

Efeitos imunomodulatórios das células-tronco mesenquimais na
patogenia da tuberculose e perspectivas de intervenção
terapêutica

Fabrício Moreira Almeida

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

setembro de 2016

Efeitos imunomodulatórios das células-tronco mesenquimais na patogenia da tuberculose e perspectivas de intervenção terapêutica

Fabício Moreira Almeida

Tese apresentada ao Programa 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 doutor em Biociências e Biotecnologia.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes –RJ

setembro de 2016

Efeitos imunomodulatórios das células-tronco mesenquimais na patogenia da tuberculose e perspectivas de intervenção terapêutica

Fabício Moreira Almeida

Tese apresentada ao Programa 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 doutor em Biociências e Biotecnologia.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes –RJ
setembro de 2016

Efeitos imunomodulatórios das células-tronco mesenquimais na patogenia da tuberculose e perspectivas de intervenção terapêutica

Fabício Moreira Almeida

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.

Apoio financeiro:

- UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*Aos meus pai Carlos Fernando, a minha mãe
Fenis Maria e a minha irmã Fernanda por todo
amor dedicado a mim. E a todos que
contribuíram com a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

- ✓ Primeiramente, a DEUS, pelo dom da vida e ter me guiado até este momento.
- ✓ Aos meus pais, Carlos Fernando e Fenis Maria pelos ensinamentos, apoio, incentivo e amor que me deram durante toda minha vida.
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia, pela orientação, deste da iniciação científica, por todo o ensinamento e cuidado.
- ✓ A Dr^a. Irina Kerkis, do Instituto Butantan, pela colaboração e por ter cedido às linhagens de células-tronco polpa de dente humano usadas nos experimentos durante meu doutorado.
- ✓ Aos amigos de grupos de pesquisa: Andreza, Efranci, Giliane, Gislane, Igor, Juan, Letícia, Maicley, Matheus, Sanderson, Thatiana e Vinícius, pela convivência e toda a ajuda que me deram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial a Thatiana e o Sanderson que me ajudaram em todos as infecção e coleta dos órgãos dos camundongos.
- ✓ Aos imunoprevilegiados, Gislane, Letícia e Juan, por todos os momentos de alegrias e angustias que passamos juntos no isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais. Aprendi muito com vocês!
- ✓ Aos amigos: Antônio, David e Giliane pela amizade, conselho, ajuda e as muitas vezes que riamos tanto de quase passar mal.
- ✓ A técnica Verônica Rodrigues Lanes, por todo o cuidado, carinho e ajuda nos experimentos.
- ✓ Aos técnicos: Rita, Núbia e Fernando que sempre estiveram dispostos a me ajudar.
- ✓ A técnica Juliana Azevedo, por toda a ajuda com as leituras e análises da citometria de fluxo.

- ✓ Ao amigo Eduardo Amaral, por ter me ensinado a técnica de infecção intratraqueal em camundongos, por toda ajuda e por todas as vezes que me acolheu em sua casa, quando eu precisei ir ao Instituto Butantan.
- ✓ Ao Eduardo Osório Frare, pelos ensinamentos de cultivo de células-tronco mesenquimais e pela disposição de me ajudar sempre que precisava.
- ✓ Ao Dener Madeiro de Souza pela ajuda nos experimentos de localização das células-tronco nos tecidos dos camundongos e por sempre me receber no laboratório com muita atenção.
- ✓ A todos os professores e integrantes do LBR, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.
- ✓ Aos professores: Dr^a Alba Lucínia Peixoto Rangel, Dr. Arthur Giraldi e a Dr^a. Regina Célia de Souza Campos Fernandes, por terem aceitado participar da banca examinadora. E a Dr^a. Mariana Novo Nunes Campos por ter revisado a Tese.
- ✓ Obrigado, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Índice

Lista de abreviaturas	ix
Índice de figuras	xi
Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. Tuberculose	1
1.2. Principais famílias genéticas de <i>M. tuberculosis</i> e virulência	5
1.3. Resposta imune contra as micobactérias	7
1.4. Patogenia da tuberculose.	11
1.5. Células-tronco mesenquimais.....	13
1.5.1. Propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais.....	15
1.6. Tuberculose e Células-tronco mesenquimais	19
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Metodologia	22
3.1. Cultura de célula-tronco mesenquimal.	22
3.2. Cultivo de Micobactérias	22
3.3. Camundongos e infecção	23
3.4. Tratamento dos camundongos infectados com as CTIPDh e/ou com Rifampicina	23
3.5. Obtenção e cultura das células pulmonares dos camundongos.....	24
3.6. Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais intrínsecas no foco infeccioso	25
3.6. Avaliação do enxerto de CTIPDh nos pulmões dos camundongos infectados	26
3.7. Avaliação do crescimento micobactériano no pulmão dos camundongos tratados com CTIPDh e/ou Rifampicina.....	27
3.8. Avaliação da patologia pulmonar dos camundongos infectados e tratados com CTIPDh e/ou Rifampicina	27
3.8.1. Método de coloração com hematoxilina-eosina (H&E)	28
3.8.2. Método de coloração com tricromo de Masson.....	28
3.9. Avaliação da resposta imune nos camundongos infectados e tratados com as CTIPDh e/ou Rifampicina.	29
3.9.1. Citometria de Fluxo	30
3.9.2. Análise da produção de mediadores inflamatórios	30
3.10. A análise estatística.....	30
4. Delineamento experimental	31

5. Resultados.....	32
5.1. Estabelecimento do modelo de tuberculose severa em camundongos de linhagem C57BL/6.	32
5.2. Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais intrínsecas no foco infeccioso.	32
5.3. Análise da enxertia das CTIPDh no foco infeccioso pulmonar dos camundongos	37
5.4. Crescimento micobactériano nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com as CTIPDh	40
5.5. Avaliação da patologia nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com CTIPDh	43
5.6. Análise da composição de células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados por micobactéria e tratados com CTIPDh	52
5.6. Análise das citocinas pro- e anti- inflamatórias produzidas pelas células nos pulmões dos camundongos infectados por micobactéria e tratados com CTIPDh	57
6. Discussão	63
7. Conclusões.....	68
8. Referências Bibliográficas.....	70
Anexo I.....	81
Anexo II.....	82

Lista de abreviaturas

APCs – Célula apresentadora de antígeno

ATP – Adenosina trifosfato

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

BK – Bacilo de Koch

CD – *Cluster of differentiation* (marcador de superfície)

CR – Receptor de complemento

CTL – Linfócito T citolítico

CTMs – Células- tronco mesenquimais

EDTA – *Ethylenediaminetetracetic acid*

FOXP3 – *Forkhead box P3*

GFP – *Green fluorescent protein* (proteína verde florecente)

HGF – *Hepatocyte growth factor* (fator de crescimento de hepatócitos)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

IDO- *Indoleamina 2,3 – dioxigenase* (Idolamina 2,3 dioxigenase)

IFN- γ - Interferon gamma

IL – Interleucina

LAM – Lipoarabinomana

MDR – Multi-droga resistentes

MDR-TB – Tuberculose multi-droga resistentes

NK – Células natural *killer*

NO – Oxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Salina fosfatada tamponada

PGE₂ – Prostaglandina E2

PGL – Peptídeoglicano

PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase

RNI – Intermediários reativos de nitrogênio

ROI – Intermediários reativos de oxigênio

Sca-1 – *Stem cells antigen - 1*

TB – Tuberculose

TGF- β – Fator de crescimento tumoral β

Th – Células T *helper* (auxiliares)

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

Treg – Células T regulatórias

XDR – Extremamente multi-droga resistente

XDR-TB – Tuberculose extremamente multi-droga resistentes

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura da parede celular das micobactérias	2
Figura 2: Estimativa da taxa de incidência de Tuberculose no ano de 2014	3
Figura 3: Principais características da tuberculose: da infecção a defesa	11
Figura 4: Supressão das células do sistema imune adaptativo pelas CTMS.	16
Figura 5: Supressão das células do sistema imune inatas pelas CTMS	18
Figura 6: Delineamento experimental do tratamento com CTIPDh dos camundongos C57BL/6 dos camundongos infectados.....	31
Figura 7. Imunolocalização de células com marcadores mesenquimais Sca-1- e CD90-positivas no pulmão de camundongos infectados com a cepa de <i>M. tuberculosis</i> M299, 28 dias após infecção	34
Figura 8. Imunolocalização de células-tronco mesenquimais Sca-1- e CD90-positivas no baço de camundongos infectados com a cepa de <i>M. tuberculosis</i> M299, 28 dias após infecção	35
Figura 9. Imunolocalização de células-tronco mesenquimais Sca-1- e CD90-positivas no baço de camundongos infectados com a cepa de <i>M. tuberculosis</i> M299, 90 dias após infecção	36
Figura 10: Avaliação de enxertia das CTIPDh nos pulmões dos camundongos infectados	38
Figura 11. Avaliação de permanência do enxerto das CTIPDh nos pulmões dos camundongos infectados	39
FIGURA 12: Avaliação do crescimento micobactériano no pulmão dos camundongos infectados e tratados durante a fase aguda da infecção com CTIPDh	41
FIGURA 13: Avaliação do crescimento micobactériano no pulmão dos camundongos infectados que foram tratados durante a fase crônica da infecção com CTIPD.	42

Figura 14: Análise de peso dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados e transplantados com CTIPDh	44
Figura 15: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 28 dias após a infecção e tratamento com CTIPDh	46
Figura 16: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 120 dias após infecção com <i>M. tuberculosis</i> e tratamento com CTIPDh.	48
Figura 17: Análise do tecido fibroso nos pulmões dos camundongos C57BL/6 no dia 28 após a infecção e tratamento com CTIPDh.	50
Figura 18: Análise do tecido fibroso nos pulmões dos camundongos C57BL/6 no dia 120 após a infecção com Mtb e tratamento com CTIPDh	51
Figura 19: Estratégia de análise das subpopulações de leucócitos mielóides nos pulmões dos camundongos infectados por cepas de micobactérias e tratados com CTIPDh	52
Figura 20: Recrutamento de células mielóides na fase aguda da infecção nos pulmões de camundongos infectados com micobactéria e tratados com CTIPDh --	55
Figura 21: Recrutamento de células mielóides na fase crônica da infecção nos pulmões de camundongos infectados e tratados com CTIPDh	56
Figura 22 : Produção de citocinas pelas células dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com as cepas de micobactérias e tratados com CTIPDh	61
Figura 23: Produção de PGE ₂ pelas células dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com as cepas de micobactérias e tratados com CTIPDh	62

1 **Resumo**

2
3 A severidade da TB na fase ativa da doença está relacionada à inflamação
4 exacerbada, que leva à necrose e à destruição do tecido pulmonar com formação de
5 cavernas. O tratamento da TB está direcionado para a eliminação da micobactéria ,
6 entretanto as lesões necróticas do pulmão deixam graves sequelas como fibrose
7 pulmonar e insuficiência respiratória. Métodos terapêuticos baseados na redução da
8 inflamação e necrose pulmonar que poderiam reduzir a gravidade da patologia ainda
9 não estão estabelecidos. As células-tronco mesenquimais (CTMs), estão sendo
10 utilizadas para o tratamento de uma ampla variedade de doenças. O potencial
11 terapêutico das CTMs para tratamento da TB ainda não foi estudado. Nosso objetivo
12 foi investigar a interação das CTMs intrínsecas e extrínsecas com o nicho pulmonar
13 modificado por *M. tuberculosis* em modelo murino e sua atividade imunomodulatória.
14 Camundongos C57BL/6 infectados com cepas de micobactéria virulentas foram
15 tratadas com duas injeções intraperitoneais de 2×10^5 Células-tronco imatura de
16 polpa de dente humano (CTIPDh), e/ou tratados com 10mg/ml de rifampicina
17 durante 13 dias. Os resultados demonstraram que tanto as CTIPDh, quanto as
18 CTMs intrínsecas, foram capazes de se enxertar as lesões pulmonares, com maior
19 recrutamento nas lesões causadas pelas cepas de maior virulência. O tratamento foi
20 capaz de reduzir a necrose pulmonar na fase aguda da infecção e, posteriormente,
21 diminuir a fibrose na fase crônica. As melhorias foram associadas à inibição do
22 recrutamento dos leucócitos mielóides no pulmão, com maior redução da população
23 de neutrófilos, e uma forte queda na produção de citocinas pro-inflamatórias. Além
24 disso, somente nos animais tratados com CTIPDh foi detectado um aumento na
25 produção da prostaglandina PGE2. A comparação dos efeitos terapêuticos de
26 CTIPDh com os efeitos da rifampicina ou da combinação de ambas, demonstrou
27 que a utilização da rifampicina também promoveu uma inibição na inflamação , além
28 de forte redução no crescimento das micobactérias. Concluimos, que a utilização
29 das CTIPDh para o tratamento da TB demonstrou sua eficácia na redução da
30 inflamação exacerbada, reduzindo a necrose pulmonar e a formação de tecido
31 fibroso. A combinação da terapia celular com uso dos fármacos anti-micobactérianos
32 (rifampicina) aumenta o efeito terapêutico.

33
34 **Palavras chaves.:** Tuberculose, patogenia, tratamento, células-tronco
35 mesenquimais e imunomodulação.

Abstract

The severity of TB in the active phase of the disease is related to exacerbated inflammation, which leads to necrosis and destruction of lung tissue with formation of cavities. The treatment of TB is directed towards the elimination of mycobacteria, however, the necrotic lesions of the lung leave severe sequelae such as pulmonary fibrosis and respiratory failure. Therapeutic methods based on reduction of inflammation and pulmonary necrosis that could reduce the severity of the pathology are not yet established. Mesenchymal stem cells (MSC) are being used to treat a wide variety of diseases. The therapeutic potential of MSC for TB treatment has not been studied. Our objective was to investigate the interaction of intrinsic and extrinsic MSC with the pulmonary niche modified by *M. tuberculosis* in the murine model and its immunomodulatory activity. C57Bl/6 mice infected with virulent mycobacterial strains were treated with two intraperitoneal injections of 2×10^5 human pulp immature stem cells (CTIPDh), and / or treated with 10 mg rifampicin for 13 days. The results demonstrated that both the CTIPDh and the intrinsic CTMs were able to graft the lung lesions, with a higher recruitment in the lesions caused by the more virulent strains. The treatment was able to reduce pulmonary necrosis in the acute phase of infection and subsequently decrease fibrosis in the chronic phase. Improvements were associated with the inhibition of myeloid leukocyte recruitment in the lung, with a greater reduction in the neutrophil population, and a strong decrease in the production of proinflammatory cytokines. In addition, only in the animals treated with CTIPDh an increase in prostaglandin PGE₂ production was detected. Comparison of the therapeutic effects of CTIPDh with the effects of rifampicin or the combination of both, demonstrated that the use of rifampicin also promoted an inhibition in inflammation, in addition to a strong reduction in mycobacteria growth. We conclude that the use of CTIPDh for the treatment of TB has demonstrated its effectiveness in reducing exacerbated inflammation, reducing pulmonary necrosis and fibrous tissue formation. The combination of the cellular therapy with the use of the anti-mycobacterial drugs (rifampicin) increases the therapeutic effect.

