características da tuberculose: da infecção à defesa do hospedeiro. Adaptado de KAUFMANN, 2001

O acúmulo de células imunes no foco da infecção inicia a formação do granuloma. A arquitetura do granuloma é caracterizada pela agregação de células T, macrófagos epitelióides e macrófagos infectados que contêm a Mtb, mantendo-a em um estado latente, impedindo a sua propagação (**Figura 6**) (TSAI, 2006; SAUNDERS; BRITTON, 2007; GRIFFITHS, 2010). A latência é considerada a marca registrada da imunidade protetora, atribuída classicamente à atividade coordenada das respostas das células T CD4⁺. Em que aproximadamente 90% dos indivíduos infectados, conseguem controlar a disseminação das micobactérias (PHILIPS; ERNST, 2012).

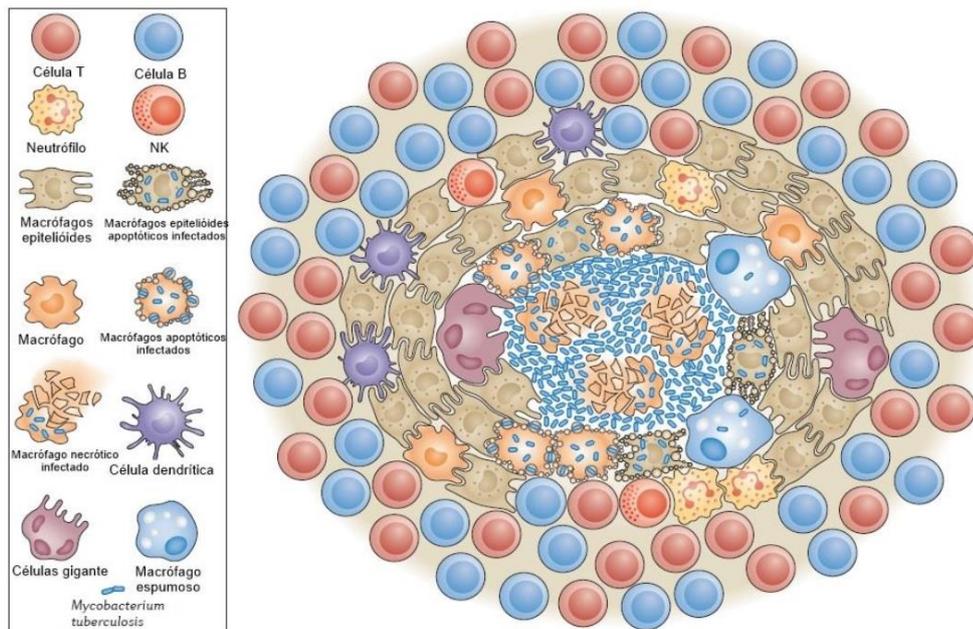


Figura 6. Estrutura e constituintes celulares do granuloma na tuberculose.
(Adaptado de RAMAKRISHNAN, 2012)

Nos granulomas maduros, são encontrados também fibroblastos na periferia, que se encontram associados às fibras de colágeno. A inflamação da tuberculose é acompanhada do aumento do número de fibroblastos e da atividade fibroblástica (SHKURUPIY, 2014). Estas células produzem feixes de colágeno formando uma cápsula fibrótica, encapsulando o granuloma, o separando do tecido circundante. Este processo é uma consequência da secreção de citocinas intragranulomatosas (AZOUZ, 2004). As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17 e IL-23 e quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 e CXCL10 possuem um papel fundamental, tanto para a formação e estabilidade do granuloma, quanto para o recrutamento de células inflamatórias para o foco da infecção (PETERS; ERNST, 2003; A KHADER, 2007; SAUNDERS; BRITTON, 2007).

A reativação da tuberculose, ou tuberculose pós-primária, acontece em cerca de 5 a 10% da população infectada. Ocorre devido a diversos fatores como imunossupressão e coinfeções, por exemplo. A infecção ativa avança devido à falha na resposta imunológica do hospedeiro, em consequência ao comprometimento da resposta por células T nestes pacientes (CORBETT, 2003; KWAN; ERNST, 2011). Desta forma o granuloma não é capaz de conter a infecção, ocorrendo uma rápida disseminação do Mtb através do tecido pulmonar. A replicação bacteriana resulta em necrose caseosa progressiva seguida de liquefação e cavitação, liberando os bacilos no tecido pulmonar (BHATT; SALGAME, 2007).

A inflamação exacerbada juntamente com a necrose intragranulomatosa resultam em fibrose pulmonar e formação de cavernas (buracos nos pulmões), gerando sequelas graves aos pacientes, como obstrução pulmonar crônica e insuficiência respiratória. Nestes casos hiperinflamatórios, um tratamento que tenha atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória seria uma importante ferramenta para a redução da patologia e diminuição das sequelas (O'GARRA, 2013).

Uma opção para reduzir o dano induzido pela inflamação exacerbada em doenças infecciosas é a terapia adjuvante utilizando células-tronco mesenquimais (CTMs) (AULETTA; DEANS; BARTHOLOMEW, 2012).

Raghuvanshi e seus colaboradores (2010) relataram a presença de CTMs intrínsecas no local da infecção durante a formação dos granulomas nos pulmões e no baço de camundongos C57BL/6, sugerindo a possibilidade do recrutamento destas células para o foco de infecção. Estas células se acumulam em torno dos granulomas em 3-4 semanas após a infecção, coincidindo com o pico da resposta imune antimicobacteriana.

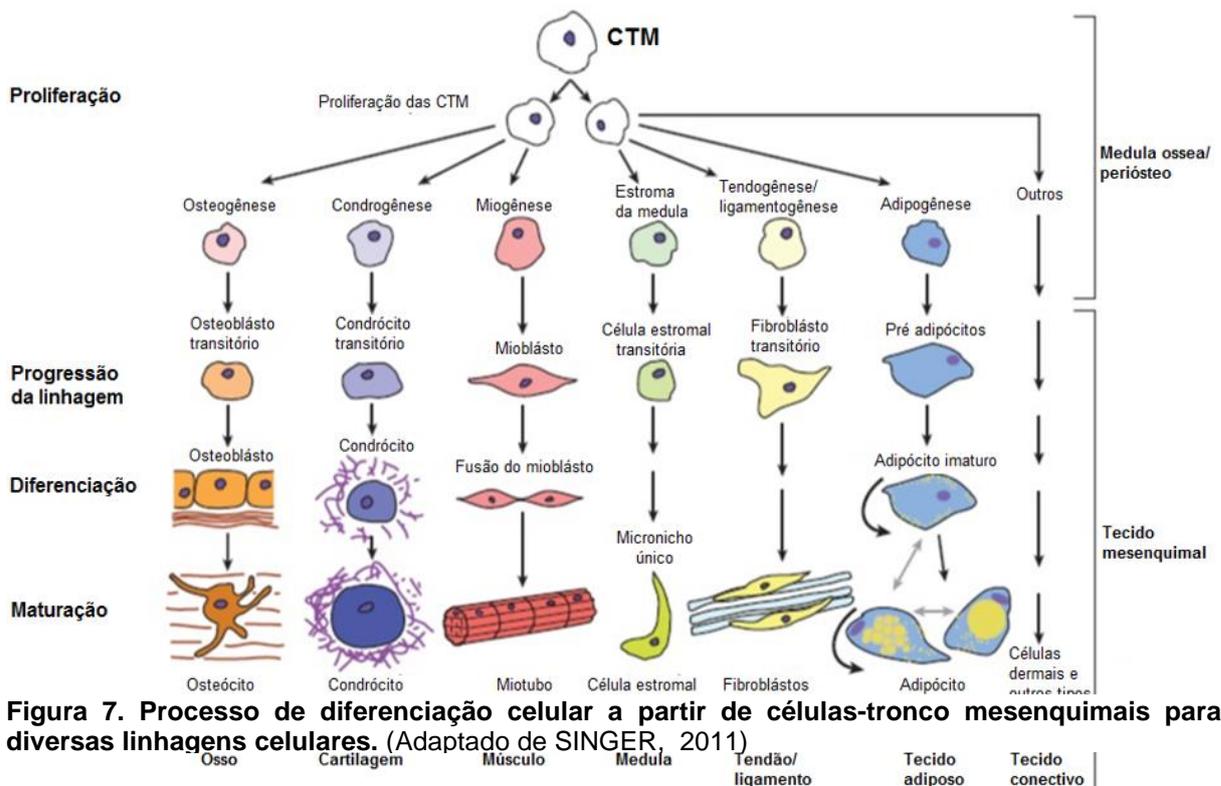
Os pesquisadores isolaram as CTMs e demonstraram sua capacidade de inibir a proliferação dos linfócitos *ex vivo*. Sugerindo que o efeito imunossupressor observado corresponde à supressão da resposta imune *in vivo*, favorecendo a sobrevivência das micobactérias (RAGHUVANSHI, 2010). Entretanto, apesar da suposta imunossupressão, as bactérias não voltaram a se multiplicar nos pulmões e os camundongos foram capazes de controlar a infecção, demonstrando que a imunossupressão não foi total. O fenômeno observado pode manifestar um mecanismo de regulação negativa da resposta imune, prevenindo a inflamação excessiva no local da infecção.

1.4. Células-tronco mesenquimais e suas propriedades imunomoduladoras

As CTMs são células-tronco adultas que foram identificadas inicialmente na medula óssea e posteriormente em tecidos como polpa de dente, pulmão, líquido sinovial, tecido adiposo, dentre outros (KOBOLAK, 2016). Estas células foram identificadas na década de 70, a partir de suspensões de baço e medula óssea, pela sua capacidade de aderir ao plástico. Dependendo do estímulo e das condições de cultura empregadas, essas células podem formar ossos, cartilagens, músculos, tecido adiposo e outros tecidos conjuntivos (**Figura 7**). No tecido, as CTMs se organizam em estruturas particulares, denominadas nichos, que mantém as condições necessárias

para o controle da proliferação, diferenciação e autorrenovação destas células (VIA; FRIZZIERO, 2012).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, os critérios mínimos que definem as CTMs humanas são: (1) capacidade de aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultura convencionais, usando frascos de cultura de tecidos; (2) possuir expressão positiva de marcadores de superfície celular como CD105 (endoglina), CD73 (ecto 5' nucleotidase), CD90 (Thy-1) e expressão negativa de marcadores como CD45 (marcador de leucócitos), CD34 (marcador de células progenitoras hematopoiéticas primitivas e células endoteliais), CD14 e CD11b (expressos em monócitos e macrófagos), CD79 α e CD19 (marcadores de linfócitos B) e HLA de classe II e baixa expressão HLA de classe I, fazendo com que estas células sejam consideradas imunoprivilegiadas; (3) as células devem ser capazes de se diferenciar para osteoblastos, adipócitos e condrócitos sob condições padrão de diferenciação *in vitro* (DOMINICI, 2006).



As CTMs murinas possuem características semelhantes às humanas, com apenas algumas variações na expressão dos marcadores moleculares, que além de expressar CD29, CD73, CD90 e CD105, também expressam Sca-1 (Ly6) e CD106

(VCAM1) (ZHU, 2010). O que indica que as características das CTMs podem variar de acordo com a espécie e o tecido de isolamento.

As CTMs apresentam propriedades imunossupressoras, anti-inflamatórias e de reparação tecidual. Estudos recentes demonstraram que as CTMs possuem mais propriedades imunorreguladoras do que imunossupressoras e dependendo do microambiente, podem inibir, manter ou estimular as funções de células efetoras como linfócitos T e B, células NK e dendríticas (MATTAR; BIEBACK, 2015; NAJAR, 2016; VLADIMIROVNA, 2016). Profundamente influenciadas por fatores microambientais, as CTMs podem responder a algumas citocinas inflamatórias, como IL-1 β (GROH, 2005), IL-17 (HUANG, 2006) e IFN- γ , todas capazes de afetar significativamente sua função.

As CTMs modulam a resposta inflamatória, as inúmeras citocinas, as moléculas e fatores de crescimento produzidos, também podem levar a efeitos tróficos (CAPLAN; DENNIS, 2006). Entre os fatores secretados pelas CTMs que as conferem estas atividades estão: antagonista do receptor IL-1, fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), angiopoietina 1, TGF- β , indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e prostaglandina E2 (PGE2). Estes mediadores podem inibir a proliferação de linfócitos T e B e a atividade das células NK e dendríticas. Bem como podem induzir a geração de células T regulatórias (Tregs) (SHI; LIU; WANG, 2010; SOLEYMANINEJADIAN; PRAMANIK; SAMADIA, 2011), além de alterar o perfil de ativação de macrófagos de um perfil inflamatório M1 para um perfil alternativo anti-inflamatório M2 (ABUMAREE, 2013) (**Figura 7**).