Keywords: Tuberculosis, pathogenesis, treatment, mesenchymal stem cells and immunomodulation.

1. Introdução

1.1. Tuberculose

A tuberculose, uma das doenças mais antigas da humanidade, é uma doença granulomatosa infecto-contagiosa que acomete principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas pode atingir outros órgãos do corpo, como ossos, rins, olhos e etc (tuberculose extrapulmonar) (Jayachandran, Sundaramurthy *et al.*, 2007). O principal agente causador da tuberculose nos humanos é o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) conhecido também como bacilo de Koch (BK) em homenagem a Robert Koch que descreveu a etiologia da doença em 1882 (Kaufmann, 2006). Pode ser causada também por outras espécies de micobactérias, como *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*.

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, que compreende mais de 50 espécies de bactérias, sendo que a maioria delas não é patogênica, sendo encontradas no meio ambiente. Entretanto, algumas espécies são altamente patogênicas, incluindo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. ulcerans*, que são os agentes causadores da tuberculose, hanseníase e úlceras de Buruli, respectivamente (Cosma, Sherman *et al.*, 2003). As espécies de bactérias que compõem este gênero têm formato de bacilo de tamanho e espessura que varia de acordo com a espécie .

Os seres humanos são os únicos hospedeiros naturais do *M. tuberculosis*. Já o *M. bovis* tem, como hospedeiro, diferentes espécies de mamíferos, principalmente o gado bovino, e era um dos principais agentes causadores da tuberculose em humanos antes de pasteurização de leite (Cosma, Sherman *et al.*, 2003). O *M. tuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa de crescimento lento, que cresce e se multiplica dentro de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e outros tipos celulares. É álcool-ácido resistente, não formadora de esporos e aeróbica (North e Jung, 2004). As micobactérias possuem uma parede celular muito complexa, rica em lipídeos, e é ela a responsável por muitas das propriedades características das micobactérias, tais como resistência a ácidos e álcool, antigenicidade, resistência aos detergentes e às colorações laboratoriais comuns. Uma vez corados, os bacilos são resistentes à descoloração com soluções álcool-ácidas, daí o nome de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A estrutura da parede celular é típica de uma bactéria gram-positiva, com uma membrana interna recoberta por uma camada espessa de peptídeoglicano (PGL) e sem membrana externa, com o esqueleto de PGL ligado covalentemente a moléculas de ácido micólico-arabinogalactano,

recoberto por lipídeos livres, glicolipídeos, polipeptídeos e lipoproteínas (figura 1) (Murray *et al*, 2000).

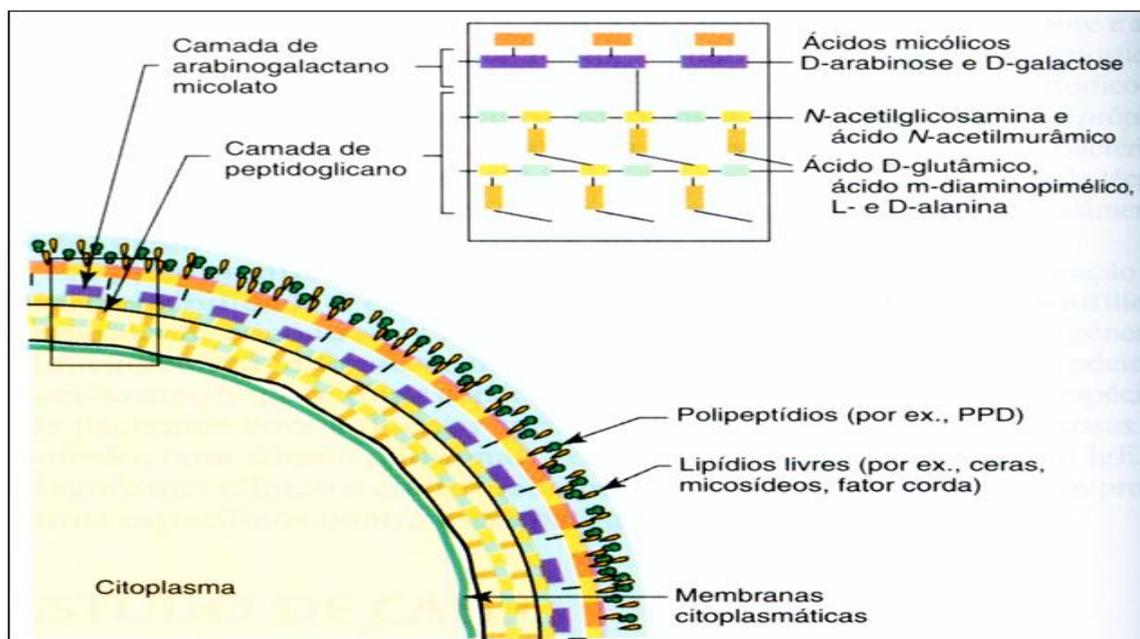


Figura 1. Estrutura da parede celular das micobactérias. Os ácidos micólicos estão ligados à camada de arabinose-galactose na cadeia lateral de arabinose. A ligação fosfodiéster liga a camada de arabinogalactano à cadeia subjacente de PGL na subunidade do ácido murâmico. PPD, Derivado protéico purificado. (MURRAY *et al*, 2000)

Apesar do avanço dos programas de saúde de controle da tuberculose, este mal permanece como um grande problema de saúde pública, principalmente, em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento e juntamente com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é uma das principais causas de morte ao redor do mundo. Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, cerca de um terço da população mundial está infectada com *M. tuberculosis* com o risco de desenvolver a doença (Who, 2015). Apesar disso, a maioria dos indivíduos infectados pelo bacilo não desenvolve a doença, estima-se que apenas 1 em cada 10 torna-se doente (Kaufmann, 2006).

Anualmente são relatados cerca de 9,6 milhões de novos casos e 1,5 milhões de mortes (1,1 milhões entre pessoas HIV negativas e 0,4 milhões entre pessoas HIV positivas) em todo o mundo (Who, 2015) (figura 2).

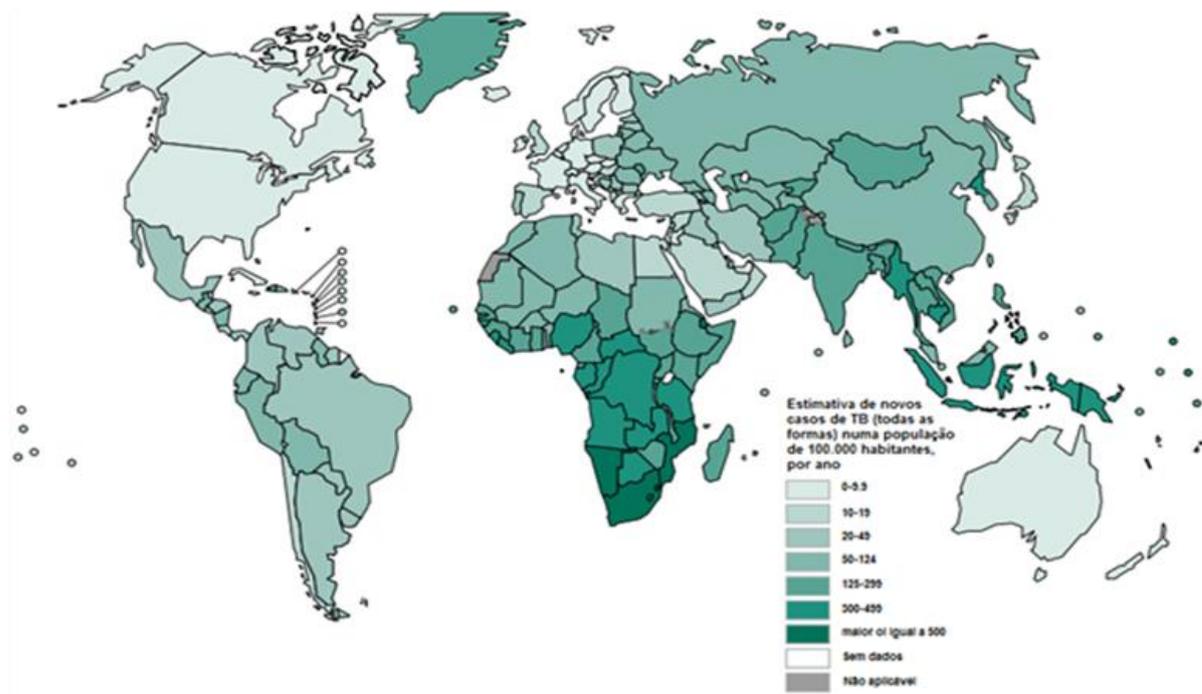


Figura 2. Estimativa da taxa de incidência de Tuberculose no ano de 2014. Figura modificada de WHO Report 2015 – Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2015)

Os maiores índices da doença ocorrem nos países mais populosos da Ásia e da África subsaariana. 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, uma estimativa de 73.692 novos casos e cerca de 4.577 mortes provocadas pela tuberculose (MERCOSUR, 2015). Dos estados brasileiros, o Rio de Janeiro é o que possui a maior taxa de incidência, com uma estimativa de 14 mil novos casos por ano (GER; SANIT, 2014).

Além da coinfeção com o HIV, outro fator que tem sido alarmante é o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* que resistem aos antibióticos de primeira linha de tratamento (cepas multidroga-resistentes – MDR) e de primeira e segunda linha (cepas extensivamente droga-resistentes – XDR). A alarmante emergência dessas cepas em países desenvolvidos tem revelado a dificuldade do arsenal terapêutico existente em combater esta importante doença (Sharma e Mohan, 2004).

O tratamento da tuberculose é feito preferencialmente com um coquetel de três antibióticos (o coquetel- RHZ) por um período de seis meses que inclui as drogas: rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (Z). A esse coquetel pode ser adicionado o antibiótico estreptomicina, o qual também é uma das drogas de

primeira linha. A interrupção do tratamento ou o uso inadequado das drogas aumenta as chances de surgirem cepas resistentes. Para tratar tuberculose multidroga-resistente, MDR-TB, são utilizadas drogas de segunda-linha, injetáveis, capreomicina, canamicina e amicacina, que são mais caras, tem mais efeitos colaterais e devem ser administradas por mais tempo.

Quando a infecção se mostra resistente às drogas de primeira e segunda linhas de quimioterápicos administrados mais a fluoroquinolona têm-se uma tuberculose extensivamente droga-resistente, XDR-TB, estando as opções de tratamento seriamente limitadas (Sacchettini, Rubin *et al.*, 2008). Em razão disto, a Organização Mundial de Saúde recomenda o tratamento supervisionado (ou DOTS - *Directly Observed Therapy Short-Course*) onde as Secretarias de Saúde acompanham o uso dos medicamentos pelo paciente.

Os sintomas associados à tuberculose são tosse crônica podendo ou não estar acompanhada de expectoração com estrias de sangue (característica da forma pulmonar), febre predominantemente noturna com sudorese intensa, perda de apetite (anorexia), emagrecimento e sensação de cansaço excessivo.

A tuberculose é transmitida basicamente pelo ar, através de gotículas de aerossóis contendo bacilos que são expelidas por pessoas com tuberculose pulmonar ativa ou laríngea (forma pouco comum), na fase bacilífera. Ao falar, tossir ou espirar, essas gotículas podem permanecer em suspensão durante horas. A inalação de poucos bacilos pode causar a infecção, que na maioria dos indivíduos permanece latente, sendo que 5-10% dos infectados desenvolvem a doença em algum período da sua vida e sem tratamento fatalmente as mortes chegam a 50% dos casos. A tuberculose também pode ser transmitida por ingestão de material contaminado, como leite *in natura* contaminado com *M. bovis*. Atualmente, esses casos são muito raros, pois a pasteurização elimina o *M. bovis* do leite.

O diagnóstico primário é baseado nos sintomas da tuberculose e de radiografia do tórax, que mostra as lesões tuberculóides no pulmão, e prova tuberculínica (teste PPD - *Purified Protein Derivative*). Já um diagnóstico de certeza é feito através da avaliação ou não da presença do bacilo em materiais biológicos (escarro, sangue, líquido pleural, líquido cefalorraquidiano), que pode ser feito por bacterioscopia (como a coloração de Ziehl-Neelsen do escarro ou cultura), e reação de PCR. Embora, tais métodos sejam úteis na abordagem inicial, é sempre desejável isolar a bactéria em cultura, para que se possa determinar a susceptibilidade desta aos

antimicrobianos e detectar eventuais resistências às drogas geralmente utilizadas, que exija ajustes terapêuticos posteriores. A reatividade positiva ao PPD reflete apenas o contato anterior com *M. tuberculosis* (ou outra micobactéria que pode ser ou não patogênica ou até mesmo reatividade cruzada com a vacina BCG), e não significa, necessariamente, que o indivíduo esteja doente ou que vá desenvolver a doença.

A prevenção da tuberculose deve ser feita através da detecção e tratamento dos pacientes. Além disso é importante vacinar os recém nascidos com a vacina BCG (BCG- **B**acilo de **C**almette **G**uérin). A BCG protege as crianças e o adulto jovem contra as formas graves da tuberculose primária disseminada nos pulmões e outros órgãos (forma miliar) e meningite tuberculosa (ABC da SAÚDE).

Embora a BCG faça a prevenção das formas disseminadas da doença em jovens, a mesma é falha em prevenir a forma pulmonar e as reinfecções. No Brasil, a BCG está no calendário básico de vacinação, sendo aplicada no primeiro mês de vida. A aplicação da dose de reforço como forma profilática é desprovida de comprovação científica (Kaufmann *et al.*, 2001). No Brasil a aplicação dessa dose foi suspensa em junho de 2006.

O difícil controle da epidemia mundial de tuberculose deve-se à falta de uma vacina mais eficaz que a BCG, ao surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos antibióticos e à falta de diagnósticos rápidos e sensíveis. Além disso, a resposta imune contra a micobactéria (principalmente, senão exclusivamente, baseada na resposta imune celular) é complexa e não está totalmente caracterizada (O'garra, Redford *et al.*, 2013).

1.2. Principais famílias genéticas de *M. tuberculosis* e virulência

Fatores associados à virulência do patógeno são de extrema importância para a persistência do microrganismo no hospedeiro, conferindo a capacidade de evasão do sistema imune e proliferação (Kaufmann, 2006). Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, foi possível a discriminação das cepas de *M. tuberculosis* e a possibilidade de realização de estudos epidemiológicos (Lopez, Aguilar *et al.*, 2003). O sequenciamento completo do cromossomo circular da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* foi de suma importância para auxiliar a compreensão acerca da patogenia induzida pelo complexo *M. tuberculosis* (Cole e Barrell, 1998; Cole, Brosch *et al.*, 1998).

Os padrões de espoligotipagem (*spacer oligonucleotide typing* – tipagem de espaçadores oligonucleotídeos) permitem o agrupamento das diferentes cepas de *M. tuberculosis* em famílias epidemiologicamente importantes, como as famílias Beijing, Haarlem, S, T, X, East African-Indian (EAI) e a Latin American-Mediterranean (LAM) (Brudey, Driscoll *et al.*, 2006). As técnicas de biologia molecular desenvolvidas permitem a caracterização das cepas em todo mundo, facilitando a comparação entre cepas de diferentes laboratórios e hospitais, permitindo a determinação do perfil epidemiológico e a prevalência destas famílias nas diferentes regiões geográficas.

A virulência micobacteriana é tradicionalmente determinada com base nos índices de mortalidade e morbidade dos modelos animais, histopatologia encontrada e resultados da quantificação do número mínimo de bactérias capaz de induzir a doença; assim como o número de bactérias encontradas no hospedeiro após a infecção inicial. A avaliação do crescimento das cepas de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos *in vitro* é um método alternativo para avaliação das propriedades biológicas de bactéria associadas à virulência. A avaliação do crescimento intracelular da micobactéria dentro dos macrófagos infectados é um dos principais parâmetros analisados nos estudos de virulência das cepas.

Para a virulência micobacteriana a expressão de alguns genes são cruciais. A região do genoma conhecida como RD-1 (região de diferenciação 1) é responsável por codificar fatores associados à virulência micobacteriana, por exemplo as proteínas ESAT-6 e CFP-10 (Ganguly, Siddiqui *et al.*, 2008).

A CFP-10 é capaz de diminuir a produção de ROS nos macrófagos, o que leva ao aumento da atividade de fosfatases nos vacúolos fagocíticos, culminando na desfosforilação de proteases lisossômicas. Já o reconhecimento da proteína ESAT-6, pelo receptor TLR-2 na superfície dos macrófagos, inibe a ativação de fatores de transcrição regulados por $\text{INF-}\gamma$ e $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Ganguly, Siddiqui *et al.*, 2008). Foi descrito que a ESAT-6 é capaz de formar poros na membrana da célula infectada, além de induzir a ativação de sinais pró-inflamatórios via secreção de $\text{IL-1}\beta$ (Wong e Jacobs, 2011). A produção de $\text{IL-1}\beta$, por sua vez, é capaz de induzir a maturação do fagossoma (Mishra, Moura-Alves *et al.*, 2010), porém o recrutamento da proteína coronina-1, induzido pela micobactéria, causa a inibição da fusão do fagossoma com o lisossoma, sendo este um mecanismo de escape micobacteriano (Jayachandran, Sundaramurthy *et al.*, 2007). A ESAT-6 também facilita a translocação da

micobactéria do fagossoma para o citosol, sendo um dos mecanismos de escape do patógeno à resposta microbida induzida pelo macrófago (Simeone, Bobard *et al.*, 2012).

Fatores lipídicos micobactérianos também são descritos como responsáveis pelo aumento da virulência da micobactéria. Chan e colaboradores demonstraram que a adição de LAM em cultura de macrófagos foi capaz de inibir a ativação desta células pelo IFN- γ (Chan, Fan *et al.*, 1991). Sua liberação dentro do fagossoma e incorporação nas endomembranas causa o bloqueio da maturação fagolisossomal (Welin, Winberg *et al.*, 2008). O mesmo foi demonstrado para o Man-LAM de *M.tuberculosis* (Fratti, Chua *et al.*, 2003).

Dentro dos diferentes genótipos de micobactérias, foi observado que o *Beijing* apresenta alta virulência, sendo verificado maior contagem de bacilos no pulmão, ampla lesão tecidual e baixa sobrevivência dos modelos animais infectados (Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014). Lasunskia e colaboradores (2010) mostraram que existem diferenças na virulência de cepas com o genótipo da Beijing moderno ou ancestral. Sendo observada maior virulência nas cepas de genótipo moderno do que nas cepas de genótipo ancestral (Lasunskia, Ribeiro *et al.*, 2010; Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014). O aumento da virulência das cepas com genótipo Beijing pode ser atribuído à seleção natural destas cepas, possivelmente, devido à vacinação com a BCG, tratamento com quimioterápicos e alta frequência mutacional das cepas com esse genótipo (Parwati, Van Crevel *et al.*, 2010).

1.3. Resposta imune contra as micobactérias

Algumas semanas após a implantação do bacilo no pulmão ocorre uma pequena reação inflamatória, que não caracteriza a doença. Caso o sistema imune do hospedeiro esteja bem vigilante, na maioria dos casos, a bactéria não provocará doença, sendo mantida latente nas estruturas de contenção – granulomas; mas se por algum motivo houver uma supressão do sistema imune do hospedeiro, esta pode sair do seu estado latente e vir a causar doença (Schluger e Rom, 1998; Schluger, 2001).

A resposta imune contra o *M. tuberculosis* é principalmente, ou se não exclusivamente, efetuada através da resposta celular (Th1). Como o bacilo entra no organismo pela via aérea, o epitélio brônquico representa a primeira linha de defesa do hospedeiro, o qual produz peptídeos com ação antimicrobiana de largo espectro.

A defesa inicial contra o bacilo, uma vez que este alcance os alvéolos pulmonares, é feita pelos macrófagos alveolares que são capazes de inibir o crescimento da bactéria através da fagocitose e que participa também na apresentação de antígenos micobactérianos a linfócitos T nos gânglios linfáticos de drenagem (Schluger e Rom, 1998; Schluger, 2001; O'garra, Redford *et al.*, 2013)

Os processos envolvidos na fagocitose incluem a interação do bacilo com o macrófago através dos receptores de complemento CR1, CR3 e CR4 e também pelos receptores de manose (MR), e receptores *scavenger*, que facilita a internalização da bactéria. A interação com receptores de imunoglobulinas (FcRs) e receptores Toll estimula os mecanismos de defesa do hospedeiro, promovendo a ativação dos macrófagos (O'garra, Redford *et al.*, 2013)

Depois que as micobactérias são fagocitadas, elas estão sujeitas a serem destruídas pela fusão do fagossoma com os lisossomos, pela geração de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e geração de intermediários reativos de nitrogênio (RNI), principalmente pelo óxido nítrico (Schluger e Rom, 1998). Porém as micobactérias podem impedir ou atrasar a fusão fagolisossomal através de moléculas de lipoarabinomanana (LAM) que causam distúrbios na função dos fagossomas, além disso, podem impedir o amadurecimento fagossomal e a acidificação do fagossoma e dessa forma inibir a atividade das hidrolases ácidas lisossomais (Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002). Além dos macrófagos, outras células do sistema imune são requeridas para o controle da tuberculose. A interação dos macrófagos com outras células efetoras ocorre através da produção de citocinas e quimiocinas (Flynn e Chan, 2001).

Uma das citocinas chaves da resposta contra a tuberculose é o interferon-gama (IFN- γ). Esta citocina é produzida por linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e células NK. Ela ativa a produção de RNI principalmente óxido nítrico nos macrófagos através da indução da expressão do gene NOS2. Camundongos *knock-out* para este gene ou para o receptor de IFN- γ são mais suscetíveis para a infecção com *M. tuberculosis* (Flynn e Chan, 2001; O'garra, Redford *et al.*, 2013). O TNF- α , fator de necrose tumoral, citocina que age sinergicamente com o IFN- γ na ativação da atividade microbicida dos macrófagos, é secretado por células dendríticas e macrófagos. O TNF- α é fundamental na organização do granuloma, regulando a expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas nos linfócitos e monócitos. O TNF- α facilita a migração celular para o local da infecção e é essencial

no início da infecção limitando a replicação do bacilo (Flynn e Chan, 2001; Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002). Outra citocina muito importante na resposta contra o *M. tuberculosis* é a IL-12, que tem papel fundamental na resposta contra patógenos intracelulares. Esta citocina é rapidamente secretada por macrófagos e células dendríticas após a fagocitose da micobactéria. Promove a diferenciação de linfócitos T imaturos em linfócitos Th1, os principais produtores de IFN- γ (Flynn e Chan, 2001; Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002) *al.*, 2001).

A resposta pró-inflamatória induzida pelo *M. tuberculosis* é antagonizada pelas citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-10 e TGF- β . Estas podem inibir os efeitos ou a produção das citocinas pró-inflamatórias. A IL-10 é produzida por macrófagos após a fagocitose do *M. tuberculosis* e ligação com LAM. A IL-10 regula negativamente a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, desativando os macrófagos e inibe diretamente a resposta de células Th1, bem como a função das APCs (Flynn e Chan, 2001; Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002; Mishra, Moura-Alves *et al.*, 2010) O efeito deletério da IL-4 em infecções intracelulares (incluindo micobactérias) foi atribuído à supressão da produção de IFN- γ , inibição da atividade dos macrófagos e promoção da resposta Th2 (Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002; O'garra, Redford *et al.*, 2013)

Produtos micobactérianos, como LAM de cepas virulentas, induzem produção de TGF- β por monócitos e células dendríticas, inibindo a proliferação e produção de IFN- γ pelas células Th1. Em macrófagos, o TGF- β antagoniza a apresentação de antígenos, produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação celular. Seletivamente induz produção de IL-10 e, juntas, reprimem a produção de IFN- γ (Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002; O'garra, Redford *et al.*, 2013).

A resposta protetora contra *M. tuberculosis* exige um equilíbrio entre citocinas anti-inflamatória e pró-inflamatórias. Uma resposta inflamatória exacerbada provoca excessivo dano tecidual e ao contrário, uma predominância das citocinas anti-inflamatórias provoca a proliferação da micobactéria (Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002; O'garra, Redford *et al.*, 2013)).

O fato das micobactérias residirem nos fagossomas de células fagocíticas garante um pronto acesso à apresentação de seus antígenos através de MHC classe II a linfócitos T CD4⁺. As células T CD4⁺ compreendem duas populações funcionais distintas, de perfil Th1 e Th2. As células auxiliares Th1 produzem IFN- γ e IL-12, aumentando a atividade microbicida dos macrófagos e ativam outras células inflamatórias. As células auxiliares Th2 produzem predominantemente IL-4, IL-5, IL-6

e IL-10, favorecendo o crescimento das células B e a produção de anticorpos (Flynn e Chan, 2001).

Outra subpopulação de T CD4⁺ é composta pelas células Th17. A diferenciação de Th0 para esta subpopulação se dá por ação em conjunto de TGF-β, oriunda das células Tregs, e IL6, oriunda de macrófagos e/ou dendríticas ativadas. A IL-23, secretada por células dendríticas ou macrófagos, se faz necessária para a manutenção e proliferação desta população. As Th17 são responsáveis por secretarem IL-17, citocina responsável pela estimulação da secreção das quimiocinas KC/CXCL1 e MIP-2/CXCL2 que participam do recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção, e induzem a produção de IFN-γ por Th1 (Cooper e Khader, 2008; Torrado e Cooper, 2010; Gopal, Monin *et al.*, 2014).

Células T CD8⁺, assim como as células T CD4⁺, produzem IFN-γ. Mas a principal função destas células é causar a lise de células infectadas. Estas células possuem grânulos que contêm granulolisina, granzima B e perforina. A perforina proteína que causa poros na membrana das células alvo podendo levar a lise, a granzima induz a apoptose da célula e a granulolisina induz a morte direta da micobactérias (Flynn e Chan, 2001; Van Crevel, Ottenhoff *et al.*, 2002). Assim a resposta humana de linfócitos T a *M. tuberculosis* é caracterizada pela participação de várias subpopulações de linfócitos T com funções semelhantes, secretando IFN-γ, que podem lisar células infectadas e ajudar os macrófagos a controlar o crescimento micobactériano (O'garra, Redford *et al.*, 2013).

A figura 3 mostra os principais eventos da resposta contra o *M. tuberculosis*..

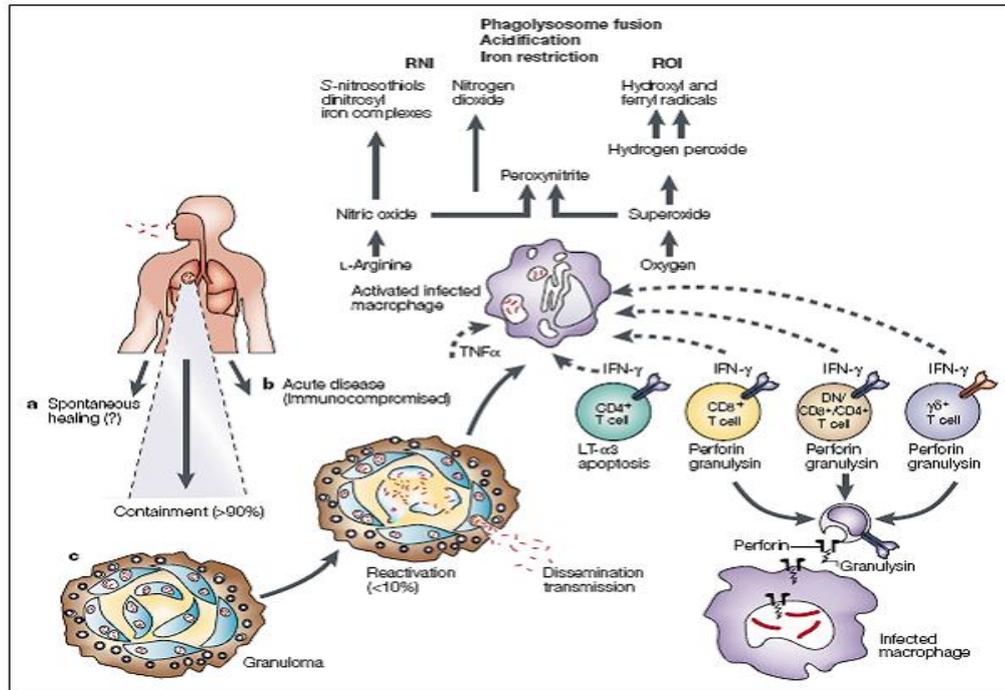


Figura 3. Principais características da tuberculose: da infecção a defesa. (KAUFMAMNN, 2001)

1.4. Patogenia da tuberculose.

O bacilo ao chegar nos pulmões pode provocar principalmente dois tipos de manifestação da tuberculose: tuberculose primária (primo-infecção) e pós-primária (secundária). A forma primária é a que ocorre em indivíduos que ainda não tiveram contato com o bacilo, sendo, portanto, mais comum em crianças. No primeiro contacto, o bacilo geralmente se localiza no ápice do lobo inferior ou na base do lobo superior do pulmão, na região subpleural, onde ocorre um processo inflamatório inicial mediado por neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos alveolares e formação de um nódulo exudativo. Se esse primeiro mecanismo de defesa não for suficiente para conter o avanço do bacilo, é iniciada a formação de uma inflamação granulomatosa cuja função básica é a de barreira à disseminação do bacilo aos outros locais do tecido normal (Hunter, Jagannath *et al.*, 2007) (HUNTER *et al.*, 2007).