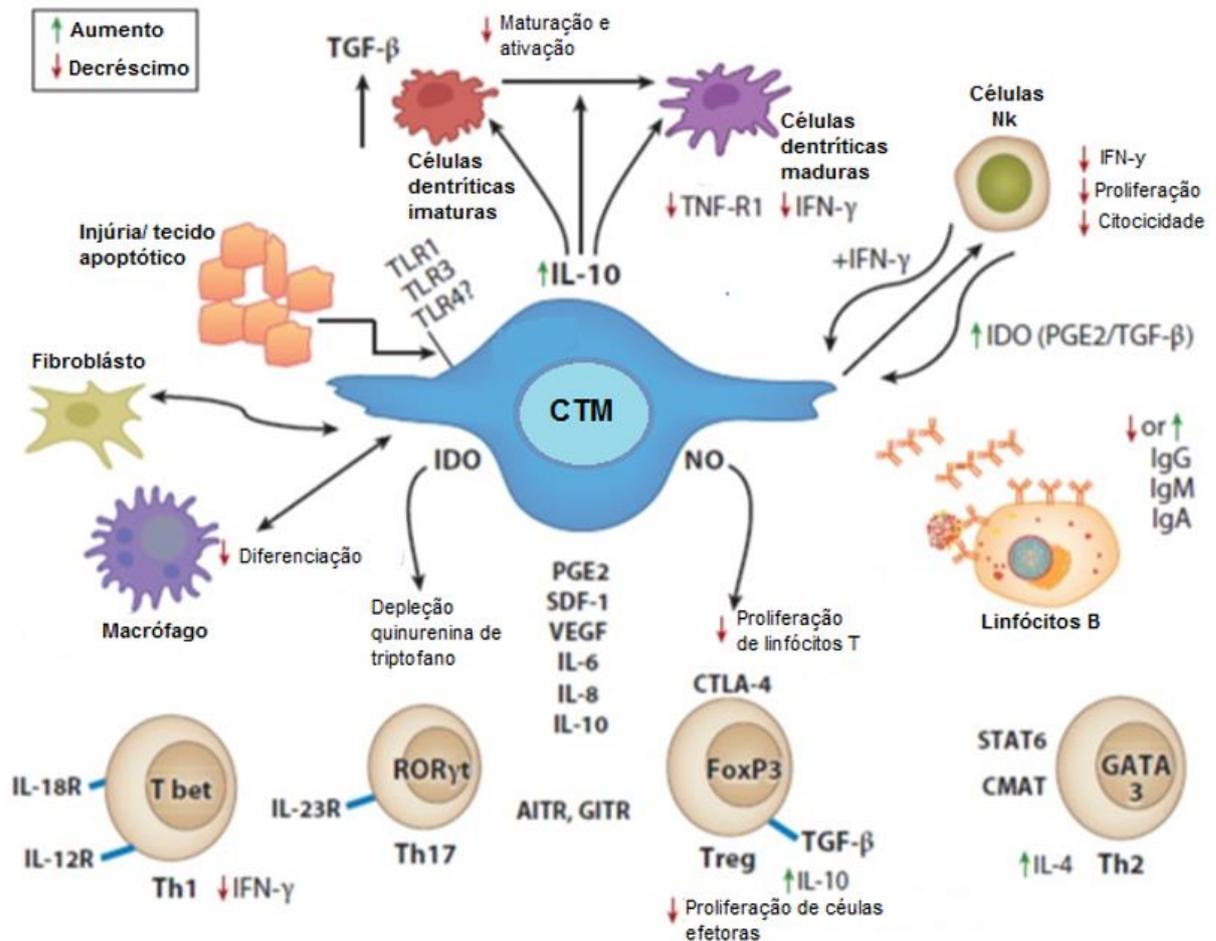


Figura 8. Um resumo da gama de proteínas solúveis e de superfície celular que estão envolvidos nas atividades biológicas das CTMs. (Adaptado de SINGER, 2011)

Dada à capacidade inata das CTMs de promover a reparação tecidual e sua atividade anti-inflamatória, houve um interesse crescente na utilização destas células em um amplo repertório de terapias à base de células para o tratamento de diversas doenças autoimunes, doenças não infecciosas e doenças infecciosas, incluindo malária e infecção pelo HIV (RAI; BHATTACHARYA; DAS, 2012). No entanto, apesar do uso clínico extensivo, os efeitos do tratamento com CTMs continua mal compreendido, particularmente no contexto da tuberculose.

1.5. CTMs e terapia adjuvante da TB

Devido as suas propriedades imunossupressoras, anti-inflamatórias e de reparação tecidual, diversos estudos se concentraram no potencial uso das CTMs para terapia adjuvante do tratamento da TB (SKRAHIN, 2014; PARIDA, 2015; SKRAHIN, 2016).

Resultados dos testes clínicos, fase I, de utilização das CTM autólogas, isoladas da medula óssea dos pacientes com tuberculose resistente a múltiplas

drogas, para tratamento dos próprios indivíduos (SKRAHIN, 2014), demonstram que o uso das CTMs é seguro para os pacientes. Entretanto, foi demonstrado que essas células em pacientes com TB podem estar infectadas pelo Mtb (RAGHUVANSHI, 2010), o que pode comprometer a eficácia da terapia.

Outros trabalhos recentes mostraram que a Mtb é capaz de infectar as CTMs *in vitro* e *in vivo*, utilizando essas células como um nicho seguro para sua permanência não-replicativa (DAS, 2013). Foi relatado, também, o fato da permanência de micobactérias vivas em CTMs na medula óssea de camundongos infectados e em alguns pacientes após tratamento antituberculose, que foram considerados curados e não apresentaram bactéria no escarro (DAS, 2013; BEAMER, 2014).

A dificuldade de obtenção do número suficiente de células de um mesmo paciente e diminuição do potencial regenerativo, quando isoladas de pacientes idosos, são outras limitações que, em alguns casos, dificultam a utilização de CTMs autólogas. Em contraste, CTMs alogênicas obtidas de diferentes tecidos como osso compacto, tecido adiposo e polpa de dente de indivíduos jovens saudáveis sob controle de qualidade preciso, podem ser uma alternativa para o uso terapêutico (ZHANG, 2015).

Diversos estudos demonstram as potenciais vantagens das abordagens terapêuticas baseadas em células-tronco imaturas isoladas da polpa de dente (CTIPD) para tratamentos regenerativos e imunoterapias, incluindo doença de Alzheimer (WANG, 2017), modelo murinho de artrite reumatoide (ISHIKAWA, 2016), lesão pulmonar aguda em camundongos (WAKAYAMA, 2015) e no modelo murino de lesão da medula espinhal (ALMEIDA, 2011b).

As CTIPD são facilmente acessíveis e podem ser obtidas de forma simples e rápida. Elas também possuem rápida expansão e proliferação *in vitro*, e não há necessidade de um processo invasivo para coletá-las, uma vez que são isoladas de dentes decíduais (KERKIS, 2006). Assim como CTMs isoladas da medula óssea, as CTIPD também são capazes de suprimir a proliferação de células T e demonstraram inibir significativamente a proliferação de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) através da expressão de fatores solúveis parcialmente induzidos pela secreção de IFN- γ por PBMCs ativadas (PIERDOMENICO, 2005; WADA, 2009).

Estudos em modelos animais sugerem que CTMs de fontes alogênicas ou xenogênicas podem proteger os animais efetivamente da morte por sepse (NÉMETH, 2008), da perda neuronal após isquemia cerebral (OHTAKI, 2008) e de lesão

nerológica na encefalomielite autoimune experimental (ZAPPIA, 2005; RAFEI, 2009) de forma comparável às CTMs autólogas. Além de limitar o dano tecidual, as CTMs podem converter a inflamação improdutiva, que não é capaz de eliminar o patógeno e causa lesões teciduais, em respostas imunes efetivas direcionadas a agentes patogênicos (PARIDA, 2015; SKAHIN, 2016). Seus efeitos imunoregulatórios, como antiproliferativo (SUDRES, 2006) e papéis anti-inflamatórios, tornam as CTMs importantes candidatas para a terapia celular. No entanto, os efeitos imunomoduladores das CTMs durante infecções como TB ainda não foram completamente analisados em detalhes nas diversas fases do processo infeccioso.

Nesta perspectiva, estudos que possibilitem avaliar a interação de CTMs alogênicas ou xenogênicas, em infecções crônicas como TB são importantes tanto para o entendimento dos mecanismos de modulação da resposta imunológica destas células, quanto para elaboração de estratégias de intervenção terapêutica que possam ser utilizadas para retardar a progressão da doença. Deste modo, estudos pré-clínicos para avaliar os efeitos das CTIPD humanas na modulação da resposta inflamatória induzida por Mtb em modelos murinos, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, são necessários.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi estabelecido um modelo murino da tuberculose pulmonar severa, associada à patologia necrótica no pulmão, baseada na infecção intratraqueal dos camundongos C57Bl/6 pela cepa hipervirulenta Mtb M299 (RIBEIRO, 2014; ALMEIDA, 2017a). Foi demonstrado também que a inoculação das CTIPDh nestes animais exerceu efeito anti-inflamatório reduzindo a patologia necrótica no pulmão (ALMEIDA, 2016). Entretanto os mecanismos do efeito terapêutico ainda não foram completamente estabelecidos.

1.6. Indoleamina 2,3-dioxigenase como um mecanismo regulatório utilizado pelas CTMs

A indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima intracelular não secreta que cataboliza a produção de quinurenina derivada do triptofano. Estudos *in situ* demonstraram claramente que a formação de granuloma após a infecção por M. tuberculosis em humanos está associada à alta expressão de IDO em células do centro e da estrutura da parede do anel em torno do centro do granuloma (POPOV, 2006; LI, 2011; VON BUBNOFF, 2011).

Células que expressam predominantemente IDO foram identificadas como macrófagos CD68⁺ e em menor número DC CD11c⁺ S100⁺. Além de ser expressa em CTMs, a IDO também é expressa em células endoteliais e epiteliais. A expressão gênica de IDO é regulada por interferon- α (IFN- α) e interferon γ (IFN- γ) e também por TNF- α e prostaglandinas (POPOV, 2006; VON BERGWELT-BAILDON, 2006; O'CONNOR, 2009). As MSCs, que liberam diversos fatores parácrinos imunorreguladores, incluindo NO, IDO, IL-10, PGE2 entre outros, demonstrou inibir a ativação de células T e proliferação via mecanismos mediados por IDO (HONG, 2016; PROCKOP, 2017). Tanto a depleção de triptofano quanto o acúmulo de quinurenina são capazes de suprimir a proliferação de células T (TERNESS, 2002). Entretanto o papel da IDO na modulação da resposta imune durante a TB mediada pelas CTMs ainda precisa ser esclarecido.

Este trabalho visa verificar os efeitos das CTIPDh na atividade dos macrófagos estimulados *in vitro* e das células do infiltrado pulmonar *ex vivo*, utilizando testes de cocultivo celular. Além disso, pretendemos verificar se os efeitos anti-inflamatórios observados em modelo *in vivo* estão associados com a capacidade das células tronco mesenquimais xenogênicas inoculadas (CTIPDh) e/ou intrínsecas (CTMs autólogas do próprio animal) de produzir IDO.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar o efeito imunomodulador das células-tronco mesenquimais imaturas da polpa de dente humano (CTIPDh) sobre a atividade de células imunes ativadas *in vitro*, bem como o papel destas células na modulação da resposta inflamatória exacerbada em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa hipervirulenta de Mtb.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos das CTIPDh na modulação da produção de citocinas por macrófagos RAW 264.7 estimulados *in vitro* por LPS ou lisado de BCG (L. BCG);
- Analisar o perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células do infiltrado inflamatório pulmonar dos camundongos infectados com Mtb em cocultivo com CTIPDh;
- Avaliar o efeito do transplante de CTIPDh no crescimento bacteriano no pulmão e morbidade dos animais na fase aguda de infecção pela cepa hipervirulenta Mtb M299;
- Avaliar os efeitos do transplante de CTIPDh na patologia e expressão deIDO pelas células do pulmão de camundongos infectados;
- Avaliar a composição do infiltrado celular nos pulmões dos camundongos infectados por Mtb e tratados com CTIPDh;
- Avaliar o perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células dos pulmões dos camundongos infectados e tratados com CTIPDh.

3. Material e Métodos

3.1. Cultivo de células-tronco imaturas da polpa de dente humano (CTIPDh)

Para os transplantes *in vivo* e experimentos *in vitro* e *ex vivo*, foram utilizadas células-tronco imaturas de polpa de dente humano (CTIPDh), isoladas, caracterizadas e cedidas pela Dr.^a Irina Kerkis do Laboratório de Genética do Instituto Butantan (KERKIS, 2006). As células foram cultivadas em garrafas de cultivo de 75 cm² em meio DMEM-F12 (1:1, CGMP-Compliant manufacturing Facility, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB Hyclone), com 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen), 2 mM L-glutamina (Invitrogen) e 2 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen). As CTMs foram utilizadas entre a 4^a e 5^a passagem, de acordo com as recomendações de Kerkis e colaboradores (2006). As ampliações (passagens) da cultura foram feitas, quando as células atingiam 80% de confluência, com auxílio de solução de 0,25% tripsina e 0,02% EDTA. A taxa de ampliação da cultura foi de 1:8 e as culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂.

3.2. Cocultivo das CTIPDh e macrófagos RAW 264.7

Para avaliar se as CTMs humanas modulam a produção de citocinas pelos macrófagos murinos ativados, foram plaqueadas 2x10⁴ CTIPDh por poço, em placa de cultura de 24 poços e cultivadas a 37°C na estufa de CO₂. Após 12h do plaqueamento, foram adicionados 2x10⁵ macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 (ATCC TIB-71) por poço, ficando na proporção de 10 macrófagos para 1 CTIPDh. Após 5 horas do plaqueamento dos macrófagos, o meio da cultura foi trocado por 500µL de meio de cultura contendo os diferentes ativadores: 1) lisado de *Mycobacterium bovis* BCG (L.BCG) na concentração de 2µg/mL; 2) LPS de *E. coli* na concentração de 1 µg/mL.

As células em cocultivo foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ por 48h. Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24h e 48h após o tratamento, filtrados com filtro de 0,2 µm, aliquotados e mantidos congelados a -80°C até o momento da quantificação das citocinas IL-10, TNF-α e IL-6 pelo kit murino Th1/Th2/Th17 *Cytometric Beads Array* (CBA, BD™) de acordo com as

recomendações do fabricante. A produção de NO, foi quantificada através da metodologia originalmente descrita por Griess (1879).

3.3. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, fornecidos pelo biotério central do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os animais infectados com Mtb foram mantidos em microisoladores (estantes ventiladas com filtros HEPA) no biotério do Laboratório de Biossegurança Nível 3 coordenado pela professora Dr.^a Elena Lasounskaia do Laboratório de Biologia do Reconhecer. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as regras de Biossegurança nível 3, utilizando os equipamentos de proteção individual e coletiva apropriados. Os protocolos de experimentação com animais de laboratório foram aprovados pela CEUA da UENF (protocolo N°350) (Anexo 1). Animais não infectados foram usados como controle. Os animais foram pesados em balança analítica e isolados em tambores de alumínio uma vez por semana para acompanhamento da morbidade.