O granuloma inicial formado é chamado de nódulo de Ghon ou nódulo primário e os bacilos se espalham do pulmão para os linfonodos do hilo pulmonar e provocam lesões idênticas àquelas do pulmão ou hematogenicamente através de todo o organismo. A doença primária evolui a partir do foco pulmonar (processo pneumônico parenquimatoso) ou, com maior frequência do foco linfonodal (BOMBARDA *et al.*, 2001). Dependendo do número e da virulência dos bacilos e do

grau de hipersensibilidade e resistência do hospedeiro, pode evoluir para cura ou para uma doença progressiva. Em indivíduos imunodeficientes o curso da infecção primária pode ser mais grave, com disseminação progressiva, cavitação, pneumonia tuberculosa ou tuberculose miliar (HUNTER et al., 2007). Entretanto, a tendência, na maior parte dos indivíduos, é para a cura espontânea da lesão, que ao passar do tempo se torna menos celular, envolta por fibrose densa, podendo ocorrer calcificação (que pode ser vista radiologicamente) (GIL et al., 2010).

A tuberculose pós-primária, também chamada secundária ou de reativação, ocorre após a imunidade adaptativa ter sido estabelecida e em decorrência da reativação do foco primário (reinfecção endógena), devido à diminuição das respostas imunológicas efetoras, ou a partir de uma infecção (reinfecção exógena) (Hunter, Armitige *et al.*, 2009). O desenvolvimento deste tipo da doença requer quase que na totalidade hospedeiros imunocompetentes que desenvolvam uma resposta imune celular forte (tipo Th1) que pode ser subvertida no pulmão para produzir cavitações.

A lesão secundária geralmente localiza-se no ápice do lobo superior, sob forma de uma consolidação pequena. Com o passar do tempo, novos granulomas vão se consolidando e a necrose pode confluir, formando áreas de destruição pulmonar. Em casos favoráveis, ocorre a cicatrização da lesão e cura do paciente. Entretanto, alguns pacientes apresentam lesões mais extensas e graves, (tuberculose pulmonar progressiva) que destroem brônquios e vasos. Os bacilos presentes na periferia dos granulomas caseosos podem causar a morte dos macrófagos e se incorporam à massa caseosa o que provoca uma lesão que lentamente se expande, obstruindo e destruindo os brônquios e bronquíolos (Hunter, Olsen *et al.*, 2006).

O material necrótico é expelido para a luz brônquica e a cavidade resultante é denominada caverna. O material necrótico pode se espalhar pelo pulmão produzindo novas lesões e até mesmo causar pneumonia tuberculosa. A tuberculose pós-primária é iniciada por um processo de bronco-pneumonia exudativa. A doença nos estágios iniciais é caracterizada por exudato de células inflamatórias mononucleares, fibrina, neutrófilos dentro dos espaços alveolares. A infecção estimula o acúmulo progressivo de lipídeos dentro dos macrófagos espumosos e os septos alveolares tornam-se infiltrados por linfócitos (Sakamoto, 2012). Durante os estágios iniciais, a infecção é restrita aos macrófagos espumosos, ricos em lipídeos.

Entretanto, poucos microrganismos são encontrados nos espaços intersticiais tissulares, linfonodos ou qualquer outro órgão que não seja o pulmão. A necrose na tuberculose pulmonar exudativa pode se desenvolver rapidamente e produzir a pneumonia tuberculosa caseosa (Sakamoto, 2012). A caseose é a coagulação do tecido, consistindo de necrose celular precedida por uma infiltração gordurosa degenerativa e precipitação de fibrina e substâncias hialino-fibrinóides. Isto pode ocorrer rapidamente e acometer extensas áreas do pulmão, resultando na formação das cavidades. Neste estágio, as pessoas podem expectorar pedaços do pulmão necrosado e grandes quantidades de sangue (Barry, Boshoff *et al.*, 2009).

A pneumonia tuberculosa ocorre em indivíduos muito susceptíveis, sendo freqüentemente fatal. O material necrótico pode ser deglutido e alcançar o tubo digestivo, provocando tuberculose intestinal. Esta, geralmente ocorre no íleo terminal sob forma de úlceras múltiplas, anulares, acompanhadas de fibrose e lesão ganglionar satélite. Caso a disseminação ocorra por via linfo-hematogênica, o paciente apresentará uma tuberculose miliar. Neste caso as lesões podem se limitar aos pulmões ou atingir muitos órgãos tais como supra-renais, baço, fígado, linfonodos, medula óssea, etc. Esta é uma forma grave e muitas vezes fatal de tuberculose (Sakamoto, 2012).

A geração de uma abordagem terapêutica que visa prevenir ou reduzir a necrose pulmonar é muito importante para manter a integridade do pulmão. Assim, as células-tronco mesenquimais, por apresentarem propriedades anti-inflamatórias e de reparação tecidual, podem ser um convidado a essa abordagem terapêutica.

1.5. Células-tronco mesenquimais

O termo células-tronco define células que são indiferenciadas com habilidades de autorrenovação e capazes de se diferenciar em células especializadas.

As células-tronco podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em células-tronco embrionárias ou células-tronco adultas (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998; Ryan, Barry *et al.*, 2005). As células-tronco embrionárias são pluripotentes com capacidade ilimitada de auto-renovação e diferenciação, sendo obtidas das células internas do blastocisto (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998). Já, as células-tronco adulta podem ser encontradas virtualmente em todos os órgãos, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase e integridade tecidual. As células-tronco adulta são multipotentes, dando origem apenas a células do folheto

embrionário germinativo de sua origem. A obtenção e cultivo das células-tronco adultas é mais fácil do que as embrionárias, pois não esbarra nos problemas éticos e religiosos da utilização de embriões para obtenção das células embrionárias. Dentre as diferentes células-tronco adultas temos as células-tronco mesenquimais.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) ou células multipotentes de estroma são células-tronco adultas que podem ser isoladas de vários tecidos e cultivadas *in vitro*. Possuem as habilidades de autorrenovação, diferenciação em diferentes linhagens celulares e atividades anti-inflamatórias (imunomoduladora) e tróficas, com grande potencial na medicina regenerativa (Via, Frizziero *et al.*, 2012). A primeira descrição das CTMs, foi em 1968 por Friedensteins e colaboradores, na medula óssea (Friedenstein, Petrakova *et al.*, 1968). Posteriormente, em 1991, Caplan propôs a existência de uma população de célula-tronco adulta no estroma da medula óssea, de origem mesodérmica e que expressavam os marcadores CD105 e CD73, estas foram denominadas de célula-tronco mesenquimal (Caplan, 1991). A população total de CTMs na medula óssea é em torno de 0,001% a 0,1% das células totais.

As CTMs são reconhecidas segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular pelas seguintes marcas: formato fibroplástico, aderência ao plástico dos frascos de cultura; positivas para os marcadores CD105, CD73, CD90 e negativas para os marcadores hematopoéticos CD34, CD45, CD11a, CD19 ou CD79a e CD14 ou CD11b,; e capazes de diferenciar, sob estímulos, para osteócitos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (Shi, Liu *et al.*, 2011). Os marcadores reconhecidos Sociedade Internacional de Terapia Celular são para CTM de humanos. Mas sabe-se que os marcadores de CTMs bem como suas propriedades podem variar dependendo da espécie e do tecido onde foram isoladas (Via, Frizziero *et al.*, 2012). Células isoladas de medula óssea de camundongo podem expressar os marcadores como SCA-1, CD90, CD44, CD73 e PDGFR α +. E a expressão dos marcadores pode variar durante o período de cultura das células *in vitro* (Baustian, Hanley *et al.*, 2015).

Outra característica das CTMs é o imunoprevilégio, elas não são reconhecidas pelo sistema imune do receptor devido à sua baixa expressão de moléculas de MHC classe I, falta de MHC classe II e das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86, CD40, o que facilita a utilização das CTMs exógenas nas terapias propostas (Heng, Dudakov *et al.*, 2009). Além da medula óssea pode se isolar as CTMs de córnea,

retina, polpa de dente, pele, tecido adiposo, fígado, pâncreas, sistema nervoso e rim, tecido ósseo e outros tecidos (Kobolak, Dinnyes *et al.*, 2015).

1.5.1. Propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais

Além da capacidade de diferenciação e regeneração tecidual as CTMs possuem, diferentemente de outros tipos de células-tronco, a capacidade de modular a resposta imunológica. O que as torna ótimas candidatas ao uso na medicina regenerativa e como possível uso para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (Shi, Liu *et al.*, 2011).

As CTMs podem modular a resposta imune inata e adaptativa, sua atividade imunomodulatória é realizada por via parácrina ou através do contato direto com as células do sistema imunológico. Os fatores parácrinos que tem sido apontados como os responsáveis pela propriedade imunomoduladora destas células são: TGF- β 1, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-10 (IL-10), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), através do CD73 (uma ectonucleotidase) que converte ADP e ATP em AMP, diminuindo a ativação da inflamação via os receptores purinérgicos (Soleymaninejadian, Pramanik *et al.*, 2012; Antonioli, Pacher *et al.*, 2013; Vladimirovna, Sosunova *et al.*, 2016; Yarygin, Lupatov *et al.*, 2016) .

In vitro, as CTMs podem suprimir a proliferação de linfócitos B mantendo os na fase G0 e G1 do ciclo celular. Apesar da indução da parada no ciclo celular dos linfócitos não foi observada indução de apoptose dos linfócitos pelas CTMs. Além disso, as CTMs podem suprimir a produção de IgA, IgG e IgM pelas células B *in vitro* (Yarygin, Lupatov *et al.*, 2016). *In vivo* foi observado que após o transplante de órgãos a injeção de CTMs causou a diminuição de anticorpos aloreativos. Assim também, CTMs derivadas da medula óssea apresentaram efeitos inibitórios sobre a proliferação e secreção da imunoglobulina IgG por linfócitos B em um modelo experimental murino de lúpus eritematoso sistêmico (Yarygin, Lupatov *et al.*, 2016). Ainda não se sabe quais os fatores solúveis produzidos pelas CTMs que são capazes de inibir a atividade dos linfócitos B, mas tem sido mostrado que a interação celular entre as CTMs e os linfócitos B através dos receptores PD-1 e PD-1L pode estar envolvido nesta inibição (Franquesa, Hoogduijn *et al.*, 2012).

Os linfócitos T também podem ter a proliferação reduzida pelas CTMs. Foi observado que a indução da expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO,

catalisa a conversão de triptofano em quinurenina) em CTMs estimuladas com IFN- γ , promove a depleção de triptofano, resultando assim, na inibição da proliferação linfocitária das populações Th1 e Th17 (Meisel, Zibert *et al.*, 2004). Em outro estudo, foi mostrado que a capacidade supressora das CTMs está relacionada à produção da citocina IL-10. As CTMs também afetam a funções dos linfócitos TC4+, inibindo a secreção de IFN- γ e estimulando a produção de IL-4. Em co-cultura, as CTMs suprimem a atividade de linfócitos T citotóxico através da secreção do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e de TGF- β e prostaglandina E2 (PGE2) (Glenn e Whartenby, 2014). A figura 4 apresenta os principais mecanismos de regulação das células do sistema imune adaptativo pelas CTMs.

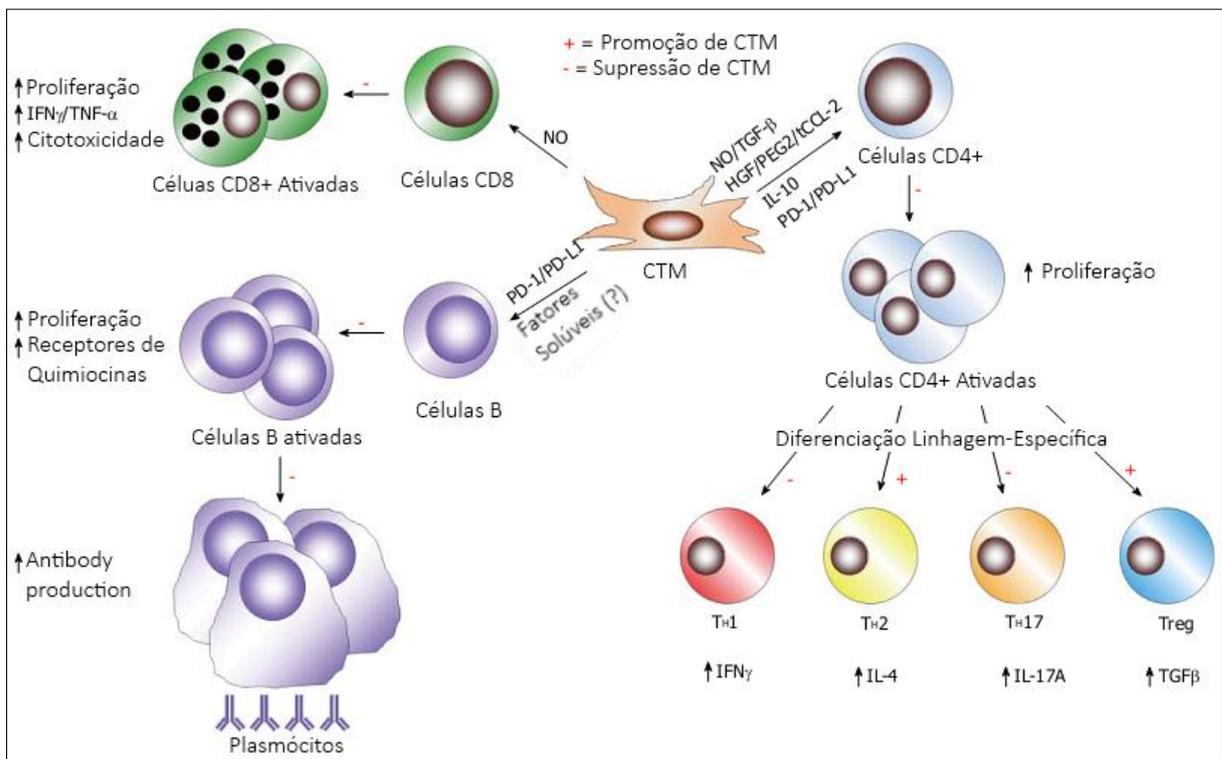


Figura 4. **Supressão das células do sistema imune adaptativo pelas CTMS.** Modificado de Glenn e Whartenby, 2014. (Glenn e Whartenby, 2014)

Existem outros mecanismos que poderiam contribuir para este efeito imunossupressor principalmente sobre linfócitos T CD4+, entre eles a carência de moléculas de classe II do MHC e de moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD86 e CD40 nas CTMs, levando a anergia de linfócitos T. No entanto, a transfecção de

CTMs com as moléculas CD80 e CD86 não reverteu esta capacidade de inibir a resposta imune, sugerindo que este não seja o principal fator envolvido na imunossupressão promovida por essas células

As CTM afetam também a atividade das células do sistema imune inato. As CTMs podem exercer efeito modulatório direto sobre macrófagos, monócitos e células dendríticas (Gao, Chiu *et al.*, 2016).

No foco inflamatório monócitos respondem às citocinas e outros estímulos no local diferenciando-se em macrófagos de perfil M1 (pró-inflamatórios) ou em macrófagos de perfil M2 (anti-inflamatórios). Macrófagos M1 promovem a inflamação através da secreção de IFN- γ e TNF- α , enquanto que as células M2 promovem a recuperação tecidual através da produção de IL-10 e TGF- β 1 (Francois, Romieu-Mourez *et al.*, 2012; Cho, Kim *et al.*, 2014). As CTMs induzem a diferenciação de monócitos em macrófagos de perfil M2 através da interação celular e através da secreção de PGE₂, IL-6 e IDO. *In vitro*, também foi demonstrado a inibição de diferenciação de monócitos em células dendríticas pelas CTMs (Francois, Romieu-Mourez *et al.*, 2012). Além disso, CTMs podem afetar diretamente as células dendríticas maduras através do bloqueio da secreção de IL-12, e, como resultado, que suprime sua capacidade de estimular a proliferação de células T (Franquesa, Hoogduijn *et al.*, 2012).

As CTMs tem efeito regulador negativo na apoptose dos neutrófilos e na atividade de secreção de moléculas oxidativos por estas células. A inibição da degranulação de mastócitos e da atividade citotóxica e produção de citocinas pelas NKs está relacionada com a secreção de PGE₂ e TGF- β pelas CTMs. As CTMs podem suprimir a atividade fagocítica das células dendríticas, bem com inibir a diferenciação de monócitos para células dendríticas, diminuída desta forma a apresentação de antígeno. Esta inibição sobre as células dendríticas é atribuída a IL-6 e a PGE₂ (Glenn e Whartenby, 2014). A figura 5 apresenta os principais mecanismos de regulação das células do sistema imune inato pelas CTMs.

(fenótipo característico de Tregs humanas) foi observado após o co-cultivo de linfócitos CD3⁺ com CTMs humanas. Quando populações purificadas de células Tregs CD4⁺CD25⁺ foram utilizadas no co-cultivo com CTMs, observou-se uma manutenção tanto da expressão de Foxp3, assim como na capacidade supressora dessas células por um período de até 2 semanas (Shi, Liu *et al.*, 2011).

Embora o mecanismo envolvido no processo de indução/expansão de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3 *in vitro* ainda não tenha sido completamente elucidado, foi mostrado que o contato celular CTM/linfócito T CD4⁺ e fatores solúveis como PGE2 e TGF- β pode estar envolvido na expansão das células T regulatórias. Além disso, em outro estudo, foi verificado que a molécula de HLA-G5 (antígeno leucocitário humano de classe I não-clássico) secretada por CTMs, na presença de IL-10, pode contribuir para a expansão de células Tregs (Luz-Crawford, Kurte *et al.*, 2012).

1.6. Tuberculose e Células-tronco mesenquimais

Vários trabalhos demonstram a eficácia da administração sistêmica das CTMs em modelos murinos de lesão pulmonar: lesão pulmonar aguda e fibrose (Ortiz, Gambelli *et al.*, 2003; Xu, Woods *et al.*, 2007), sepse (Mei, Haitzma *et al.*, 2010), displasia broncopulmonar (Chang, Oh *et al.*, 2009) e pneumonia provocada por *E.coli* (Gupta, Krasnodembskaya *et al.*, 2012). Foi demonstrado que, após a administração sistêmica, a maioria das CTMs injetadas se alojam nos capilares teciduais, principalmente os dos pulmões. Os primeiros testes utilizando as CTMs estão em andamento em pacientes com doença pulmonar de obstrução crônica, com objetivo de avaliar a eficácia dessas células na redução da inflamação crônica associada à doença.

A tuberculose experimental induzida em camundongos através da infecção pelas vias aéreas inclui três fases principais, as quais representam a patogênese da doença em humanos até certo nível. A primeira fase é a fase aguda da infecção (primeiras quatro semanas após a infecção), caracterizada pela multiplicação da bactéria no pulmão. A fase aguda corresponde à resposta imune inata do organismo contra a micobactéria e à indução da resposta imune adquirida. O desenvolvimento da resposta imune protetora, do tipo Th1, culmina na formação de granulomas nos locais da infecção e leva ao controle da multiplicação da micobactéria (O'garra, Redford *et al.*, 2013). Entretanto, nem todas as micobactérias são eliminadas. A segunda fase de infecção é a fase de infecção crônica, caracterizada por um

equilíbrio entre a resposta imune e a bactéria que persiste nos granulomas, induzindo uma progressão lenta da patologia. A fase crônica, que pode durar nos camundongos da linhagem C57BL/6 cerca de 1 ano ou mais, termina após a reativação da infecção (terceira fase), fase onde a bactéria volta a multiplicar aumentando a lesão pulmonar e levando o animal à morte (Sakamoto, 2012).

Recentemente, foi relatado um novo fenômeno na patogenia da TB relacionado às CTMs. Foi observada a presença das CTMs intrínsecas no local da infecção durante a formação dos granulomas nos pulmões e no baço de camundongos C57Bl/6 (Raghuvanshi, Sharma *et al.*, 2010), sugerindo a possibilidade do recrutamento destas células para o foco de infecção. Estas células acumulam-se em torno dos granulomas após 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 imunes *ex vivo*, sugerindo que o efeito imunossupressor observado corresponde à supressão da resposta imune *in vivo*, favorecendo a sobrevivência das micobactérias (Raghuvanshi, Sharma *et al.*, 2010). Entretanto, apesar da 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.

Foi demonstrado também a capacidade das micobactérias de infectar e sobreviver em CTMs de medula óssea, que apresentam o marcador CD271, sendo estas um nicho protegido para as micobactérias durante o tratamento com as drogas antituberculosas (Das, Kashino *et al.*, 2013). Apesar do pouco conhecimento sobre o papel das CTMs na patogenia da tuberculose há relatos sobre início de testes clínicos (fase I e II) de tratamento de pacientes com tuberculose resistentes às drogas por CTMs autólogas de medula óssea (Skrahin, Ahmed *et al.*, 2014).

A resposta imune ao *M. tuberculosis* é complexa e multifatorial. Desvendar os vários componentes e as funções de cada fator é uma área permanente de estudo. A detecção de mais um tipo celular (as CTMs) no local da infecção granulomatosa no pulmão foi de grande importância e exige uma investigação detalhada das interações e funções destas células, uma vez que o granuloma é responsável pelo controle da infecção micobacteriana. Esse fatos indicam a necessidade de estudos do papel da CTMs na patogenia da tuberculose em modelos animais, ainda mais, devido ao início dos testes clínicos sem se conhecer bem o papel desta célula na patologia da tuberculose.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar a interação das células-tronco mesenquimais intrínsecas e extrínsecas com o nicho celular pulmonar modificado por *M. tuberculosis*, sua atividade imunomodulatória e as perspectivas de intervenção terapêutica na tuberculose, utilizando as células-tronco isoladas de polpa de dente humano.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a cinética de acúmulo das CTMs intrínsecas nos focos de infecção nos pulmões de camundongos infectados;

2. Avaliar o grau de enxertia das CTMs extrínsecas nos pulmões de camundongos após a administração intraperitoneal, bem como sua permanência no organismo receptor;

3. Avaliar a eficácia terapêutica do transplante celular na patogenia da tuberculose nas formas severa e amena, causada pelas cepas de alta e baixa virulência, respectivamente, nas fases aguda e crônica da infecção;

4. Investigar os efeitos do transplante celular na resposta imune e na inflamação, induzidas pelas micobactérias nos pulmões (fase aguda da infecção) e nos processos de reparação e fibrose tecidual (fase crônica de infecção).

3. Metodologia

3.1. Cultura de célula-tronco mesenquimal.

As células-tronco mesenquimais utilizadas nos experimentos foram as células-tronco imaturas de polpa dentária humana (CTIPDh), isoladas, de polpa de dente de leite, e cedidas pela Dr^a. Irina Kerkis do Instituto Butantan (Kerkis, Kerkis *et al.*, 2006). As CTIPDh foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm² com Dulbecco's-Modified Eagle's Medium (DMEM) / Ham's F12 (1:1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA), 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). A cultura foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Para uso nos experimentos foi usadas às células das 4^a e 5^a passagens. As passagens das CTIPDh foram feita quando a cultura atingia 80% de confluência celular, com auxílio de solução de 0,25% tripsina e 0,02% EDTA. A taxa de ampliação da cultura foi de 1:8.

Em alguns experimentos foram usadas CTIPDh que expressam GFP (linhagem DL4), também cedidas pela Dr^a. Irina Kerkis do Instituto Butantan. O cultivo desta linhagem foi feito igual a CTIPDh que não expressam GFP.

3.2. Cultivo de Micobactérias

Para os experimentos foram utilizadas as seguintes cepas de micobactérias: cepa de virulência intermediária – *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC25618); cepa de alta virulência - *M. tuberculosis* M299 (isolada em Moçambique e cedida pelo Dr. Philip N. Suffys – FIOCRUZ/RJ); isolado bovino de *M. bovis* - cepa MP287/03 (cedida pelo Dr. José Soares Ferreira Neto – FMVZ - USP/SP).

As micobactérias foram cultivadas até atingir fase *log* de crescimento em meio de cultura Middlebrook 7H9 (DIFCO) suplementado com 10% de meio de enriquecimento ADC (DIFCO) e 0,05% de Tween 80% (ou 0,4% piruvato de sódio para a cepa de *M. bovis*) 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 600 nm, 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), após foram incubadas por 21 dias em estufa à 37° C com 5% de CO₂.

3.3. Camundongos e infecção

Os camundongos utilizados nos experimentos foram da linhagem C57Bl/6 com idade entre 6 e 8 semanas, preferencialmente machos, fornecidos pelo biotério central da UENF. Os experimentos foram aprovados e realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Uso e Experimentação Animal da UENF (protocolo 198), desmonstrado no anexo I.

No procedimento de infecção os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (15mg/kg) e cetamina (110mg/kg) de acordo com doses preconizadas pelo grupo de trabalho (Amaral, Ribeiro *et al.*, 2014), via intraperitoneal, antes do procedimento experimental. O teste da anestesia foi feito avaliando o reflexo dos animais a pressão feita com dedo nas suas patas dianteira e traseira. A infecção foi feita via intratraqueal, por incisão cirúrgica, com carga de infecção de 100 bacilos, de cada cepa de micobactéria usada, em 60 µL de PBS 1x estéril por animal. O inóculo foi injetado com agulha e seringa para injeção de insulina. Após, a incisão foi suturada com linha número 10 esterilizada e os animais e foram envoltos em manta de gaze e acondicionado nos microisoladores. Foram usados 6 animais para cada grupo experimental.

Durante o período de experimentação os animais infectados foram mantidos em microisoladores em estantes ventiladas com filtros HEPA (Alesco), com no máximo 6 animais por microisolador em sala de pressão negativa, no biotério de experimentação do LBR/UENF.

3.4. Tratamento dos camundongos infectados com as CTIPDh e/ou com Rifampicina

Grupos experimentais contendo 6 camundongos infectados com as diferentes cepas de micobactérias, como descrito no item anterior, foram usados para receber a injeção de CTIDPh via intraperitoneal.

Para a injeção as CTIPDh foram cultivadas até a 4^a ou 5^a passagem, como descrito no item 3.1. A coletas 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 liberação das CTIPDh do frasco de cultura. Após as CTIPDh liberadas coletadas colocadas em um tubo cônico de 50 mL contendo 20 mL de meio Dulbecco's-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 tripsina. E centrifugadas a 300g por 5 minutos.

Após as células foram lavadas 3 vezes com PBS1X estéril através de centrifugações a 300g por 5 minutos para a retirada do soro fetal bovino. Em seguida as células foram ressuspendidas em 5 mL de PBS1x estéril e uma alíquota de 50 µL, foi retirada para contagem das células em câmara de Neubauer. Após a contagem foi calculado o volume de PBS 1X que contém 2×10^5 CTIPDh. Este volume de 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 e um grupo de animais recebeu as células 106 e 113 dias após a infecção.

Um grupo de 6 camundongos infectados com a cepa de *M. tuberculosis* M299, e outro grupo de 6 camundongos infectados com a cepa M299 e tratado com CTIPDh nos dias 14 e 21 após a infecção receberam do dia 14 ao 27 de infecção doses diárias de 0,2 mg de Rifampicina, diluída em DMSO, via intraperitoneal.

3.5. Obtenção e cultura das células pulmonares dos camundongos

Para a obtenção das células do pulmão dos camundongos infectados e tratados, 3 animais de cada grupo experimental foram eutanasiados em câmara de CO₂ 28 e 120 dias pós-infecção (fases aguda e crônica da infecção respectivamente), os pulmões foram coletados e acondicionados de forma asséptica em placa de Petri contendo 2mL de meio RPMI (GIBCO), após os órgãos foram pesados.

Após a pesagem os pulmões foram cortado em pedaços de tamanho de 2 mm, com auxílio de pinça e tesoura e coletados para tubos de 50mL. Em seguida os fragmentos de pulmão foram digeridos em solução contendo colagenase XI (0.7 mg/mL; Sigma-Aldrich) e DNase de pâncreas bovino tipo IV (30 ug/mL, Sigma), diluídas em meio RPMI, 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

incubação à 37°C por 50 minutos sob agitação. As suspensões obtidas foram submetidas a passagens por seringas de 10 mL, para maior dissociação do tecido e dispersão das células.

As suspensões de meio contendo as celulares foram filtradas em *cell strainer* de malha 100µm (BD Biosciences, Lincoln Park, NJ), para separação das células dos pedaços de tecidos. Após as hemácias presentes nas suspensões de 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 PBS 1X estéril com 10% soro fetal bovino, através de centrifugação de 400g por 5 minutos e após ressuspendidas em meio RPMI (Gibco) com 10% soro fetal bovino e 0,05 mg/mL de gentamicina (Gibco). As células foram mantidas em gelo, e uma alíquota de 100 µL foi tratada com 0,1% de azida sódica por 20 minutos para a contagem do número de células em câmara de Neubauer.

Para os experimentos *ex vivo*, especificamente a avaliação da produção espontânea de citocinas. As células dos pulmões dos animais foram cultivadas na concentração de 5x10⁵ células/mL, em placa de cultura de 24 poços, em meio RPMI (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) em estufa com 5% de CO₂ à 37°C, por 48 horas (Amaral, Ribeiro *et al.*, 2014; Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014).

3.6. Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais intrínsecas no foco infeccioso

Para avaliar o acúmulo de células com marcas mesenquimais nos pulmões e fígados dos animais infectados como descrito no item 3.3, com as cepas de *M. tuberculosis* H37Rv ou M299, utilizamos a técnica de imunohistoquímica. Foram usados dois animais em 28 e 90 dias após a infecção.