3.4. Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Para os experimentos de infecção dos camundongos C57BL/6, foi usada a cepa de alta virulência de *M. tuberculosis* M299, isolada de pacientes com TB em Moçambique e cedida pelo Dr. Philip N. Suffys – FIOCRUZ/RJ.

Previamente à realização dos experimentos, os bacilos foram descongelados e cultivados até atingir a fase logarítmica de crescimento em meio líquido *Middlebrook* 7H9 suplementado com 10% de ADC (Albumina, dextrose e catalase/DIFCO) e 0,05% de Tween-80, em estufa a 37°C.

A concentração de bactérias na cultura foi avaliada através da quantificação da densidade ótica (DO) da cultura por espectrofotometria a 600nm, e ensaio de contagem de células em meio sólido. No ensaio de contagem de células em meio sólido, as micobactérias foram cultivadas, em meio Ágar *Middlebrook* 7H10 (DIFCO) suplementado com meio de enriquecimento OADC (DIFCO), por 21 dias em estufa úmida à 37°C com 5% de CO₂. Antes do uso, as culturas foram sonicadas em banho ultrassom por 1 minuto e a solução foi agitada em vórtex para dispersão dos grumos. Este passo foi repetido por 3 vezes.

3.5. Infecção dos Camundongos

Para avaliar o efeito das CTIPDh na modulação da resposta inflamatória exacerbada provocada pela infecção por Mtb, foi utilizado o modelo experimental murino de tuberculose associada a hiperinflamação e patologia necrótica no pulmão descrito por Almeida e colaboradores (2017a). Nos procedimentos de infecção os animais foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (15mg/kg) e Cetamina (110mg/kg), via intraperitoneal, antes do procedimento experimental. A infecção foi realizada via intratraqueal, por incisão cirúrgica, com carga de infecção de 100 bacilos da cepa M299 de *Mycobacterium tuberculosis* em 50µL de PBS1x estéril por animal. Os animais infectados receberam o transplante de CTIDPh via intraperitoneal nos dias 14 e 21 dias após a infecção.

3.6. Tratamento dos camundongos infectados com as CTIPDh

Grupos experimentais contendo 3 camundongos infectados, como descrito no item anterior, foram usados para receber a injeção de CTIDPh via intraperitoneal. Para a injeção as CTIPDh, estas foram cultivadas até a 4ª ou 5ª passagem, como descrito no item 3.1. A coleta das CTIPDh foi feita da seguinte forma: as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS1X estéril, e após, as culturas foram incubadas por 3 minutos em estufa a 37°C com solução de 0,25% tripsina e 0,02% EDTA, para a liberação das CTIPDh do frasco de cultura. Após essa etapa, as CTIPDh foram colocadas em um tubo cônico de 15 mL contendo 7mL de meio Dulbecco's-3 *Modified Eagle's Medium* (DMEM) / Ham's F12 (1:1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) para a neutralização da solução de tripsina. O tubo cônico contendo as células CTIPDh foi centrifugado a 400G por 5 minutos. Após as células foram lavadas 3 vezes com PBS1X estéril através de centrifugações a 1200RPM por 5 minutos para a retirada do soro fetal bovino. Em seguida as células foram ressuspensas em 5 mL de PBS1X estéril, e uma alíquota de 50µL foi retirada para contagem das células em câmara de *Neubauer*. Após a contagem, foi calculado o volume de PBS1X contendo 2×10^5 CTIPDh. Este volume PBS 1X contendo 2×10^5 CTIPDh, foi inoculado nos grupos de animais infectados via intraperitoneal com o auxílio de seringa de insulina de 1 mL (marca Saldanha e Rodrigues, modelo SR), nos dias 14 e 21 após a infecção.

3.7. Crescimento bacteriano *in vivo* e histopatologia

Após os 28^o dias de infecção, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram coletados. Os pulmões foram colocados em placas de petri com 3 ml de meio RPMI e pesados em balança analítica para a determinação do peso de pulmão total. O lóbulo superior esquerdo do pulmão foi coletado e fixado em formaldeído 10% tamponado, por 48h antes do processamento para histologia. A imunohistoquímica foi realizada para avaliação da expressão de IDO no pulmão dos camundongos. Em seguida os cortes histológicos foram corados com hematoxilina para a visualização microscópica celular e tecidual.

Após a pesagem, os lóbulos inferiores esquerdos e os três lóbulos direito de cada pulmão foram cortados em pedaços de tamanho de 2mm, com auxílio de pinça e tesoura, e coletados para tubos de 50mL. Em seguida os fragmentos de pulmão foram digeridos em solução contendo colagenase (0,5 mg/mL; Sigma-Aldrich) e DNase de pâncreas bovino tipo IV (3ug/mL, Sigma), diluídas em meio RPMI com volume final de 4 mL, para a liberação das células pulmonares. Até o momento da digestão os tubos contendo os fragmentos dos pulmões foram mantidos em gelo para preservar a viabilidade das células. Para a digestão, os tecidos foram incubados à 37°C por 50 minutos sob agitação. As suspensões obtidas foram submetidas a 10 passagens por seringas de 10 mL, para maior dissociação do tecido e dispersão das células. Após, as suspensões de meio contendo as células foram filtradas em *cell strainer* de malha de 70µm (BD Biosciences, Lincoln Park, NJ), para separação das células dos pedaços de tecidos.

A carga bacteriana nos pulmões dos camundongos foi avaliada coletando uma alíquota de 100 µL da suspensão celular extraída dos pulmões dos camundongos. As alíquotas das amostras foram diluídas em 1:10000 e 1:100000 em PBS 1X estéril. Em que 50 µL da de cada diluição foi semeada em placa de Petri contendo meio 7H10 + 10% de OADC. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 21 dias de incubação, as colônias foram contadas para o cálculo do número de colônias por grama de pulmão.

3.8. Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica, os pulmões dos camundongos infectados foram fixados por um mínimo de 96 horas em formol tamponado 10%, embutidos em parafina e cortados na espessura de 4µm (utilizando o micrótomo).

Seções em parafina de 4µm contendo os tecidos colhidas em lâminas histológicas sinalizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA) foram submetidas à desparafinização em 5 banhos de xilol (10 minutos), reidratação em 3 banhos de álcool absoluto e 2 em álcool 90% (5 minutos) e 3 banhos em água deionizada (5 minutos). A seguir, os espécimes foram tratados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30V (Vetec, RJ, Brasil) à 30% por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, foram colocados em banho-maria a 98°C em tampão citrato (Vetec, RJ, Brasil), por 30 minutos para recuperação antigênica, e mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos. Subseqüentemente, as lâminas foram cuidadosamente enxugadas com papel toalha, os cortes envolvidos circularmente com Dako pen® (Dako, CA, USA), e os espécimes foram incubados por 1 hora com solução de bloqueio de ligações inespecíficas (Trisma-NaCl (Vetec, RJ, Brasil) com 1% de soro albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA – Sigma-Aldrich, MO, USA)] e 1% de leite em pó desnatado (Molico™ - Nestlé, SP, Brasil). Depois de descartada a solução de bloqueio, as seções de tecido foram incubadas com solução do anticorpo mouse anti-IDO, para a identificação de células positivas para idolamina-2,3 dioxigenase. As amostras foram incubadas overnight à 4°C em câmara úmida.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3x por 5 minutos em solução salina de Trisma com Tween 20-TBS (Vetec, RJ, Brasil) e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-rato e 30 min com o Kit LSAB-HRP+ (Dako, CA, USA). Após as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS e reveladas com Kit cromógeno DAB (Dako, CA, USA). As amostras foram contracoradas com hematoxilina de Harris e desidratadas em banhos de álcool. As lâminas foram montadas com Permount® (Sigma-Aldrich, MO, USA) (SOUZA, 2011).

3.9. Isolamento das células pulmonares

Após a dissociação das células pulmonares e filtração como descrita no item 3.7, as hemácias presentes nas suspensões celulares foram lisadas através de tratamento com tampão de lise ACK (NH₄Cl, KHCO₃ e EDTA) por 4 minutos. Em seguida as suspensões celulares foram lavadas com 10 mL PBS 1X estéril com 10% de soro fetal bovino, através de centrifugação à 400g por 5 minutos e ressuspensas em 2 mL de meio RPMI (Gibco) com 10% soro fetal bovino e 0,05mg/mL de gentamicina (Gibco). As células foram mantidas em gelo e uma alíquota de cada amostra foram diluídas 10 vezes. Em que 50 µL de cada amostra diluída foi corada

com 50 μ L solução de 1% de Azul de Trypan e 4% de paraformaldeído. Após 4 minutos de coradas, as células foram contadas em câmara de Neubauer. E a concentração celular de cada amostra foi calculada.

3.10. Cocultivo de CTIPDh e células isoladas do pulmão de camundongos infectados

Para avaliar se as CTIPDh são capazes de modular a produção de citocinas por células isoladas do pulmão de camundongos infectados por Mtb, foram plaqueadas 2×10^4 CTIPDh por poço, na placa de cultura de 24 poços. Após 12h do plaqueamento, 2×10^5 células isoladas do pulmão (CIP) como descrito no item 3.9 foram adicionados por poço, ficando na proporção de 10 CIP para 1 CTIDPh. As células em cocultivo foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48h. Os sobrenadantes das coculturas foram coletados, filtrados com filtro para seringa de poro de 0,22 μ m para eliminação das micobactérias e mantidos congelados a -80°C até o momento da quantificação das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-6 pelo kit murino Th1/Th2/Th17 Cytometric Beads Array (CBA, BD™ Catalogo N° 560485), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.11. Cultura *ex vivo* e dosagem de citocinas

As células provenientes do processamento dos pulmões, como descrito no item 3.9, dos animais TB⁺, TB⁻ e TB⁺ que receberam o transplante de CTIPDh (TB⁺CTIPDh⁺) foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (1×10^6 células/poço) e cultivadas por 48h em estufa a 37°C, em meio RPMI suplementado 10% de SFB, e 0,05 mg/mL de gentamicina. Após 48h de cultivo, o sobrenadante da cultura foi coletado, filtrado e congelado a -80°C. Posteriormente, as alíquotas de sobrenadante foram descongeladas e os níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17, IL-10, IL-4 foram avaliadas pelo kit murino Th1/Th2/Th17 Cytometric Beads Array (CBA, BD™ Catalogo N° 560485), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12. Avaliação da população celular por citometria de fluxo

Após contagem das células pulmonares como descrito no item 3.9, $2,5 \times 10^5$ células pulmonares foram tratadas com anti-CD16/CD32 (BioLegend, San Diego, CA) por cinco minutos para bloquear os receptores de FC das células. Após as células

foram marcadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz com solução de PBS1x com 1% de soro fetal bovino contendo a combinação de anticorpos contra Ly6G-FITC (clone 1A8), CD11c-PE (clone HL3), Ly6C-APC (clone AL-21) e CD11b-PerCP (todos obtidos da BD Pharmingen, San Diego, CA) para avaliação das diferentes populações de células mielóides. Ou contendo a combinação de anticorpos anti-CD 90, anti-CD 73 e anti-Sca-1, para avaliar a presença de células-tronco mesenquimais intrínsecas.

Anticorpos isotípicos foram usados como controle. Após a marcação, as amostras de células foram lavadas duas vezes com PBS1X com 1% de soro fetal bovino, através de centrifugação de 300g por 5 minutos. Após as lavagens, as células foram fixadas com 2% de paraformoldeído *overnight*. Após as células foram analisadas por citômetro de fluxo (FACSCallibur, BD Biosciences), usando o programa Cell Quest Pro. A estratégia de seleção das populações de interesse está representada na figura 9.

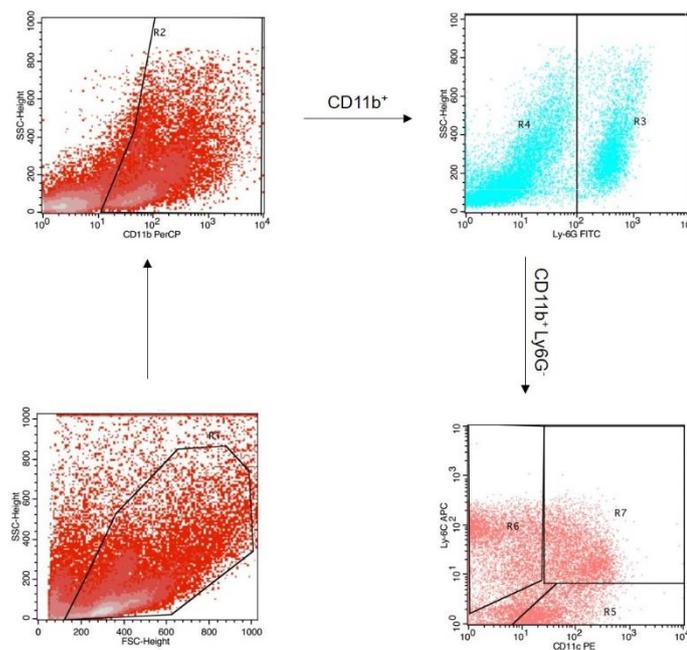


Figura 9. . Estratégia de análise das subpopulações de leucócitos mielóides nos pulmões dos camundongos. A população de leucócitos mielóides foi identificada pela expressão do marcador CD11b (gate R2) e subdividida nas subpopulações de Ly6G+ (Neutrófilos, gate 3) e Ly6G- (gate 4). As células Ly6G- foram classificadas de acordo com a expressão dos marcadores Ly6C e CD11c, como células Ly6C- CD11c+ (células dendríticas, gate R5), células Ly6chi CD11c- (monócitos e macrófagos inflamatórios, gate R6).