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

Seções em parafina de 4µm contendo os tecidos foram cortados em micrótomo e colhidas em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA) submetidas à desparafinização em 5 banhos em xilol (10 minutos) e reidratação em 3 banhos em 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) a 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 de diferentes anticorpos (anti-CD29, anti- Sca-1/ly-6A/E, anti- CD90/Thy-1, anti-vimentina e anti-CD271) para a identificação de células mesenquimais. As amostras foram incubadas *overnight* a 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 tratadas por 30 minutos com o *Kit* LSAB-HRP⁺ (Dako, CA, USA), após 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 após desidratadas em banhos de álcool e montadas as laminas com Permount® (Sigma-Aldrich, MO, USA) (Souza, Rodrigues *et al.*, 2011).

3.6. Avaliação do enxerto de CTIPDh nos pulmões dos camundongos infectados

Os animais infectados com as diferentes cepas de micobactérias, como descrito no item 3.3, receberam 2×10^5 CTIPDh – expressando ou não GFP - via intraperitoneal, nos dias 14 e 21 após a infecção. Três camundongos de cada grupo experimental foram eutanasiados em 28 e 120 dias após a infecção. Dois camundongos infectado com a cepa H37Rv e 2 dois infectado com a cepa M299 receberam CTIPDh após 106 e 113 dias da infecção.

Para avaliar a enxertia das CTIPDh no foco inflamatório pulmonar, o lóbulo superior direitos dos pulmões dos camundongos foram coletados e fixados em formol 10% tamponado e processados para imunohistoquímica, como descrito no item 3.4, utilizando anticorpos anti-GFP ou anti-núcleo humano. A leitura das lâminas foram feitas em microscópio confocal.

3.7. Avaliação do crescimento micobactérico no pulmão dos camundongos tratados com CTIPDh e/ou Rifampicina

Para avaliar os efeitos do transplante de CTIPDh e/ou tratamento com rifampicina no crescimento micobacteriano os animais foram infectados, como item 3.3, e transplantados com as CTIPDh e/ou tratados com rifampicina como descrito no item 3.4.

A carga bacteriana nos pulmões dos camundongos foi avaliada coletando uma alíquota de 100 µL da suspensão celular extraída dos pulmões dos camundongos após 28 e 120 dias de infecção. Esta alíquota foi retirada do processo de obtenção e cultura das células pulmonares, descrito no item 3.5, após a filtragem com *cell strainer*.

A alíquota da amostra foi diluída 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 em PBS 1X estéril, e amostras de 50 µL da 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 e calculadas o número de colônias por grama de pulmão.

3.8. Avaliação da patologia pulmonar dos camundongos infectados e tratados com CTIPDh e/ou Rifampicina

Para avaliar os efeitos do transplante de CTIPDh e/ou tratamento com Rifampicina na patologia pulmonar, os animais foram infectados, como item 3.3, e transplantados com as CTIPDh e/ou tratados com rifampicina como descrito no item 3.4.

As macro e micropatologias foram avaliadas no tecido pulmonar nos dias 28 e 120 após a infecção. A macropatologia foi analisada através da pesagem dos pulmões dos animais, comparando o peso dos animais tratados com CTIPDh e/ou com rifampicina com os que não foram tratados.

Os estudos histopatológicos para avaliar a micropatologia foram feitos em cortes de tecidos pulmonar com 4–5 µm de espessura, através do método de coloração com hematoxilina-eosina (H&E), visando analisar as alterações teciduais e a colação com Tricromo de Masson para elucidar a formação de tecido fibroso. As

amostras de tecido foram examinadas com o microscópio Axioplan 2 (Carl Zeiss, Inc.) e as imagens foram capturadas com a câmera acoplada AxioCam (Zeiss).

3.8.1. Método de coloração com hematoxilina-eosina (H&E)

O lóbulo superior direito dos pulmões dos camundongos infectados pelas diferentes cepas micobactérias e tratados ou não com CTIPDh foi retirado para análises histopatológicas 28 e 120 dias após a infecção. Os lóbulos foram fixados em formol 10% tamponado por no mínimo 96 horas. Após foi feito banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 hora em cada concentração e, então, submetidos a dois banhos contendo xilol por 1 hora cada, estando estes, preparados para a inclusão na parafina.

Os blocos de parafina contendo os lóbulos pulmonares foram cortados em micrótomo (Leica) com espessura de 4 – 5 µm. Os cortes foram embebidos em duas baterias de xilol por 3 minutos cada, logo após banhados em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 minuto em cada concentração, para então serem corados com hematoxilina por 3 minutos e eosina por 50 segundos, sendo estes banhados novamente em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 minuto em cada concentração e em xilol por 3 minutos. Os cortes então sofreram fixação permanente com Permount.

3.8.2. Método de coloração com tricromo de Masson

O lóbulo superior direito dos pulmões dos camundongos infectados pelas diferentes cepas micobactérias e tratados ou não com CTIPDh foi retirado para análises histopatológicas 28 e 120 dias após a infecção. Os lóbulos foram fixados em formol 10% tamponado por no mínimo 96 horas. Após foi feito banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 hora em cada concentração e, então, submetidos a dois banhos contendo xilol por 1 hora cada, estando estes, preparados para a inclusão na parafina. Os blocos de parafina contendo os lóbulos pulmonares foram cortados em micrótomo (Leica) com espessura de 4 – 5 µm.

Os cortes foram embebidos em duas baterias de xilol por 3 minutos cada, logo banhados em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 minuto em cada concentração, para então serem corados.

A coloração foi feita da seguinte forma: foi aplicada sobre os cortes a solução de Bourin e deixado *overnigth*. Após os cortes foram lavados em água corrente por 1 hora até retirar cor amarela deixa pela solução de Bourin na amostra. Em seguida foram corados com Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 minutos e lavados novamente em água corrente por 10 minutos e coloração com solução de Escarlate de Biebrich por 5 minutos. Foi feita mais uma lavagem com água destilada e uma nova coloração com solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico por 10 a 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma lavagem com água destilada e aplicada solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos. As amostras foram lavadas uma vez e colocadas em solução de 1% de ácido Acético Glacial por 3 a 5 minutos. As amostras sofreram mais uma lavagem com água destilada e foram banhadas em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 minuto em cada concentração e em xilol por 3 minutos. Os cortes então sofreram fixação permanente com Permunt. Finalizada tecnica as fibras de colágeno adquirem coloração azulada.

3.9. Avaliação da resposta imune nos camundongos infectados e tratados com as CTIPDh e/ou Rifampicina.

A avaliação da resposta inflamatória foi feita por análise das populações celulares no infiltrado pulmonar das células coletadas dos pulmões dos animais como descrito no item 3.3, através de citometria de fluxo. Foram usados os marcadores Ly6G-FITC, Ly6C-APC, CD11b-PERCp e CD11c-PE. Com estes marcadores foi possível avaliar: os leucócitos mielóites (CD11b⁺); Neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺); neutrófilos imaturos (CD11b⁺ Ly6G^{low} Ly6C^{dim}); monócitos e macrófagos inflamatórios (CD11b⁺ Ly6C^{hi} CD11b⁻); células dendríticas (CD11b⁺ Ly6C⁻ CD11c⁺) e células dendríticas derivadas de monócitos (CD11b⁺ Ly6C^{hi} CD11c⁺)

A análise da produção de mediadores inflamatórios foi feita usando o sobrenadante das células pulmonares cultivadas *ex vivo* (coletadas como descrito no item 3.3), utilizando ensaio Multiplex e teste de ELISA de competição. As após 48 de cultivo das células os sobrenadantes foram coletados e filtrados com filtro de poro de 0,22 µM e congelados a -80° C até o momento dos ensaios.

3.9.1. Citometria de Fluxo

Amostras de células, obtidas como descrita no item 3.3, contendo $2,5 \times 10^5$ 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) and CD11b-PerCP (todos obtidos da BD Pharmingen, San Diego, CA). 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 citometria de fluxo (FACSCallibur, BD Biosciences), usando o programa Cell Quest Pro.

3.9.2. Análise da produção de mediadores inflamatórios

Os sobrenadantes das culturas das células pulmonares, cultivadas como descrito no item 3.3, foram coletados após 48 horas de cultivo. Os sobrenadantes foram filtrados com filtro de 0,22 µm, garantindo a biossegurança nos ensaios de análise de citocinas, e congelados a -80°C até a análise. Os níveis de IL-1β, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-17, IL-10, KC, MIP-2, G-CSF e MCP-1 no sobrenadante das culturas foram analisados com *Fluorokine multiplex kit* (R&D Systems, Minneapolis, MN), seguindo o protocolo do *kit*. A análise da produção de PGE2 foi feita através do teste de ELISA de Competição usando o kit Prostaglandin E2 EIA – Monoclonal (Cayman Chemical Company – USA), seguindo o protocolo do *kit*.

3.10. A análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5 (GraphPad, EUA), baseando-se nos métodos de One-way ANOVA e Tukey como *post test*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

4. Delineamento experimental

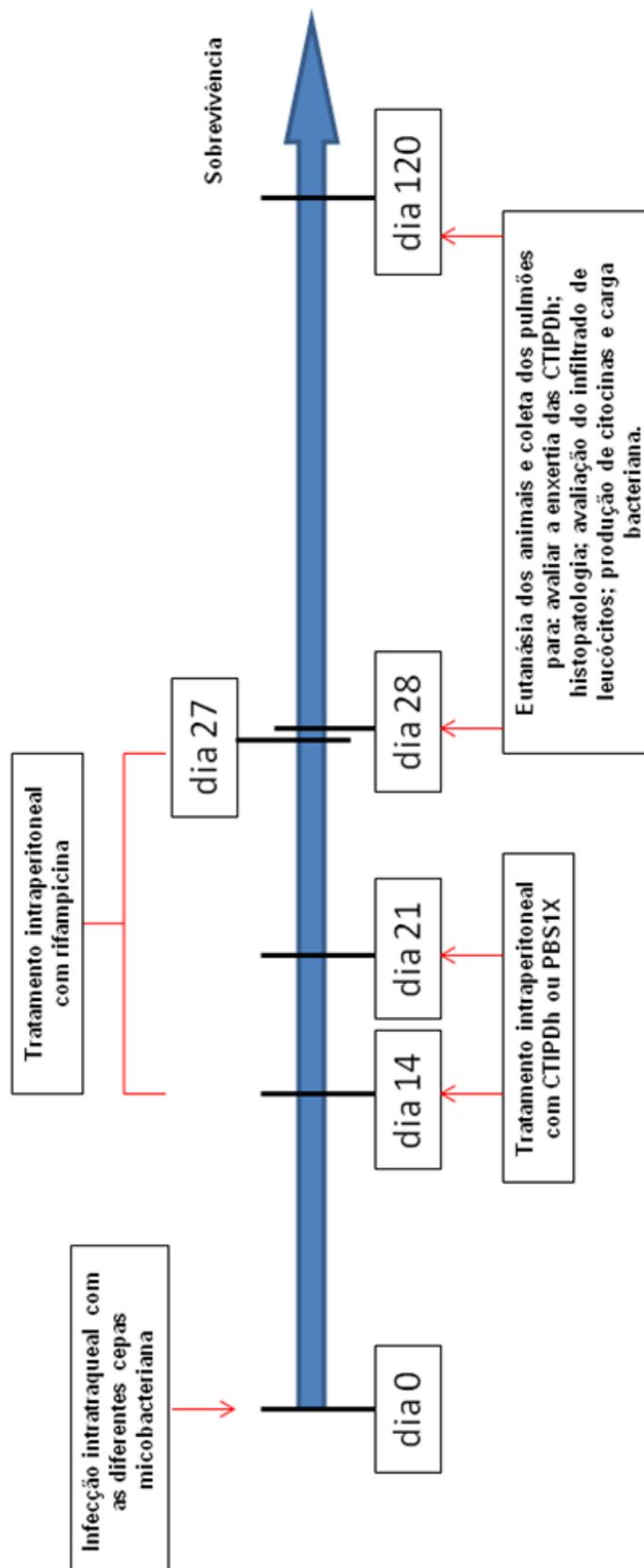


Figura 6- . Delineamento experimental do tratamento com CTIPDh dos camundongos C57BL/6 infectados .

5. Resultados

5.1. Estabelecimento do modelo de tuberculose severa em camundongos de linhagem C57BL/6.

Para avaliar os efeitos terapêuticos das CTMs na patologia severa da tuberculose, foi necessário estabelecer um modelo experimental de tuberculose associada a hiperinflamação e patologia necrótica no pulmão.

Nos nossos trabalhos anteriores, foi demonstrado que a infecção dos camundongos C57BL/6 por cepas hipervirulentas de *M. tuberculosis* da sub-linhagem genética Beijing induz uma doença que causa lesões necróticas no pulmão (pneumonia necrótica), o que não foi observado nos animais infectados por cepas convencionais, como a cepa *M. tuberculosis* H37Rv (Amaral, Ribeiro *et al.*, 2014; Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014).

Neste trabalho, nós caracterizamos a patogenia da doença neste modelo, utilizando uma cepa de *M. tuberculosis* Beijing de virulência elevada, cepa M299 (Ribeiro *et al.*, 2014) e uma cepa de *M. tuberculosis* de referência (cepa H37Rv, de virulência moderada). Foi demonstrado que a cepa hipervirulenta induz no pulmão uma patologia necrótica, que foi observada na forma da pneumonia tuberculosa, com áreas de necrose tecidual, associadas ao recrutamento de neutrófilos aos sítios da inflamação granulomatosa (trabalho em anexo II). Diferentemente, a cepa H37Rv causou formação de granulomas típicos, compostos por macrófagos e linfócitos, sem necrose (Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014). A inflamação pulmonar exacerbada provocada pela cepa 299 atinge seu pico 28 dias após infecção e pode provocar morte precoce de aproximadamente 10% dos animais infectados 30-40 dias após infecção. A maioria dos animais (90%) sobreviveu à infecção devido à resposta imune adquirida que se estabelece no período de 21-28 dias da infecção (dados no artigo em anexo II, que foi submetido a revista Plos One).

5.2. Avaliação da presença de células-tronco mesenquimais intrínsecas no foco infeccioso.

O modelo de tuberculose nos camundongos C57BL/6 (trabalho em anexo II) estabelecido pelo nosso grupo foi utilizado para avaliar o recrutamento de células-tronco mesenquimais (CTM) intrínsecas (do próprio animal infectado) para o foco infeccioso. Para detectar *in situ* as células que expressam os principais marcadores das CTM murinas, Sca-1 e CD90 (Baustian, Hanley *et al.*, 2015), marcadores das

CTMs humanas e murinas, CD271- *low-affinity nerve growth factor receptor* – LNGFR (Das, Kashino *et al.*, 2013; Mabuchi, Morikawa *et al.*, 2013) e um marcador comum das células mesenquimais- Vimentina (um filamento intermediário do tipo III que é expresso nas células mesenquimais), foi realizado em teste imunohistoquímico (IHC) com os tecidos obtidos dos pulmões e baços de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, utilizando anticorpos específicos contra os respectivos marcadores. Para a infecção foram utilizadas as cepas H37Rv e M299 e os testes foram realizados após 28 dias (fase aguda) e 90 dias (fase crônica) após infecção.

Em cortes dos pulmões (figura 7) e baços (figura 8) dos animais após 28 dias de infecção com a cepa M299 foram observadas células que apresentavam forte marcação para marcadores Sca-1 e CD90. No pulmão, as células Sca-1-positivas (figura 1A) e CD90-positivas (figura 1B) foram detectadas ao redor dos infiltrados granulomatosos compostos principalmente pelos macrófagos e linfócitos (lesões sólidas), mas não nas lesões necróticas, dominadas pelos neutrófilos (dados não mostrados). Em baço, as células marcadas para CD90 foram detectadas tanto na polpa vermelha, quanto nos folículos linfóides (figura 8A). Nos cortes sequenciais do baço, os anticorpos contra Sca-1 e CD90 marcaram as mesmas células, confirmando dupla-marcação para as CTMs (figura 8B e 8C). Nos animais não-infectados, a presença das células CTMs foi baixa (resultados não demonstrados). Os resultados demonstram que há recrutamento e acúmulo de células CTMs nas regiões de lesão no pulmão e no baço.

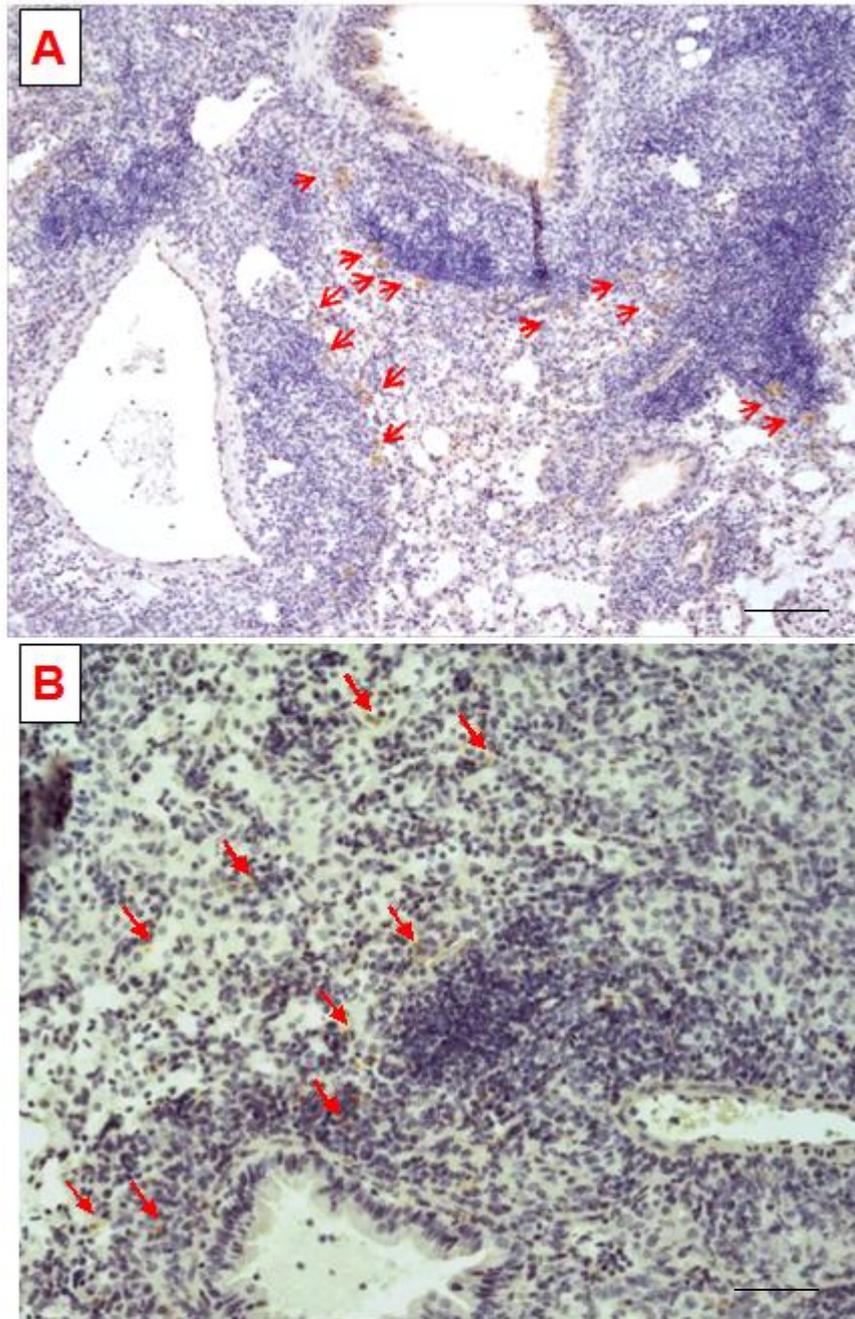


Figura 7. Imunolocalização de células com marcadores mesenquimais Sca-1 e CD90 - positivas no pulmão de camundongos infectados com a cepa de *M. tuberculosis* M299, 28 dias após infecção. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados via intratraqueal com 100 bacilos da cepa M299. Os cortes do tecido obtidos do pulmão foram tratados com anticorpos anti-Sca-1 (A) e anti-CD90 (B). Células positivas para estes marcadores estão sinalizadas com as setas em vermelho. Imagem com aumento de 200X com escala de 100 μ M.

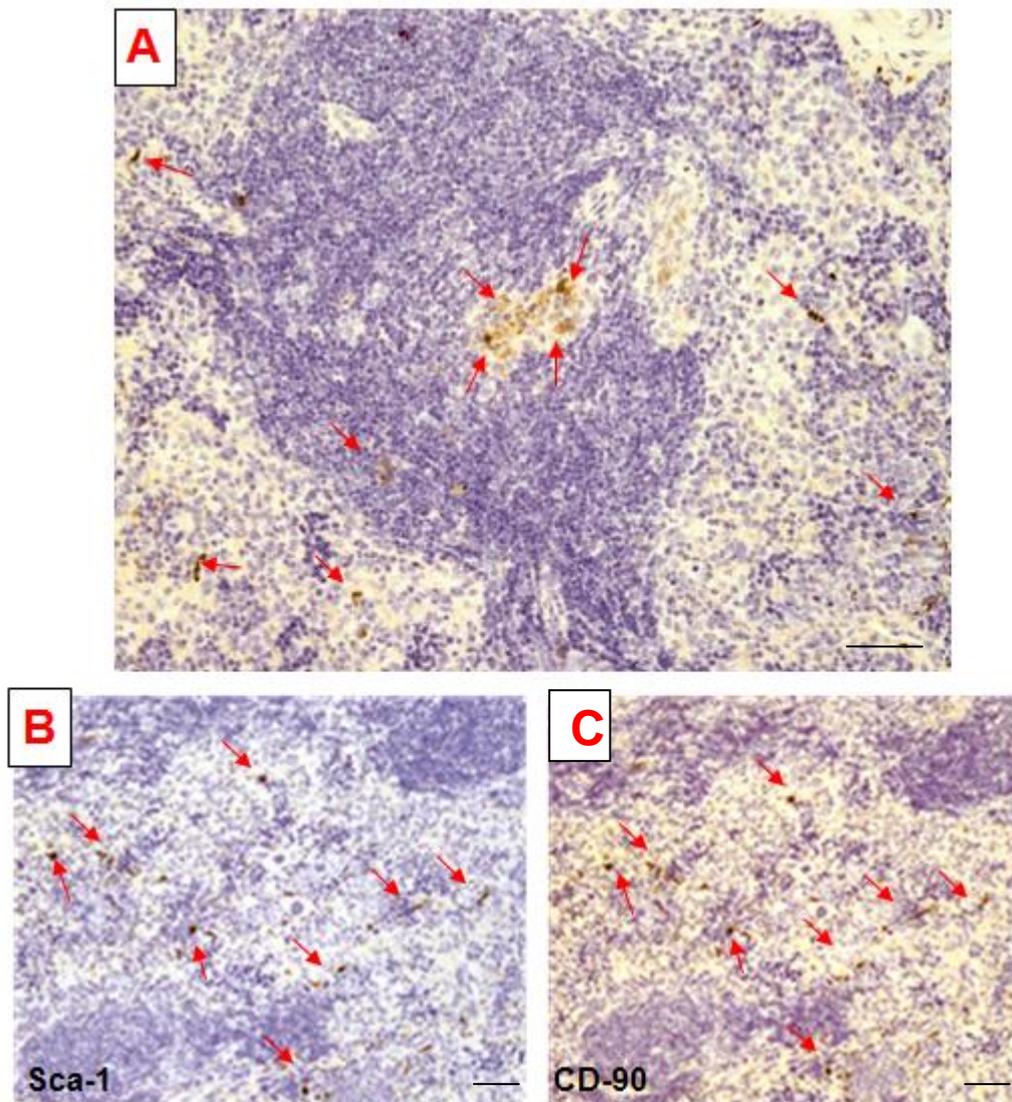


Figura 8. Imunolocalização de células-tronco mesenquimais Sca-1- e CD90-positivas no baço de camundongos infectados com a cepa de *M. tuberculosis* M299, 28 dias após infecção. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados via intratraqueal com 100 bacilos da cepa M299. **A.** Os cortes do tecido obtidos do baço foram tratados com anticorpos anti-CD90. **B e C.** Os cortes seriais do tecido obtido do baço foram tratados com anticorpos anti-Sca-1 e anti-CD90. As setas demonstram marcação das mesmas células na polpa vermelha. Imagem com aumento de 200X com escala de 100 μ M.

Para visualizar a presença das CTM no pulmão e baço na fase crônica da infecção, o teste de IHC foi realizado nos tecidos obtidos dos camundongos 90 dias após a infecção (figura 9). Nessa fase da infecção, a patologia pulmonar foi caracterizada pela redução das áreas de alveolite e necrose pulmonar, associada ao controle do crescimento bacteriano, e aumento das áreas dominadas pelos macrófagos espumosos, que se acumulam nos alvéolos. Os resultados do teste IHC demonstram que as células positivas para os marcadores de células-tronco

mesenquimais (vimentina, Sca-1 e CD271) permaneceram nas regiões de lesão no pulmão e baço, sendo que o número dessas células foi maior nos animais infectados com a cepa de maior virulência (figura 9).

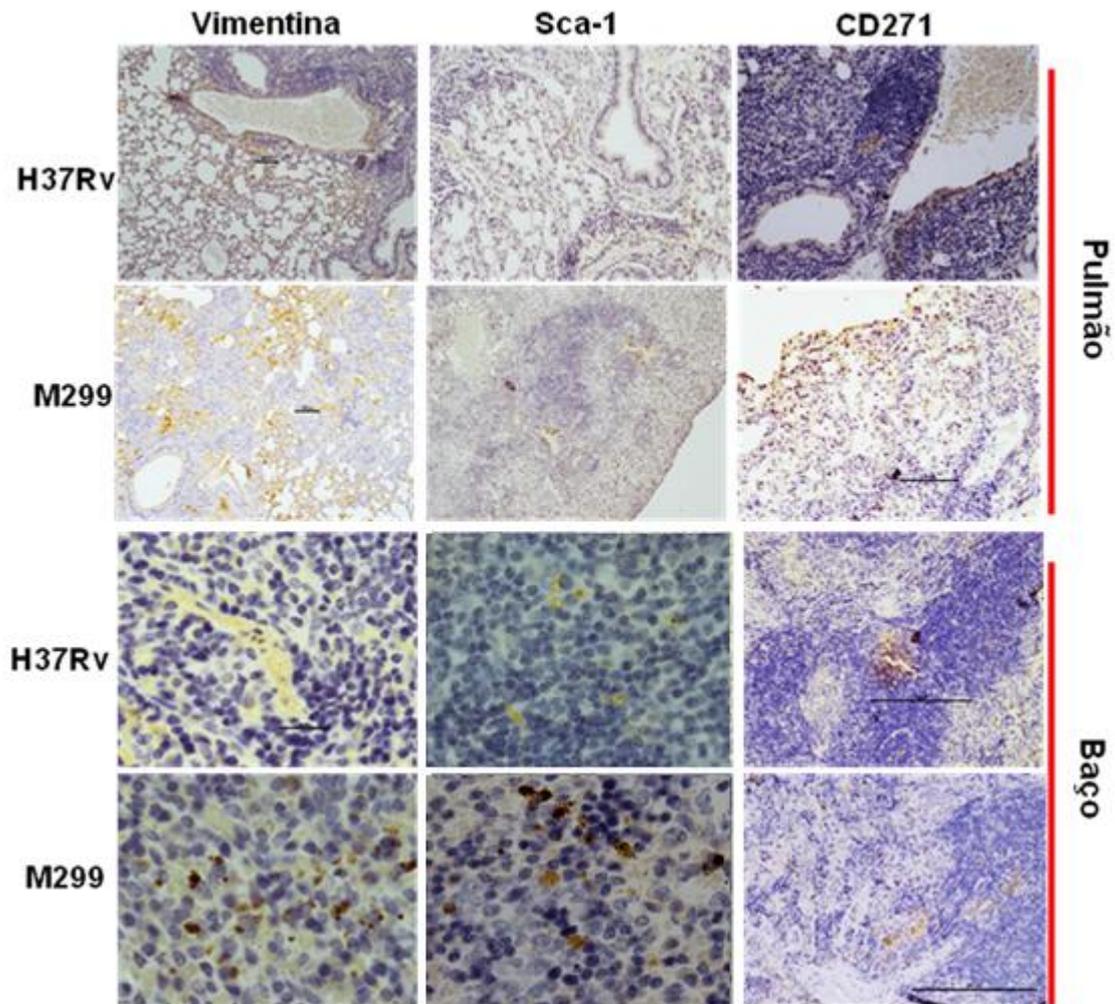


Figura 9. Imunolocalização de células-tronco mesenquimais Sca-1- e CD90-positivas no baço de camundongos infectados com a cepa de *M. tuberculosis* M299, 90 dias após infecção s. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com 100 bacilos das cepas de *Mtb* H37Rv e M299. Após 90 dias de infecção os animais foram eutanasiados, os pulmões e baço foram retirados e fixados em formol tamponado 10%. Os cortes do tecido foram marcados com marcadores mesenquimais (vimentina, Sca-1 e CD271) através do ensaio imunohistoquímico. As células marcadas estão em cor castanha.

5.3. Análise da enxertia das CTIPDh no foco infeccioso pulmonar dos camundongos

Os resultados demonstraram que as CTIPDh transplantadas foram capazes de migrar para os pulmões dos camundongos infectados e acumular-se nas regiões onde há lesões decorrente da infecção (28 dias após a infecção). Não se observou a presença de CTIPDh nas amostras de pulmões dos camundongos não infectados (figura 10). Houve maior enxertia das CTIPDh nos pulmões dos camundongos infectados com as cepas mais virulentas, que causam patologia mais severa, comparado com a patologia induzida pela cepa H37Rv de menor virulência.