3.13. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 4 (GraphPad, EUA), e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). Os efeitos simultâneos de dois fatores foram analisados por Two-way ANOVA e pelo teste de Bonferroni. One-way ANOVA e o teste de Tukey foram utilizados para avaliar os efeitos de um único parâmetro.

4. Delineamento experimental

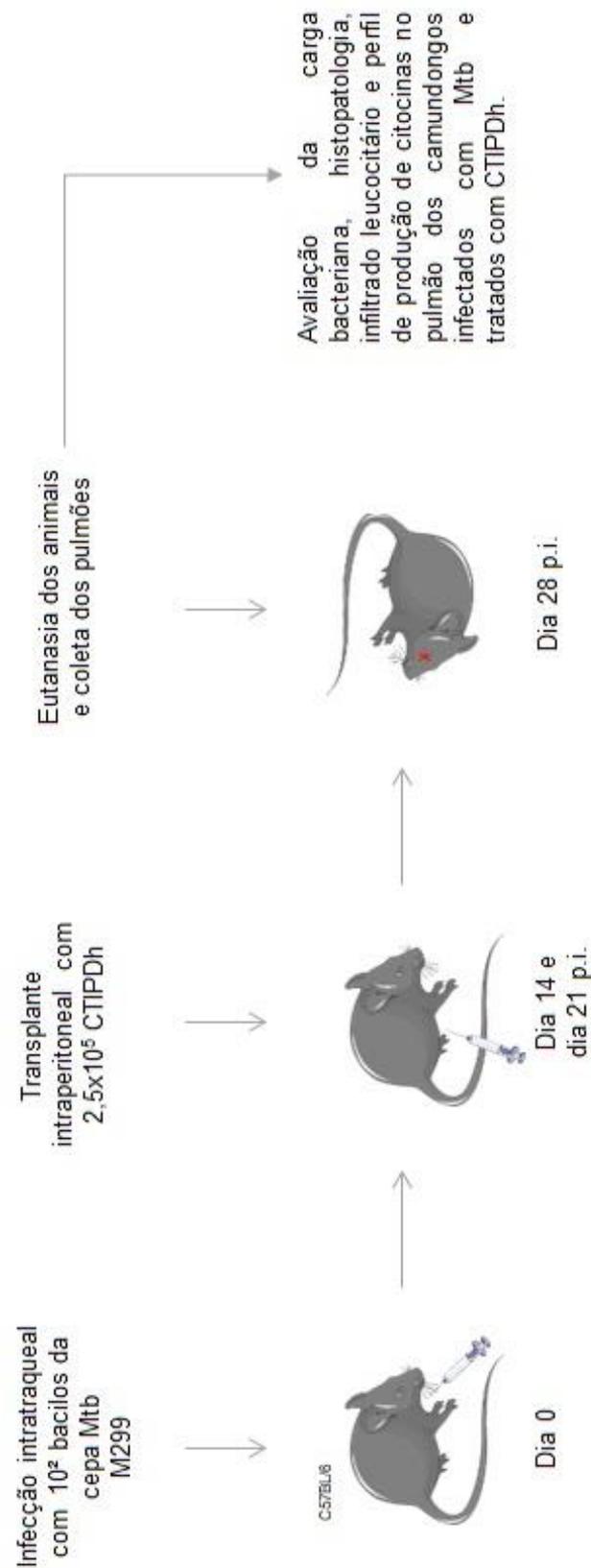


Figura 10. Delineamento experimental do tratamento com CTIPDh dos camundongos C57BL/6 infectados com Mtb.

5. Resultados

5.1. Efeitos das CTIPDh na produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados *in vitro*;

Para avaliar se as CTIPDh seriam capazes de modular a produção de citocinas por macrófagos RAW 264.7 estimulados pelos produtos bacterianos, foram realizados co-cultivos destas células na presença de 2µg/mL de L-BCG e 1µg/mL de LPS. Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24h e 48h, após o estímulo. O nível das citocinas IL-10 e TNF-α no sobrenadante das culturas foram avaliados por CBA Flex e os níveis de NO por método de Griess.

Após 48h de cocultura, as CTIPDh foram capazes de inibir significativamente a produção de TNF-α e NO, tanto por macrófagos estimulados por L-BCG quanto por LPS (**Figura 11.A e 11.C**). Em contraste, o tratamento com as CTIPDh aumentou a produção de IL-10 a partir de 24h de co-cultivo, que foi maior em cultura celular tratada por LPS em comparação com dessa tratada por L-BCG (**Figura 11.B**).

A viabilidade celular nas culturas tratadas e não tratadas foi monitorada através da coloração das células por Trypan Blue 0,4% e permaneceu alta (maior de 90%) durante dos todos experimentos, exceto para culturas das células RAW 264.7 tratados com LPS por 48h, que apresentaram a redução da viabilidade cerca de 15%.

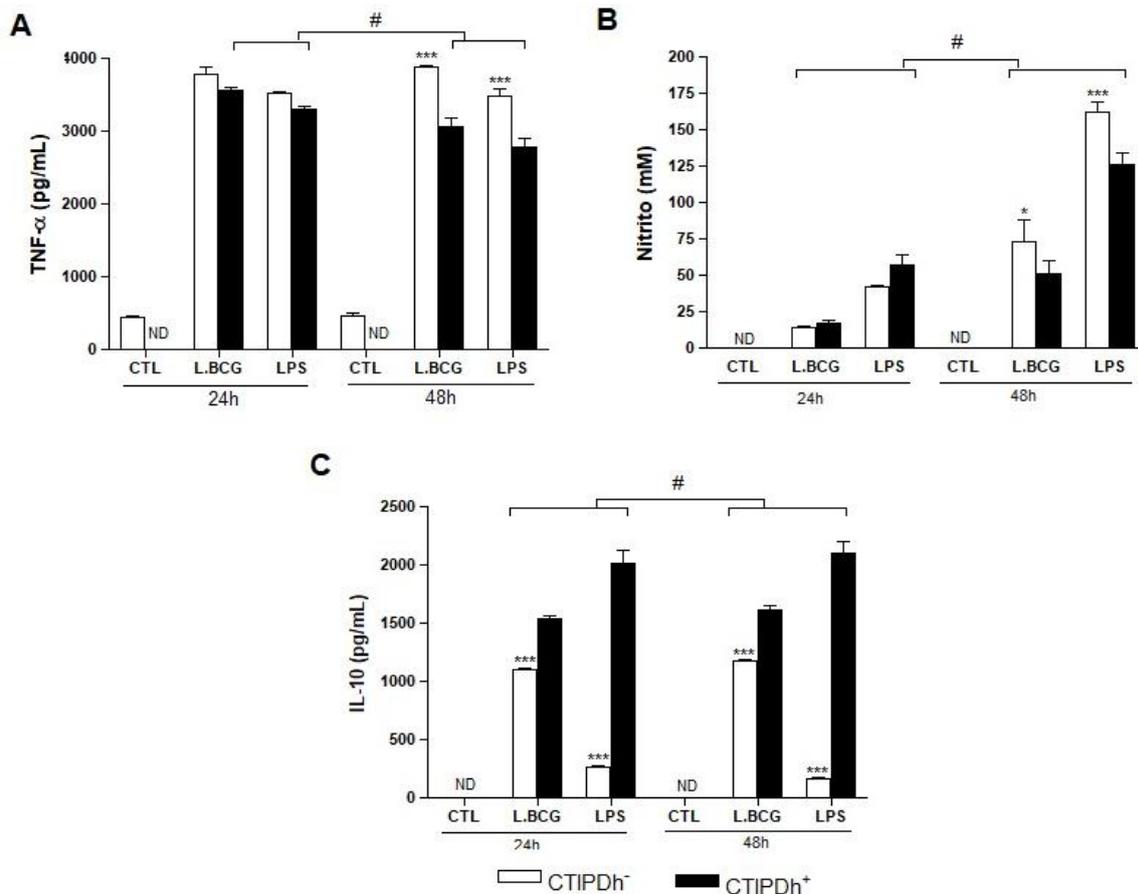


Figura 11. Avaliação da produção de citocinas mediadores pro- e anti-inflamatórios por macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados em cocultura com células-tronco imaturas de polpa de dente (CTIPDh). As CTIPDh e células RAW 264.7 (1:10), foram estimuladas com 2ug/mL L. BCG ou 1ug/mL de LPS e mantidas em cocultura durante 48 horas. Como controle (CTL) foram utilizadas coculturas não estimuladas. O sobrenadante foi recolhido 24h e 48h após o estímulo e a produção de TNF- α (A) e IL-10 (C) foram avaliadas através de Kit murino Th1/Th2/Th17 CBA Flex, e de NO (B) – pela reação de Griess. As diferenças significativas entre os grupos de macrófagos estimulados, que foram cultivados em cultura com ou sem cocultura tratados as CTIPDh, em comparação ao grupo não tratado estão indicadas pelo asteriscos * (P < 0,05) e *** (P < 0,001). As diferenças significativas entre os valores obtidos para cada grupo de coculturas estimuladas, que foram cultivadas por 24h versus 48h, tempos de 24h e 48h de cocultura estão indicadas pelo jogo da velha símbolo # (P < 0,05). ND= não detectado.

5.2. Análise do perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células extraídas dos pulmões dos camundongos com ou sem tuberculose experimental (TB⁻ e TB⁺) em cocultivo com CTIPDh

Para avaliar se as CTIPDh seriam capazes de alterar a produção de citocinas *ex vivo* por células inflamatórias que infiltram o pulmão durante a tuberculose, foram realizados cocultivos entre as CTIPDh e células do pulmão de animais TB⁻ e TB⁺ por 48h. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados e a produção das citocinas TNF- α (Figura 12.A), IL-6 (Figura 12.B), IFN- γ (Figura 12.C), IL-4 (Figura 12.D) e IL-10

(Figura 12.E) foram avaliadas. A viabilidade celular foi monitorada após 48h de cultura, revelando mais de 90% de viabilidade. Os resultados demonstram que, a cocultura com CTIPDh reduziu a produção de TNF- α e aumentou a produção de IL-10 pelas células isoladas do pulmão dos camundongos TB⁺. Alterações na produção de IFN- γ , IL-6 e IL-4 não foram significativas.

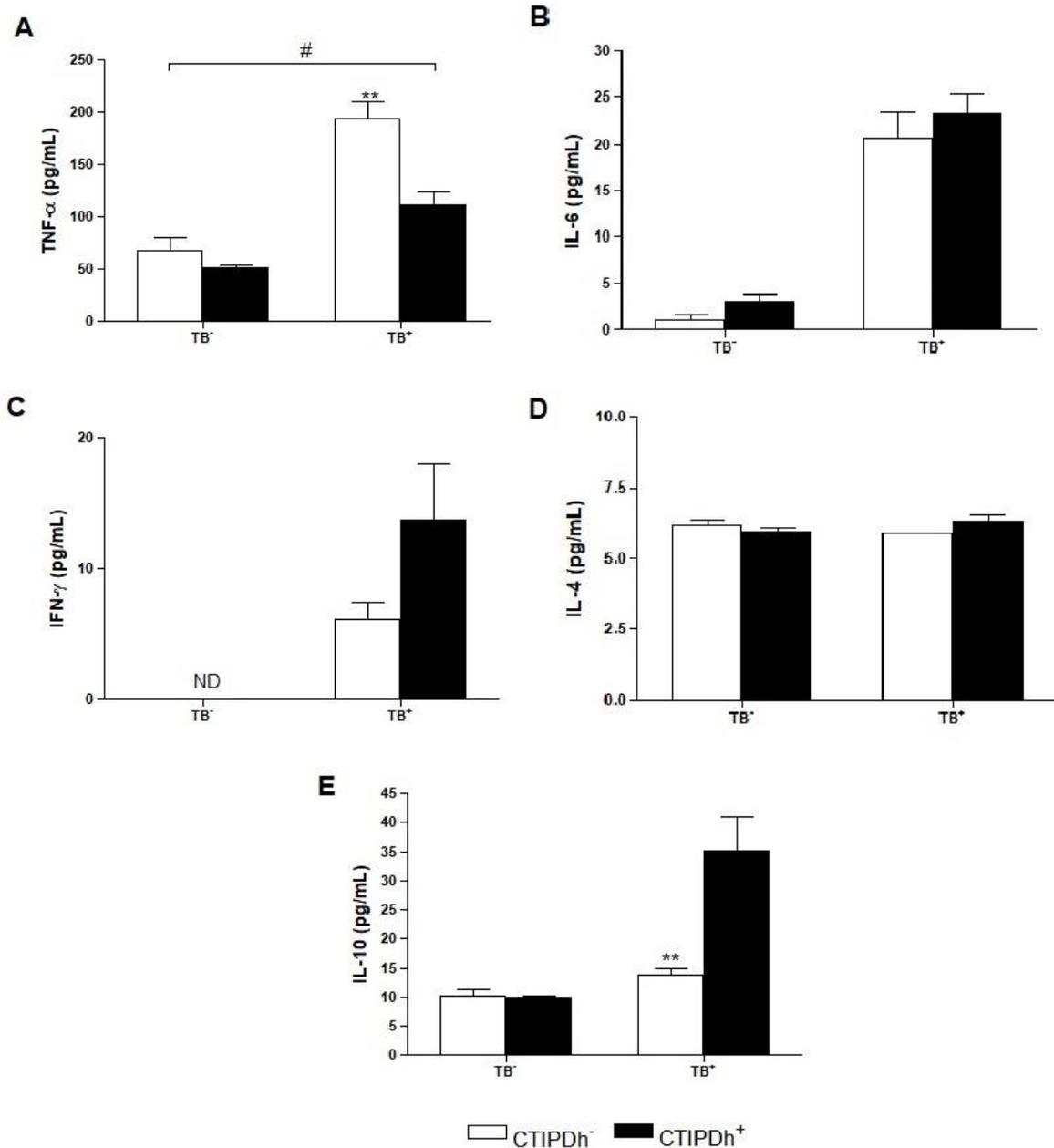


Figura 12. Avaliação da produção de citocinas em cocultura de células extraídas do pulmão dos camundongos infectados e células-tronco imaturas de polpa de dente (CTIPDh). As CTIPDh e Células dos pulmões dos animais infectados (TB⁺) e animais não infectados (TB⁻) (1:10), foram mantidas em cocultura durante 48 horas. O sobrenadante foi recolhido 48h após o plaqueamento e a produção das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) foram avaliadas através da utilização de Kit Th1/Th2/Th17 CBA Flex.

5.3. Avaliação do crescimento bacteriano no pulmão e morbidade dos animais TB⁺CTIPDh⁻ e TB⁺CTIPDh⁺ após 28 dias de infecção

Para estudar os efeitos das CTIPDh na patogenia da tuberculose, avaliamos a carga bacteriana e peso dos animais durante infecção por Mtb. Os camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa Hipervirulenta de Mtb M299 para induzir a doença severa e tratados com CTIPDh (grupo TB⁺CTIPDh⁺) ou não (grupo TB⁺CTIPDh⁻) no 14^o e 21^o dia p.i. Camundongos não infectados foram utilizados como controle (grupo TB⁻CTIPDh⁻). Os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento da morbidade. No 28^o dia p.i., os animais foram eutanasiados, os pulmões foram coletados e a carga bacteriana pulmonar foi avaliada como descrito no item 3.6.

O transplante de CTIPDh não foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana dos animais TB⁺CTIPDh⁺ (**Figura 13.A**). Entretanto, os animais TB⁺CTIPDh⁻ apresentaram maior morbidade em comparação com os animais tratados relação aos animais TB⁺CTIPDh⁺. Foi observada uma redução significativa no peso corporal médio dos animais TB⁺CTIPDh⁻ após 21 dias de infecção, quando comparado ao peso corporal médio dos animais que receberam o transplante (**Figura 13.B**).

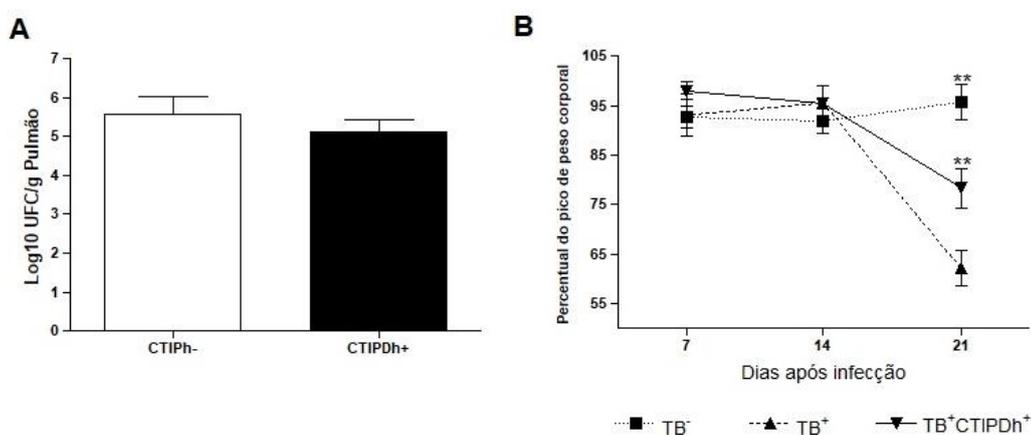


Figura 13. Crescimento bacteriano nos pulmões e morbidade de camundongos C57BL/6 infectados com M. tuberculosis e tratados ou não tratados com CTIPDh. Os camundongos foram infectados com 100 bacilos via intraqueal e receberam transplante de 2x10⁵ CTIPDh ou foram inoculados pelo PBS via intraperitoneal no 14^o e 21^o dia p.i. (A) Carga bacteriana nos pulmões foi quantificadas pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) no 28^o dia após a infecção. Os dados de 2 experimentos (n= 3 para cada grupo em cada experimento) são expressos como média ± desvio padrão (Log₁₀ UFC/g de tecido) (P>0,05, não significativo). (B) Cinética de alterações no peso corporal dos camundongos pós-infecção. A perda de peso foi utilizada como indicador de morbidade. Os dados são apresentados como a percentagem de pico de peso corporal de cada camundongo (n = 12, dados agrupados de dois experimentos independentes). As diferenças significativas entre grupo dos animais infectados e tratados com CTIPDh em relação dos grupos dos animais não tratados são indicadas por asteriscos ** (P <0,01).

5.4. Avaliação da patologia pulmonar e da expressão de IDO no pulmão dos camundongos TB⁺CTIPDh⁻ e TB⁺CTIPDh⁺

A patologia pulmonar causada pela infecção por Mtb está associada ao infiltrado leucocitário no pulmão, formação dos granulomas e diferentes sinais inflamatórios patológicos como acúmulo de exsudados serosos e celulares nas vias respiratórias, morte celular, necrose tecidual, entre outros. Desta forma, pode-se fazer um paralelo entre o peso do pulmão e a extensão do infiltrado celular inflamatório e acúmulo dos exsudados no pulmão. No 28^o dia p.i. os pulmões dos camundongos TB⁺CTIPDh⁻, TB⁺CTIPDh⁺ e TB⁻CTIPDh⁻ foram coletados e processados como descrito no item 3.7.

Macroscopicamente, os pulmões dos camundongos infectados possuem nódulos brancos de diferentes tamanhos que foram mais proeminentes e em número maior nos animais TB⁺ que não receberam o transplante de CTIPDh (Figura 14.A). Além disso, houve redução significativa do peso médio pulmonar dos camundongos TB⁺CTIPDh⁺ em comparação com o observado nos animais TB⁺CTIPDh⁻ (Figura 14.B).

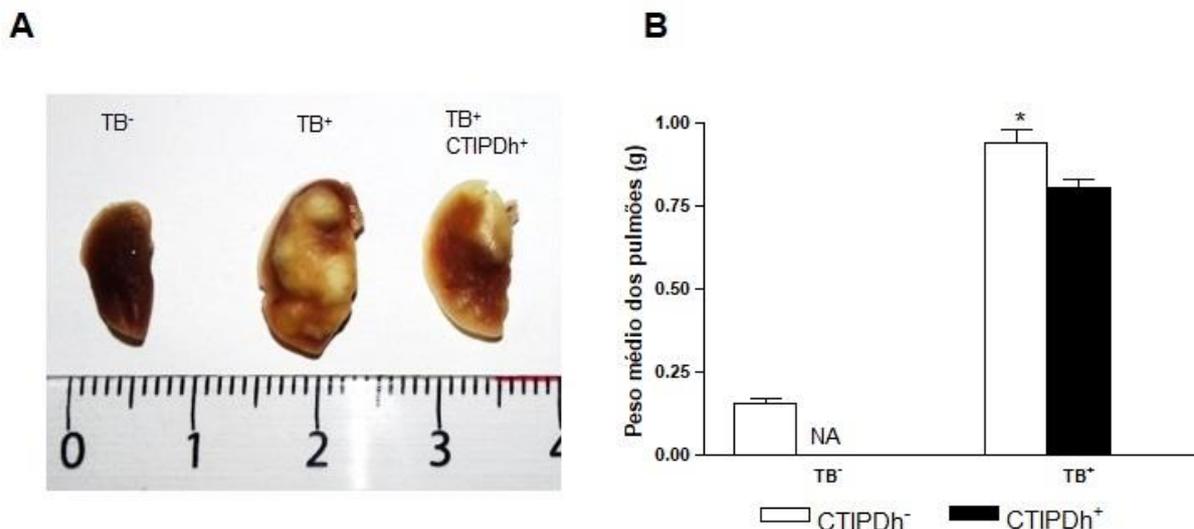


Figura 14. Macropatologia pulmonar dos camundongos C57BL/6 no dia 28 p.i. com *M. tuberculosis* e tratados com células CTIPD humanas. Camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Mtb M299 (Tb⁺) foram tratados (Tb⁺CTIPDh⁺) ou não tratados (Tb⁺CTIPDh⁻) com células CTIPD humanas. Os camundongos não infectados foram utilizados como controles (TB⁻). Imagens representativas dos lóbulos superiores dos pulmões esquerdos. (B) Peso médio dos pulmões (n = 9, para cada grupo). O peso médio dos pulmões foram calculadas pelas proporções dos valores médios dos pesos pulmonares dos grupos Tb⁺, Tb⁺CTIPDh⁺ e TB⁻. As diferenças significativas observadas entre os grupos estão indicadas pelos asteriscos * (P < 0,05). Dados representativos de três experimentos independentes.

Em teste histopatológico do pulmão, que foi acompanhado pelo tratamento do tecido pelos anticorpos anti-Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) para avaliar imunolocalização das células que expressam esta proteína (**Figura 15**), foi observado um extensivo infiltrado celular e formação de granulomas com áreas de necrose no tecido pulmonar dos camundongos TB⁺CTIPDh⁻ (**Figura 15.A**). Notavelmente, áreas reduzidas de infiltrado celular e ausência de áreas necróticas foram observadas nos pulmões dos camundongos que receberam transplante de CTIPDh (**Figura 15.E**). A expressão de IDO foi observada nas células do epitélio bronquiolar (**seta em azul, Figuras 15.A**), principalmente nas partes dos bronquíolos adjacentes aos infiltrados inflamatórios.

A ampliação da área pulmonar inflamada (**Figuras 15 B, C e D**) mostra outras células positivas para IDO como macrófagos epitelióides (seta em vermelho) e células não hematopoéticas da parede alveolar (setas em preto). As células monocíticas, linfócitos e neutrófilos do infiltrado intrabronquiolar (setas verdes) e em volta dos vasos e bronquíolos (setas brancas) e os macrófagos espumosos (seta amarela) não expressam IDO. Nos animais tratados com as CTIPDh, as áreas granulomatosas e a expressão celular do IDO foi menor (**Figuras 15.E e 15.F**). Os animais TB⁻CTIPDh⁻ apresentaram baixa expressão de IDO por células não hematopoéticas da parede alveolar e em volta dos vasos e bronquíolos (dados não mostrados).

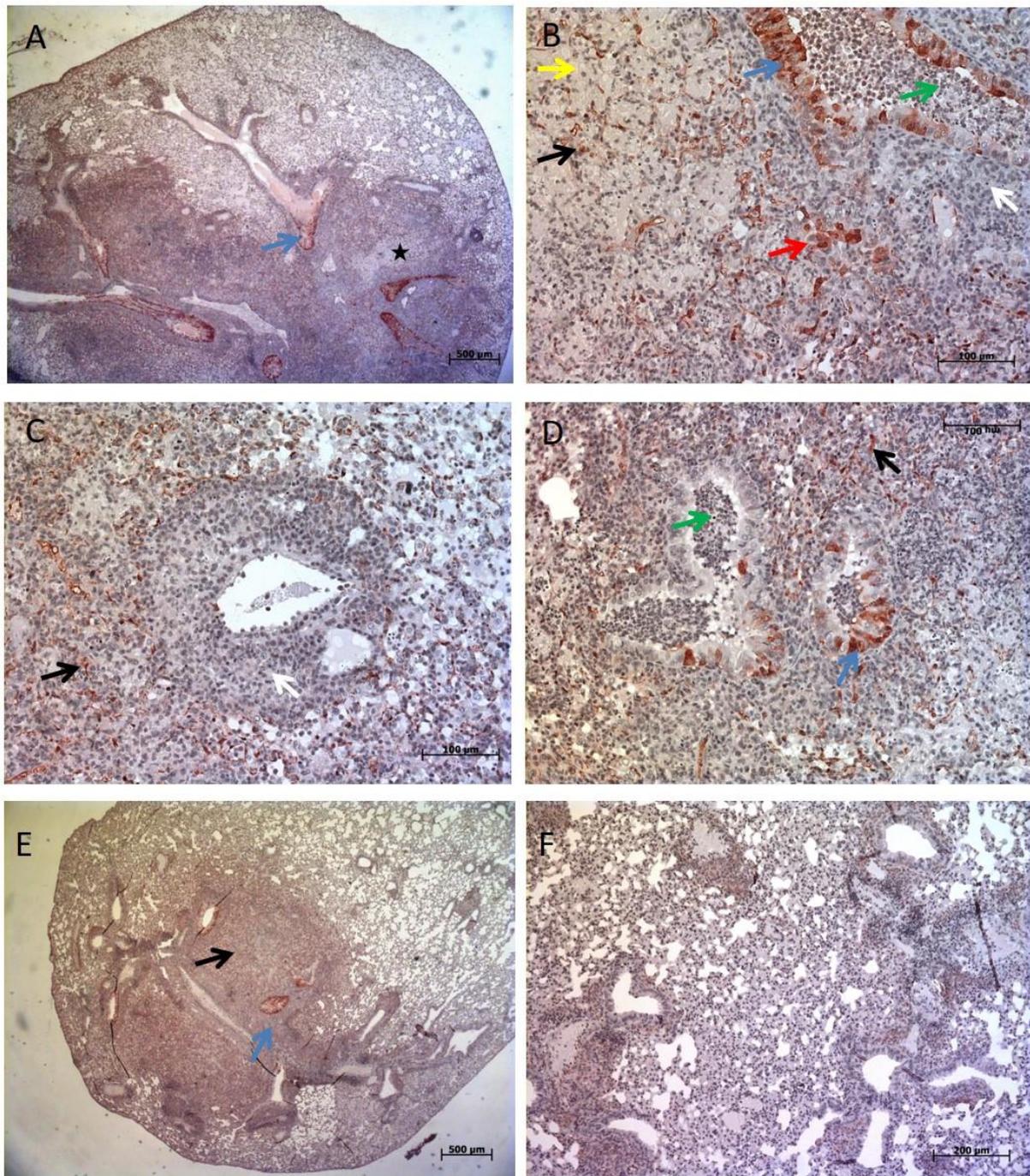


Figura 15. Histopatologia e expressão de IDO pelas células do pulmão de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e tratados com células CTIPD humanas. Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa M299 e tratados (E, F) ou não tratados (A, B, C, D) com células CTIPD humanas. Os cortes do tecido do pulmão foram obtidos após 28 dias de infecção e analisados em teste IHC. Regiões de necrose (estrela), células do epitélio bronquiolar (seta em azul). As células positivas para IDO: macrófagos epitelióides (seta em vermelho) e células não hematopoiéticas da parede alveolar (setas em preto) estão marcadas em marrom. As células monocíticas, linfócitos e neutrófilos do infiltrado intrabronquiolar (setas verdes) e em volta dos vasos e bronquíolos (setas brancas) e os macrófagos espumosos (seta amarela) não expressam IDO. As barras de escala correspondem à 500 mm, aumento de 25 x (A, E) e à 200 mm, aumento de 400 x (A, B, C, D).

5.5. Análise da composição celular do infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos infectados por Mtb e tratados com CTIPDh

Para avaliar a composição do infiltrado celular inflamatório que foi extraído no pulmão dos animais TB⁺CTIPDh⁻ e TB⁺CTIPDh⁺ em comparação com as células pulmonares obtidas dos animais TB⁻CTIPDh⁻, quantificamos diferentes populações de leucócitos mielóides por citometria de fluxo.

Ao avaliar a composição do infiltrado celular, foi observado que o número de células mieloides CD11b⁺ (**Figura 17.B**) no pulmão dos camundongos TB⁺ foi 11 vezes maior em comparação aos animais TB⁻, o que corresponde com a severidade da inflamação induzida pela infecção com a cepa hipervirulenta utilizada.

A subpopulação de neutrófilos (**Figura 17.C**) foi a maior entre subpopulações dos leucócitos identificados nos pulmões dos camundongos infectados, que não foram tratados com as CTIPDh (grupo TB⁺CTIPDh⁻), seguida pela subpopulação de macrófagos/monócitos inflamatórios (**Figura 17.D**) e células dendríticas (**Figura 17.E**). Nos animais que receberam transplante de CTIPDh, foi observada uma queda significativa no recrutamento de células para o pulmão dos animais. O número de células CD11b⁺ nos animais TB⁺CTIPDh⁺ foi 46% menor em relação aos animais TB⁺CTIPDh⁻. Quando comparamos o efeito do transplante de CTIPDh nas diferentes populações de células mielóides, foi observada uma redução de 65% da população de células dendríticas e de 20% da população de macrófagos/monócitos inflamatórios, quando comparados aos animais que não receberam o transplante. Apesar de demonstrar uma tendência na redução da população neutrofílica, nenhuma redução significativa foi observada.

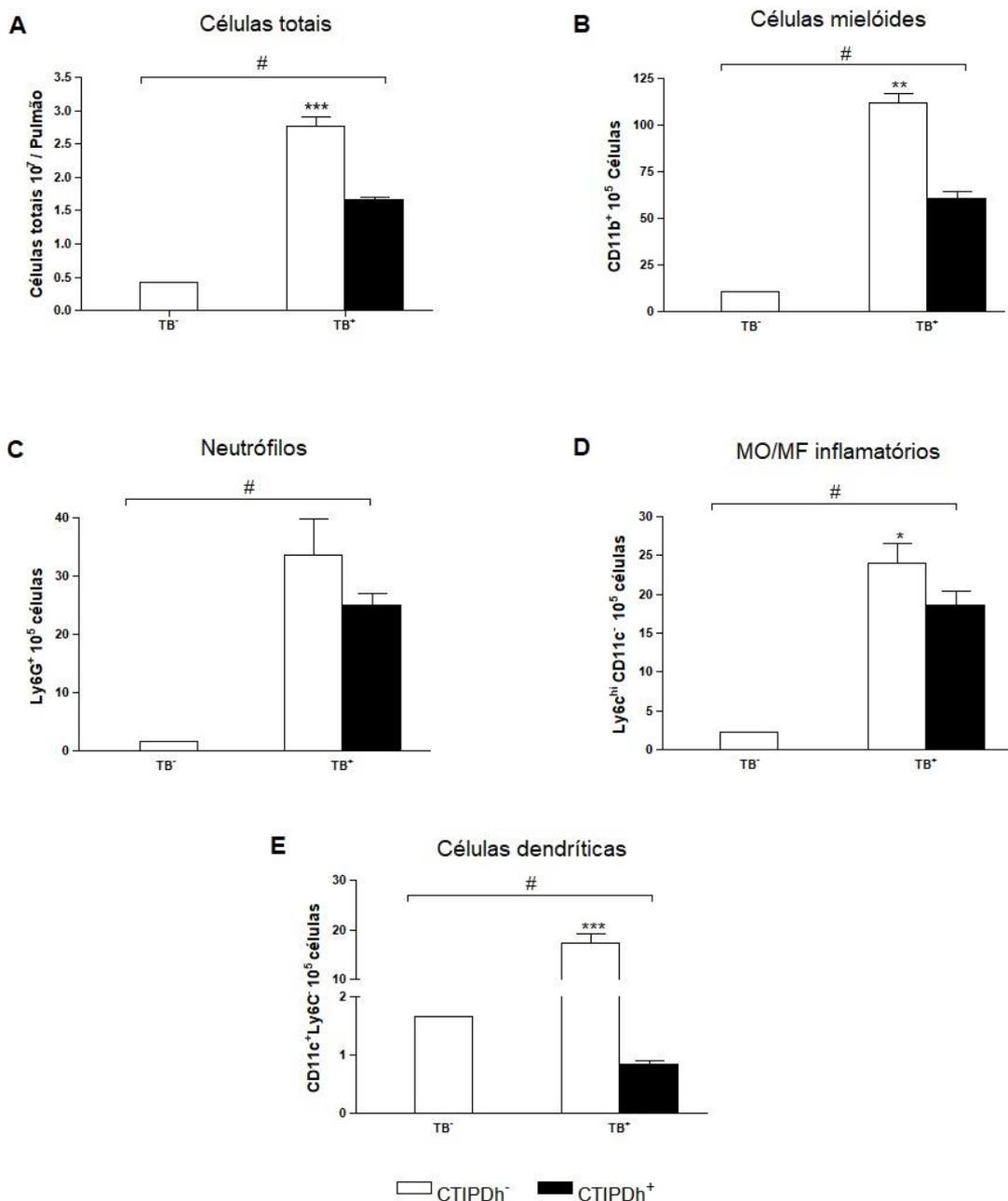


Figura 16. Recrutamento de células mielóides na fase aguda da infecção nos pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis* (Tb+) e tratados (Tb+CTIPDh+) ou não tratados com CTIPDh. Os camundongos foram infectados e tratados como indicado na legenda da Figura 12. Após 28 dias da infecção, os animais foram eutanasiados. As células dos pulmões foram extraídas, contadas e marcadas com anticorpos contra os marcadores dos leucócitos. As populações de células mielóides foram identificadas por citometria de fluxo. Os números células CD11b+ e subpopulações, incluindo os neutrófilos (células CD11b+Ly6G+), monócitos e macrófagos inflamatórios (células CD11b+Ly6C+CD11c-Ly6G-) e células dendríticas (CD11b+CD11c+Ly6C-Ly6G-), foram quantificados (N=9, por grupo). Dados referentes à média de três experimentos independentes. As diferenças significativas entre grupo tratado com CTIPDh em comparação ao grupo não tratado está indicado pelos asteriscos * (P <0,05) ** (P <0,01) e * (P <0,001).**

Com o intuito de verificar se a hiperinflamação local, e grande acúmulo de células inflamatórias no pulmão dos animais infectados, induziriam a migração de células-tronco mesenquimais intrínsecas para o foco da infecção, a população de CTMs intrínsecas foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando os marcadores de células tronco mesenquimais murinas, Sca-1, CD73 e CD90.

Houve um aumento significativo no recrutamento de CTMs intrínsecas (**Figura 18**) para o foco inflamatório nos animais TB⁺CTIPDh⁻ no 28^o dia p.i., entretanto o recrutamento destas células foi reduzido em 82% nos animais que receberam o transplante de CTIPDh, quando comparados aos animais que não receberam o transplante.

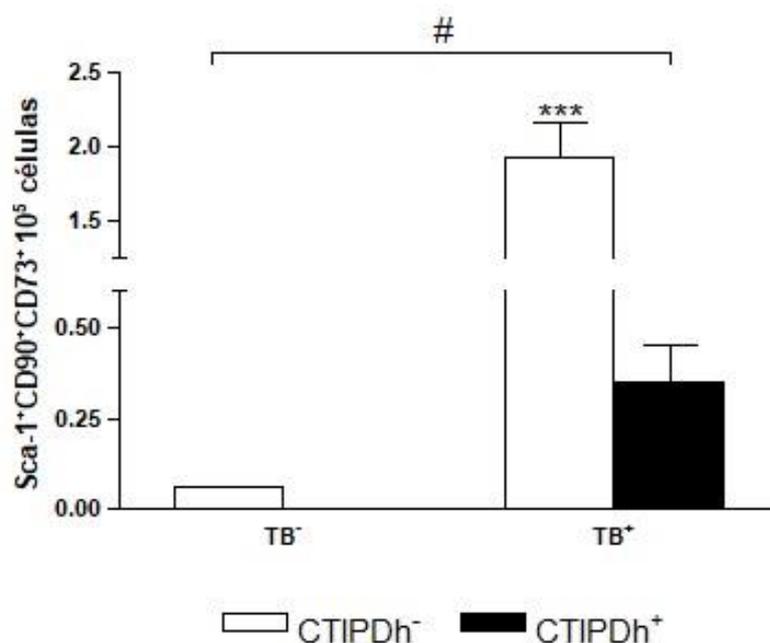


Figura 17. Recrutamento de células-tronco mesenquimais intrínsecas na fase aguda da infecção nos pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis* (Tb+) e tratados (Tb+CTIPDh+) ou não tratados com CTIPDh. Os camundongos foram infectados e tratados como indicado na legenda da Figura 12. As células dos pulmões foram extraídas, contadas e marcadas com anticorpos contra as moléculas comumente expressas em CTMs. Sca-1⁺CD90⁺ e CD73⁺. As populações de CTMs foram identificadas por citometria de fluxo. Os números totais de células Sca-1⁺CD90⁺CD73⁺ foram quantificados. (N=9, por grupo). Dados referentes à média de três experimentos independentes. As diferenças significativas entre grupos tratados em comparação ao grupo não tratado está indicado pelos asteriscos *** (P <0,001).

5.6. Análise do perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células dos pulmões dos camundongos infectados sob o efeito do tratamento com CTIPDh.

Houve um aumento significativo na produção das citocinas IL-6 (**Figura 19.A**), IL-17 (**Figura 19.B**), TNF- α (**Figura 19.C**) e IFN- γ (**Figura 19.D**) pelas células do pulmão dos camundongos TB⁺ cultivadas *ex vivo*, em comparação com as células isoladas dos animais não infectados TB⁻. O transplante de CTIPDh reduziu significativamente a produção das citocinas IL-17 e TNF- α pelas células do pulmão dos animais TB⁺ tratados em comparação com as células isoladas do pulmão dos camundongos TB⁺ que não receberam o transplante. De forma contrária, a produção das citocinas anti-inflamatórias, IL-10 (**Figura 19.E**) e IL-4 (**Figura 19.F**), foi aumentada pelas células dos animais tratados (TB⁺CTIPDh⁺). Nenhuma alteração significativa na produção de IFN- γ , IL-2 (**Figura 19.G**) e IL-6 foram observadas nos camundongos TB⁺ que receberam o transplante de CTIPDh.

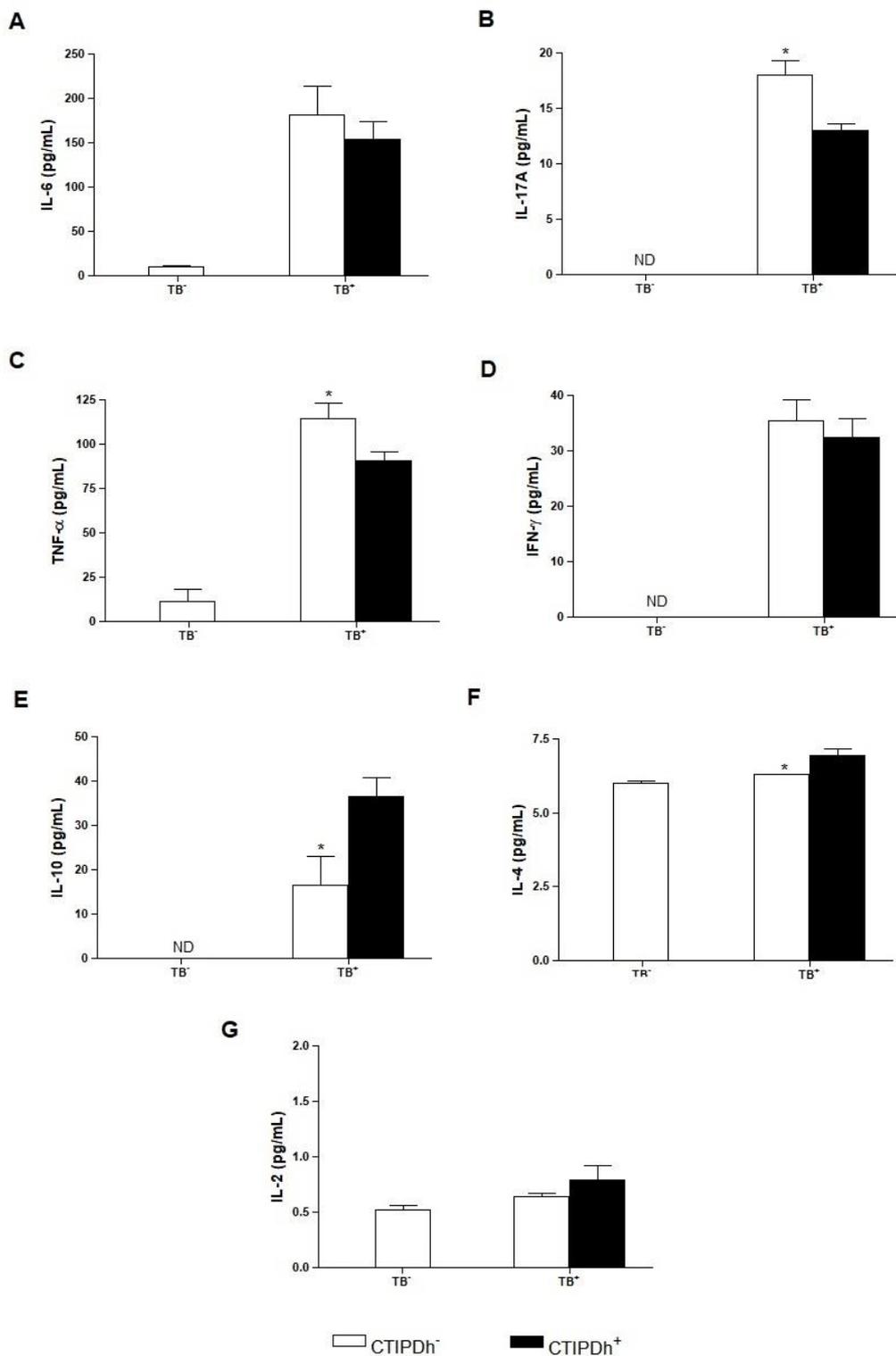


Figura 18. Produção de citocinas pelas células dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com *M. tuberculosis* (Tb+) e tratados (Tb+CTIPDh+) ou não tratados com CTIPDh. Os camundongos foram infectados e tratados como indicado na legenda da Figura 12. As células dos pulmões foram extraídas e cultivadas ex vivo por 48 horas, a dosagem dos mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das culturas foi feita por ensaio Multiplex. (N=9, para cada grupo). Dados representativos de três experimentos independentes. As diferenças significativas entre os grupos tratados em comparação ao grupo não tratado está indicado pelo asteriscos * (P < 0,05).

6. Discussão

O objetivo deste trabalho, foi avaliar o efeito imunomodulador das células-tronco mesenquimais imaturas da polpa de dente humano sobre a atividade de macrófagos ativados *in vitro*, bem como o seu papel na modulação da resposta inflamatória exacerbada provocada pela infecção por *Mycobacterium tuberculosis in vivo*.

Para avaliar se as CTIPDh alterariam o perfil de ativação de macrófagos murinos, ativados por produtos bacterianos, foram realizados cocultivos entre CTIPDh e macrófagos RAW 264.7 por 48h na presença de L.BCG e LPS. Já após de 24h de estimulação, as células RAW264.7 produzem altas concentrações de TNF- α e iniciam a produção de NO, enquanto a produção de IL-10 é relativamente baixa, particularmente em células estimuladas por LPS. Este perfil de ativação dos macrófagos corresponde a um estado de ativação M1. Os macrófagos, especificamente do subconjunto M1, são fagócitos especializados que envolvem e digerem células mortas e micróbios invasores, como bactérias. Macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias e a molécula antimicrobiana óxido nítrico, em resposta ao IFN ou a detecção de estímulos microbianos, como LPS (SPAGGIARI; MORETTA, 2012; CHO, 2014). No entanto, a presença de outros fatores exógenos e endógenos, como das citocinas IL-4 e IL-13, podem promover a ativação alternativa M2, imunossupressora, caracterizada pela produção de IL-10 e diminuição da expressão de IL-12 e TNF- α (KIM; HEMATTI, 2009). Os resultados demonstram que o cocultivo com as CTIPDh inibiu a produção de TNF- α e NO, e induziram o aumento da produção de IL-10 tanto por macrófagos estimulados por L.BCG quanto por LPS. Esta alteração no perfil de citocinas sugere a modulação do perfil de ativação dos macrófagos de um perfil inflamatório M1 para um perfil alternativo M2, demonstrando um potencial anti-inflamatório das CTIPDh. A avaliação da viabilidade celular da cultura, demonstrou que os efeitos observados ocorreram, não devido a morte celular, mas sim pela modulação exercida pelas CTIPDh.

Estes dados corroboram com dados de Jaehyup Kim e colaboradores (2009), que demonstrou que células-tronco humanas derivadas da medula óssea foram capazes de modular o perfil de ativação de macrófagos através da redução da produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-12) e indução do aumento da produção de citocinas supressoras (IL-10) por monócitos humanos isolados do sangue periférico, através da interação célula-célula. Ortiz e colaboradores (2007)

também demonstraram que o meio condicionado de CTMs inibe a capacidade de células RAW 264.7 ativadas por sílica ou LPS em secretar TNF- α . Estes dados relatam que o efeito imunomodulador das CTMs, sobre macrófagos e monócitos ativados, pode ser atribuído tanto a interação célula-célula, quanto a secreção de fatores solúveis.

Durante da fase aguda de tuberculose, que induz na maioria dos casos a resposta imune tipo Th1 e produção de IFN- γ , o perfil de ativação dos macrófagos no pulmão é clássico, do tipo M1. Como esperado, as células isoladas do infiltrado inflamatório pulmonar dos camundongos infectados com Mtb por 28 dias, produziram altas concentrações de TNF- α e IL-6, e relativamente baixas concentrações de IL-10. O Cocultivo dessas células com as CTIPDh reduziu a produção de TNF- α e aumentou a produção de IL-10, mas não foi observada nenhuma alteração na produção das citocinas pelas células isoladas dos animais de controle, não infectados. Nenhuma alteração significativa na produção das citocinas IL-4, IL-6 e IFN- γ foi observada. Estes dados apontam dois fatos interessantes: 1) as CTIPDh modularam a atividade de células somente em um ambiente com alta produção de citocinas inflamatórias; 2) as principais alterações observadas foram na produção de citocinas produzidas principalmente por macrófagos, como TNF- α . O efeito anti-inflamatório por CTMs humanas não é intrínseco, estas células exercem seu efeito somente quando são estimuladas (REN, 2009; SHI, 2010). Em condições inflamatórias, os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias que ativam as CTMs, provocando um aumento na secreção de PGE2 e aumento na expressão do IDO, que leva a depleção de triptofano e a acumulação de seus metabolitos, que, por sua vez, conduzem a transição de macrófagos para um fenótipo M2 e inibem a proliferação dos linfócitos (PROCKOP, 2013). A transição de macrófagos para um perfil de resposta reparador e homeostático, com aumento da produção de citocinas imunossupressoras, pode resultar no controle da inflamação exacerbada e estimular reparação tecidual (MURRAY; WYNN, 2011; ADUTLER-LIEBER, 2012).

Em experimentos de infecção *in vivo* observamos, em concordância com resultados previamente publicados pelo nosso grupo (ALMEIDA, 2017a), que a infecção com a cepa hipervirulenta Mtb M299 provocou uma resposta hiperinflamatória nos animais infectados, reproduzindo a resposta imune de um indivíduo imunocompetente a bactérias altamente virulentas. Esta resposta foi associada a uma intensa inflamação local com um massivo recrutamento de células

imunes para o pulmão dos camundongos TB⁺ na fase aguda de infecção (28 dias p.i.), acompanhada pela formação de granulomas, áreas de necrose e um maior nível local de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17) em comparação com pulmões de animais TB⁻. Nestes animais, foi observado também um aumento no recrutamento de células-tronco mesenquimais intrínsecas (células Sca⁺CD90⁺CD73⁺) para o foco inflamatório, como já relatado por Raghuvanshi e colaboradores (2010), combinada ao aumento da expressão de IDO nos pulmões dos animais 28 dias após infecção. O aumento na expressão de IDO é conhecido como parte de um mecanismo imunoregulatório local rápido denominado "regulação imunometabólica" que protege o hospedeiro de reações imunes hiperreativas através da indução de tolerância imune sistêmica (MUNN; MELLOR, 2013). Estímulos inflamatórios induzem tanto o recrutamento de CTMs intrínsecas para o foco inflamatório, quanto o aumento da expressão de IDO por CTMs e APC's como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (YARYGIN; LUPATOV; SUKHIKH, 2016).

A análise da expressão de IDO no pulmão dos camundongos infectados em nossos experimentos demonstrou que além dos macrófagos epitelióides, foi observada alta expressão do IDO nas células não-hematopoiéticas, células do epitélio bronquiolar e células estromais com morfologia fibroblastóide, o que sugere que pelo menos algumas dessas células foram representadas pelas CTMs. Se as células Sca⁺CD90⁺CD73⁺ detectadas no pulmão neste trabalho contribuem para a produção do IDO, ainda deve ser investigado

O transplante de CTIPDh realizado no 14^o e 21^o dia p.i. reduziu a infiltração das células mielóides nos pulmões dos animais infectados e preveniu a formação das lesões necróticas causada pela infecção com a cepa hipervirulenta Mtb M299, assim como o observado em estudos recentes do nosso grupo (ALMEIDA, 2016- Tese de doutorado). O efeito foi mediado pela redução no recrutamento dos monócitos/macrófagos inflamatórios e células dendríticas, associado à forte queda na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-17) e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4). Entretanto, não foi observada alteração na produção de IFN- γ .

Os dados observados foram diferentes dos resultados publicados por Nenasheva e colaboradores (2017) que relataram que transplante de CTMs (autólogas) isoladas de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 adultos nos dias 46 e 55 p.i. não exerceram efeito terapêutico significativo nos animais infectados com a

cepa laboratorial H37Rv. As discrepâncias entre os estudos podem ser atribuídas às diferenças no desenho de estudo utilizado, incluindo as diferenças de virulência das cepas utilizadas, que afeta o tipo de patogênese desenvolvida nos animais e as fases da infecção escolhidas para a realização do transplante das CTMs (fase aguda nos nossos experimentos e fase crônica no trabalho citado).

O tratamento dos camundongos infectados com as CTIPDh neste trabalho causou uma redução no recrutamento de CTMs intrínsecas e uma menor expressão de IDO no pulmão. Podemos sugerir que este fato foi atribuído a redução do infiltrado celular inflamatório, principalmente das populações de monócitos/macrófagos que expressam essa molécula e a redução da produção local de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α . Desta forma, especulamos que, uma vez que houve a redução da inflamação e dos níveis de produção locais de citocinas inflamatórias nos pulmões dos animais que receberam o transplante de CTIPDh, houve uma redução do recrutamento de CTMs intrínsecas para o foco inflamatório e também da expressão de IDO.

O tratamento com CTIPDh não reduziu a carga bacteriana no pulmão dos animais infectados, sugerindo que este tipo de terapia deve ser associado ao tratamento com fármacos antimicobacterianos, como a rifampicina. Apesar de não haver redução da carga bacteriana, os animais que receberam o transplante com CTIPDh apresentaram menor perda de peso em relação aos animais que não receberam o transplante, demonstrando que o transplante de CTIPDh também foi capaz de retardar a morbidade nos animais infectados.

Em conclusão, o transplante de CTIPDh exerceu efeitos benéficos no decorrer da infecção pelo Mtb. Apesar de não afetar a carga micobacteriana, o controle da resposta hiperinflamatória através da inibição do recrutamento de células imunes e controle da produção de citocinas inflamatórias, gerou impactos positivos na redução da patologia pulmonar e progressão da doença. Os dados estão de acordo os resultados publicados por Skrahin e colaboradores (2014), que relataram um efeito terapêutico do transplante de CTMs autólogas em pacientes com MDR-TB.

7. Conclusões

- ✓ As CTIPDh modularam o perfil de ativação de macrófagos RAW 264.7, que foram estimulados pelos produtos bacterianos (L-BCG e LPS) em experimentos de cocultivo, inibindo a produção de mediadores pro-inflamatórios (TNF- α e NO) e induzindo aumento na produção de IL-10, o que demonstra o potencial anti-inflamatório dessas células;
- ✓ Em experimentos de cultivo das células isoladas do pulmão de camundongos infectados com Mtb, com ou sem CTIPDh, foi observada a capacidade das CTIPDh de inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α e IL-17) e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4), demonstrando efeito imunomodulatório sobre as células provenientes do nicho patológico pulmonar;
- ✓ O efeito imunomodulatório das CTIPDh observado em experimentos de cocultivo celular foi mais pronunciado com aumento de tempo de interação, sugerindo que as CTIPDh exercem suas propriedades imunomoduladoras apenas quando propriamente ativadas pelos produtos bacterianos e/ou inflamatórios;
- ✓ A infecção pela cepa Mtb hipervirulenta induziu o recrutamento ao pulmão de células que expressam os marcadores das células tronco mesenquimais (células Sca⁺CD90⁺CD73⁺, as CTMs intrínsecas) o que coincidiu com um forte aumento na expressão de indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO) pelas células no foco inflamatório (células do epitélio bronquiolar, macrófagos epitelioides, células não-hematopoéticas com morfologia fibroblástica). Se as células Sca⁺CD90⁺CD73⁺ contribuem para a produção do IDO no pulmão ainda deve ser confirmado.
- ✓ O transplante de CTIPDh nos camundongos infectados por cepa Mtb hipervirulenta apresentou um efeito terapêutico: reduziu a infiltração das células mielóides nos pulmões, a produção das citocinas pro-inflamatórias pelas células presentes no pulmão, preveniu a formação das lesões necróticas e

reduziu área da patologia pulmonar e sinais clínicos de morbidade (perda de peso corporal).

- ✓ Foi observada uma redução no recrutamento de CTMs intrínsecas e uma menor expressão do IDO no pulmão dos animais que receberam transplante de CTIPDh, o que provavelmente foi atribuído a redução da inflamação exacerbada nestes animais. Estes dados sugerem que a produção do IDO pelas CTIPDh extrínsecas ou pelas CTMs intrínsecas não é o principal mecanismo responsável pelo o efeito imunomodulador dessas células;
- ✓ O tratamento com CTIPDh não reduziu a carga bacteriana no pulmão dos animais infectados, sugerindo que este tipo de terapia deve ser utilizada como terapia adjuvante, sendo associada ao tratamento com fármacos antimicobactérianos;
- ✓ Os resultados observados neste trabalho são relevantes na medida que a compreensão dos efeitos anti-inflamatórias das CTMs pode permitir a elaboração de novas estratégias de intervenção terapêutica para tratamento dos casos severos da TB pulmonar associada a resposta hiperinflamatória.

8. Referências

1. A KHADER, Shabaana et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p.369-377, mar. 2007.
2. ABUMAREE, M. H. et al. Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages. **Stem Cell Reviews And Reports**, v. 9, n. 5, p.620-641, jun. 2013.
3. ADUTLER-LIEBER, Shimrit et al. Human Macrophage Regulation Via Interaction With Cardiac Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology And Therapeutics**, v. 18, n. 1, p.78-86,ago. 2012.
4. AHMAD, Suhail. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of LatentMycobacterium tuberculosisInfection. **Clinical And Developmental Immunology**, v. 2011, p.1-17, oct. 2011.
5. ALMEIDA, Fabrício M. Efeitos imunomodulatórios das células-tronco mesenquimais na patogenia da tuberculose e perspectivas de intervenção terapêutica. 2016. 97f. **Tese** (Doutorado em Biociências e Biotecnologia)-Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
6. ALMEIDA, Fabrício M. et al. Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. **Plos One**, v. 12, n. 3, p.1-19, mar. 2017a.
7. ALMEIDA, Fernanda Martins de et al. Human Dental Pulp Cells: A New Source of Cell Therapy in a Mouse Model of Compressive Spinal Cord Injury. **Journal Of Neurotrauma**, v. 28, n. 9, p.1939-1949, set. 2011b.
8. AULETTA, J. J.; DEANS, R. J.; BARTHOLOMEW, A. M.. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. **Blood**, v. 119, n. 8, p.1801-1809, jan. 2012.
9. AZOUZ, Abdallah et al. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. **Medical Electron Microscopy**, v. 37, n. 3, p.141-148, set. 2004.
10. BEAMER, Gillian et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provide an Antibiotic-Protective Niche for Persistent Viable Mycobacterium tuberculosis that

- Survive Antibiotic Treatment. **The American Journal Of Pathology**, v. 184, n. 12, p.3170-3175, dez. 2014.
11. BHATT, Kamlesh; SALGAME, Padmini. Host Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. **Journal Of Clinical Immunology**, v. 27, n. 4, p.347-362, mar. 2007.
 12. CACCAMO, N. et al. Phenotypical and Functional Analysis of Memory and Effector Human CD8 T Cells Specific for Mycobacterial Antigens. **The Journal Of Immunology**, v. 177, n. 3, p.1780-1785, jul. 2006.
 13. CAPLAN, Arnold I.; DENNIS, James E.. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p.1076-1084, jun. 2006.
 14. CHO, Dong-im et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & Molecular Medicine*, [s.l.], v. 46, n. 1, p.1-9, jan. 2014.
 15. CORBETT, Elizabeth L. et al. The Growing Burden of Tuberculosis. **Archives Of Internal Medicine**, v. 163, n. 9, p.1009-1021, maio 2003.
 16. DAS, B. et al. CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells May Provide a Niche for Dormant Mycobacterium tuberculosis. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 170, p.1-10, jan. 2013.
 17. DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p.315-317, 2006.
 18. FENHALLS, Gael et al. Distribution of IFN-, IL-4 and TNF- protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. **Immunology**, v. 105, n. 3, p.325-335, mar. 2002.
 19. FERRARI, Giorgio et al. A Coat Protein on Phagosomes Involved in the Intracellular Survival of Mycobacteria. **Cell**, v. 97, n. 4, p.435-447, maio 1999.
 20. FINE, Paul EM et al. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes: a discussion document. 1999.
 21. GRIESS, Peter. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p.426-428, jan. 1879.
 22. GRIFFITHS, Gareth et al. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 11, p.827-834, 12 out. 2010.

23. GROH, M et al. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 8, p.928-934, ago. 2005.
24. HONG, Jian et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8+ T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 5, p. 621-629, 2016.
25. HUANG, Weitao et al. Interleukin-17A: A T-Cell-Derived Growth Factor for Murine and Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 6, p.1512-1518, mar. 2006.
26. ISHIKAWA, Jun et al. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. **Bone**, [s.l.], v. 83, p.210-219, fev. 2016.
27. KAUFMANN, Stefan H. E.. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 9, p.699-704, ago. 2006.
28. KAUFMANN, Stefan H.e.. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 1, p.20-30, out. 2001.
29. KAUFMANN, Stefan He; HUSSEY, Gregory; LAMBERT, Paul-henri. New vaccines for tuberculosis. **The Lancet**, v. 375, n. 9731, p.2110-2119, jun. 2010.
30. KERKIS, Irina et al. Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p.105-116, 2006.
31. KIM, Jaehyup; HEMATTI, Peiman. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. **Experimental hematology**, v. 37, n. 12, p. 1445-1453, dec. 2009.
32. KOBOLAK, Julianna et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p.62-68, abr. 2016.
33. KWAN, C. K.; ERNST, J. D.. HIV and Tuberculosis: a Deadly Human Syndemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p.351-376, abr. 2011.
34. LI, Qin et al. Pleural fluid from tuberculous pleurisy inhibits the functions of T cells and the differentiation of Th1 cells via immunosuppressive factors. **Cellular & molecular immunology**, v. 8, n. 2, p. 172, 2011.

35. MATTAR, Philipp; BIEBACK, Karen. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. **Frontiers In Immunology**, v. 6, p.1-8, nov. 2015.
36. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. 2011.
37. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. Plano nacional pelo fim da tuberculose, **Ministério da Saúde**, Brasília, 2017
38. MUNN, David H.; MELLOR, Andrew L.. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends In Immunology**, v. 34, n. 3, p.137-143, mar. 2013.
39. MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A.. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p.723-737, out. 2011.
40. NAJAR, Mehdi et al. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p.160-171, fev. 2016.
41. NÉMETH, Krisztián et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v. 15, n. 1, p.42-49, nov. 2008.
42. NENASHEVA, Tatiana et al. The introduction of mesenchymal stromal cells induces different immunological responses in the lungs of healthy and M. tuberculosis infected mice. **Plos One**, v. 12, n. 6, p.1-19, jun. 2017.
43. O'CONNOR, Jason C. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α mediate the upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guérin. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 4200-4209, 2009.
44. O'GARRA, Anne et al. The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.475-527, mar. 2013.
45. OHTAKI, H. et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 38, p.14638-14643, set. 2008.

46. ORTIZ, L. A. et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 104, n. 26, p.11002-11007, jun. 2007
47. OTTENHOFF, Tom H. M.; KAUFMANN, Stefan H. E.. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go?. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 5, p.1-12, maio 2012.
48. PANDEY, A. K.; SASSETTI, C. M.. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 11, p.4376-4380, mar. 2008.
49. PARIDA, Shreemanta K. et al. Cellular therapy in Tuberculosis. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 32, p.32-38, mar. 2015.
50. PENG, Meiyu et al. Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Increased in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 5, n. 3, p.203-208, jun. 2008.
51. PETERS, Wendy; ERNST, Joel d.. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Microbes And Infection**, v. 5, n. 2, p.151-158, fev. 2003.
52. PHILIPS, Jennifer A.; ERNST, Joel D.. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p.353-384, fev. 2012.
53. PIERDOMENICO, Laura et al. Multipotent Mesenchymal Stem Cells with Immunosuppressive Activity Can Be Easily Isolated from Dental Pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p.836-842, set. 2005.
54. POPOV, Alexey et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase–expressing dendritic cells form suppurative granulomas following Listeria monocytogenes infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 12, p. 3160-3170, 2006.
55. POPOV, Alexey et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase–expressing dendritic cells form suppurative granulomas following Listeria monocytogenes infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 12, p. 3160-3170, 2006.
56. PROCKOP, Darwin J. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2017.
57. PROCKOP, Darwin J.. Concise Review: Two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. **Stem Cells**, v. 31, n. 10, p.2042-2046, out. 2013.

58. RAFEI, Moutih et al. Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting CD4 Th17 T Cells in a CC Chemokine Ligand 2-Dependent Manner. **The Journal Of Immunology**, v. 182, n. 10, p.5994-6002, maio 2009.
59. RAGHUVANSHI, S. et al. Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 107, n. 50, p.21653-21658, dez. 2010.
60. RAI, Ramesh Chandra; BHATTACHARYA, Debapriya; DAS, Gobardhan. Stem Cells in Infectious Diseases. **Intech: Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario**, p.415-426, mar. 2012
61. RAMAKRISHNAN, Lalita. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, p.352-366, 20 abr. 2012.
62. REILEY, W. W. et al. ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 31, p.10961-10966, jul. 2008.
63. REN, Guangwen et al. Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. **Stem Cells**, v. 27, n. 8, p.1954-1962, ago. 2009.
64. RIBEIRO, S. C. M. et al. Mycobacterium tuberculosis Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely To Display Increased Virulence than Strains of the Ancient Sublineage. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 7, p.2615-2624, maio 2014.
65. ROACH, Daniel R. et al. Secreted lymphotoxin- α is essential for the control of an intracellular bacterial infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 2, p. 239-246, jan. 2001.
66. RUSSELL, David G et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature Immunology**, v. 10, n. 9, p.943-948, ago. 2009.
67. SACCHETTINI, James C.; RUBIN, Eric J.; FREUNDLICH, Joel S. Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p.41-52, jan. 2008.
68. SAUNDERS, Bernadette M; BRITTON, Warwick J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. **Immunology And Cell Biology**, v. 85, n. 2, p.103-111, jan. 2007.

69. SCHAIBLE, Ulrich E. et al. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 3, p. 1290-1296, feb. 1998.
70. SHI, M.; LIU, Z.-w.; WANG, F.-s.. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 164, n. 1, p.1-8, fev. 2010.
71. SHI, Yufang et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell Research**, v. 20, n. 5, p.510-518, abr. 2010.
72. SHKURUPIY, V. A. et al. Fibrogenesis in granulomas and lung interstitium in tuberculous inflammation in mice. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 156, n. 6, p. 731-735, apr. 2014.
73. SINGER, Nora G.; CAPLAN, Arnold I.. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p.457-478, fev. 2011.
74. SKRAHIN, Aliaksandr et al. Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 2, n. 2, p.108-122, fev. 2014.
75. SKRAHIN, Aliaksandr et al. Effectiveness of a novel cellular therapy to treat multidrug-resistant tuberculosis. **Journal Of Clinical Tuberculosis And Other Mycobacterial Diseases**, v. 4, p.21-27, ago. 2016.
76. SOLEYMANINEJADIAN, Ehsan; PRAMANIK, Krishna; SAMADIAN, Esmail. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells: Cytokines and Factors. **American Journal Of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 1, p.1-8, set. 2011.
77. SOUZA, Giliane S. et al. Apa antigen of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as a target for species-specific immunodetection of the bacteria in infected tissues of cattle with paratuberculosis. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, [s.l.], v. 143, n. 1-2, p.75-82, set. 2011.
78. SPAGGIARI, Grazia Maria; MORETTA, Lorenzo. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. **Immunology And Cell Biology**, v. 91, n. 1, p.27-31, nov. 2012.

79. SUDRES, M. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation In Vitro but Fail to Prevent Graft-versus-Host Disease in Mice. **The Journal Of Immunology**, v. 176, n. 12, p.7761-7767, jun. 2006.
80. TERNESS, Peter et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2, 3-dioxygenase–expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 4, p. 447-457, 2002.
81. TSAI, Ming C. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 2, p.218-232, fev. 2006.
82. VIA, Alessio Gai; FRIZZIERO, Antonio; OLIVA, Francesco. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 2, n. 3, p. 154, jul. 2012.
83. VLADIMIROVNA, Irina Lyadova et al. Mesenchymal Stem Cells and Myeloid Derived Suppressor Cells: Common Traits in Immune Regulation. **Journal Of Immunology Research**, v. 2016, p.1-17, 2016.
84. VON BERGWELT-BAILDON, Michael S. et al. CD25 and indoleamine 2, 3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 228-237, 2006.
85. VON BUBNOFF, Dagmar et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase–expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 4, p. 819-832, 2011.
86. WADA, Naohisa et al. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 219, n. 3, p.667-676, jun. 2009.
87. WAKAYAMA, Hirotaka et al. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute lung injury in mice. **Cytotherapy**, v. 17, n. 8, p. 1119-1129, nov. 2015.
88. WANG, Feixiang et al. Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer's disease. **Cell Biology International**, v. 41, n. 6, p.639-650, abr. 2017.
89. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global tuberculosis report 2017. In: **Global tuberculosis report 2017**. 2017.

90. YARYGIN, K. N.; LUPATOV, A. Yu; SUKHIKH, G. T. Modulation of immune responses by mesenchymal stromal cells. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 161, n. 4, p. 561-565, aug. 2016.
91. YOUNG, Douglas B. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p.1255-1265, abr. 2008.
92. ZAPPIA, E.. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. **Blood**, v. 106, n. 5, p.1755-1761, set. 2005.
93. ZHANG, Jun et al. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p.1-7, dez. 2015.
94. ZHU, Heng et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p.550-560, fev. 2010.

9. Anexos



Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 350, intitulado "Estudo de virulência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e novas abordagens terapêuticas para o tratamento adjuvante da tuberculose pulmonar no modelo murino" sob a responsabilidade da Dra. Eliena Lassounskaia, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 28/03/2017. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 28/03/2021.

Campos dos Goytacazes, 28 de março de 2017.



Clovis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais
Clovis de Paula Santos
Presidente CEUA/UENF