Após 120 dias de experimento, as CTIPDh não foram detectadas nos pulmões dos camundongos (infectados ou não-infectados) tratados nos dias 14 e 21 (figura 11A). Para obter um controle positivo neste experimento, um grupo de animais já infectados e tratados com as CTIPDh foi tratado com células novamente, nos dias 106 e 113. No segundo tratamento foram utilizadas CTIPDh não modificadas, que não expressam GFP. Para visualizar essas células no pulmão, os cortes histológicos foram tratados com anticorpos contra núcleos humanos e a presença dessas células no local da infecção foi confirmada por microscopia confocal (figura 11B). Estes resultados demonstram que a permanência das CTIPDh no pulmão dos animais infectados é temporária, sendo que após 120 dias no pulmão foram encontrados somente as CTIPDh inoculadas recentemente, as CTIPDh-GFP injetadas nos dias 14 e 21 não foram detectadas.

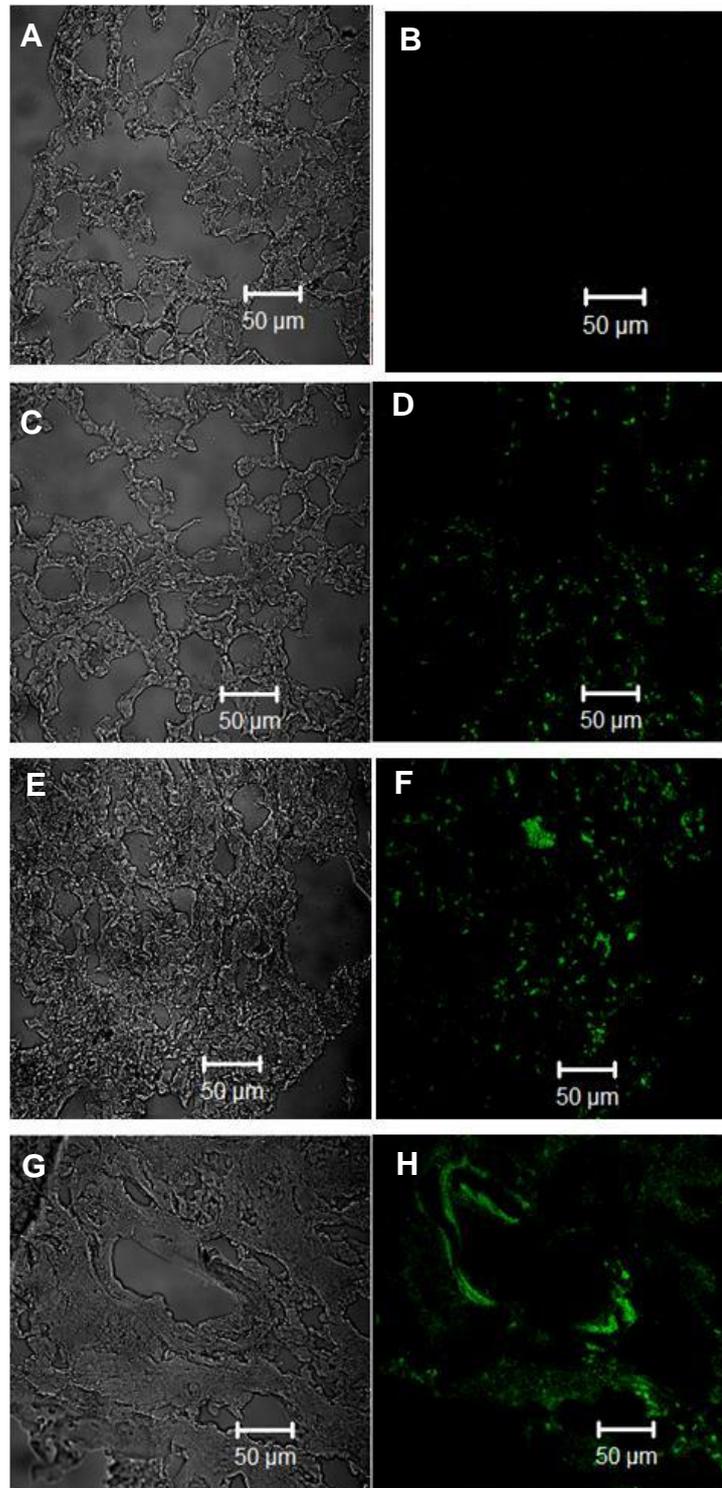


Figura 10: Avaliação de enxertia das CTIPDh nos pulmões dos camundongos infectados. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados via intratraqueal com 100 bacilos das cepas de *M.tuberculosis* H37Rv e M299 e a cepa de *M. bovis* MP287. Os animais receberam via intraperitoneal 2×10^5 CTIPDh, linhagem DL4, que expressa GFP nos dias 14 e 21 após a infecção, o mesmo foi feito em animais não infectados. Após 7 dias da última injeção de CTIPDh, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram coletados para avaliar a presença das CTIPDh. Os pontos verdes na imagem demonstram as células CTIPDh que expressam GFP. **A, C, E e G** microscopia de contraste de fase e **B, D, F e H** microscopia confocal com visualização do GFP em verde. **A e B** – não infectado; **C e D** – infectados com a cepa H37Rv; **E e F** – infectados com a cepa M299 e **G e H** – infectados com a cepa MP287. Todas as amostras são de camundongos que receberam as CTIPDh

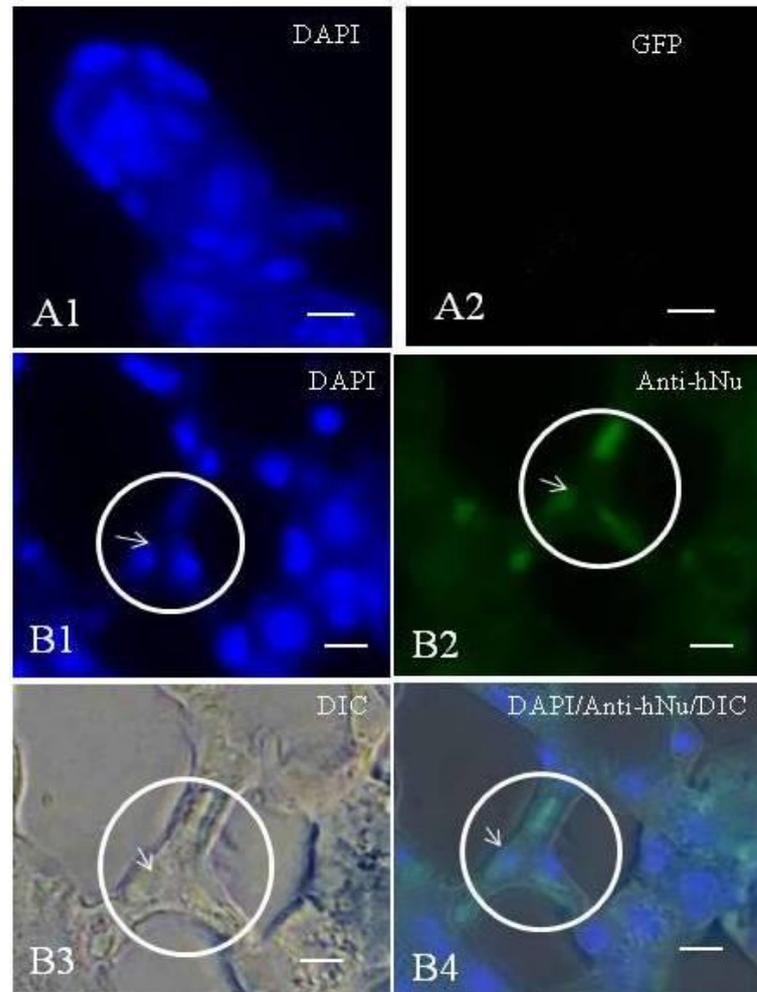


Figura 11. Avaliação de permanência do enxerto das CTIPDh nos pulmões dos camundongos infectados. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados via intratraqueal com 100 bacilos da cepa *Mtb* M299. Os animais receberam via intraperitoneal 2×10^5 células CTIPDh nos dias 14 e 21. Um grupo destes animais foi tratado repetidamente nos dias 106 e 113 após a infecção. No dia 120 após a infecção, a presença CTIPD foi avaliado através de análise de GFP ou marcação com anticopo anti-núcleo humano (anti-hNu) através de microscopia confocal. **A1** e **A2** animais que receberam as células em 14 e 21 dias após da infecção; **B1**, **B2**, **B3** e **B4** animais que receberam as células após 106 e 113 dias após a infecção.

5.4. Crescimento micobactérico nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com as CTIPDh

Para avaliar se a injeção de CTIPDh pode alterar o crescimento micobactérico, os pulmões dos camundongos infectados e tratados com CTIPDh foram retirados 28 e 120 dias após infecção e processados para análise da carga bacteriana.

Os resultados demonstram que a injeção das CTIPDh não foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana nos pulmões dos animais infectados com as três diferentes cepas, apesar da tendência de diminuição dos números de UFC nos animais infectados pela cepa M299 observada 28 dias após infecção (figura 12). Paralelamente, tratamos dois grupos de animais infectados com as cepas *M. tuberculosis* M299 ou *M. bovis* MP287 com o fármaco antimicobactérico rifampicina por 15 dias; alguns animais deste grupo receberam a injeção de CTIPDh. Os animais infectados com a cepa M299 e que receberam a Rifampicina apresentaram uma redução \log_{10} 1,3 em relação ao grupo de animais infectados que não receberam o fármaco. Resultados semelhantes foram obtidos no grupo de animais tratados com a rifampicina e que receberam as CTIPDh (figura 12). Os animais infectados com *M. bovis* (cepa MP287 com maior grau de virulência entre todas as cepas estudadas) e tratados com a rifampicina não tiveram redução da carga bacteriana nos pulmões; o mesmo pode ser observado no grupo de animais que receberam o tratamento com a rifampicina e a injeção CTIPDh (figura 12).

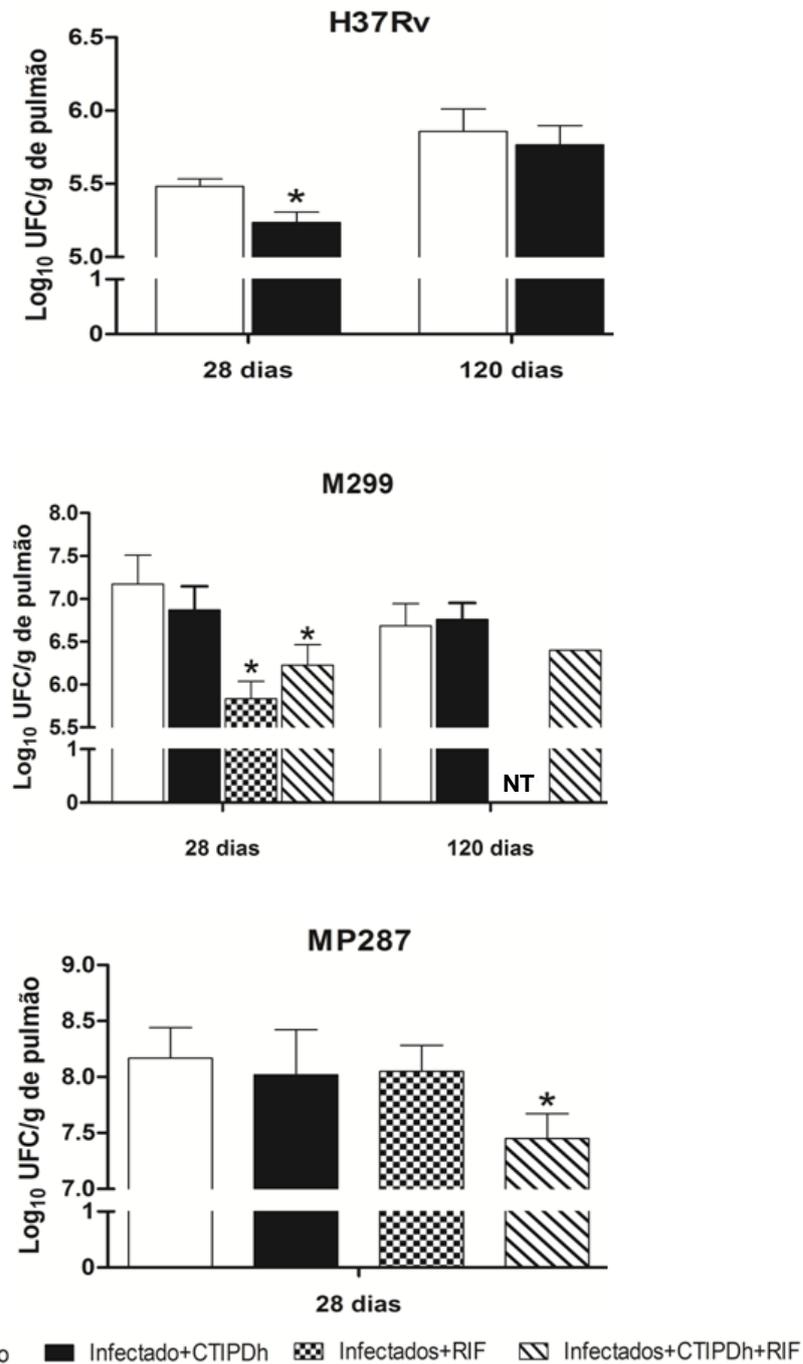


FIGURA 12: Avaliação do crescimento micobactérico no pulmão dos camundongos infectados e tratados durante a fase aguda da infecção com CTIPDh. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados via intratraqueal com 100 bacilos das cepas de *Mtb* H37Rv e M229 e a cepa de *M. bovis* MP287. Os animais receberam via intraperitoneal $2 \cdot 10^5$ células CTIPDh nos dias 14 e 21 após a infecção. Após 28 dias da infecção, os homogenados do pulmão foram submetidos ao teste de contagem de células bacterianas em meio sólido. As colônias de bactéria foram contadas após 21 dias de incubação a 37° C, e o número de colônias em Log10 por grama de pulmão foi calculado. As diferenças significativas entre grupos tratados em comparação ao grupo não tratado está indicado pelo asteriscos * (P < 0,05) . NT – não testado.

Um grupo de camundongos infectados, que não recebeu inoculação das CTIPDh na fase aguda, foi tratado durante a fase crônica da infecção. Os camundongos receberam via intraperitoneal 2×10^5 células nos dias 106 e 113 após a infecção. No dia 120, os animais foram eutanasiados e seus pulmões retirados para análise da carga bacteriana. Os resultados demonstram que não houve diferença na carga micobacteriana nos pulmões entre os animais infectados com a cepa H37Rv e que receberam as CTIPDh com os que não as receberam. Já os que foram infectados com a cepa M299 e receberam as CTIPDh na fase crônica da doença apresentaram uma queda de $\log_{10} 0,8$ em relação aos que não receberam as células (figura 13).

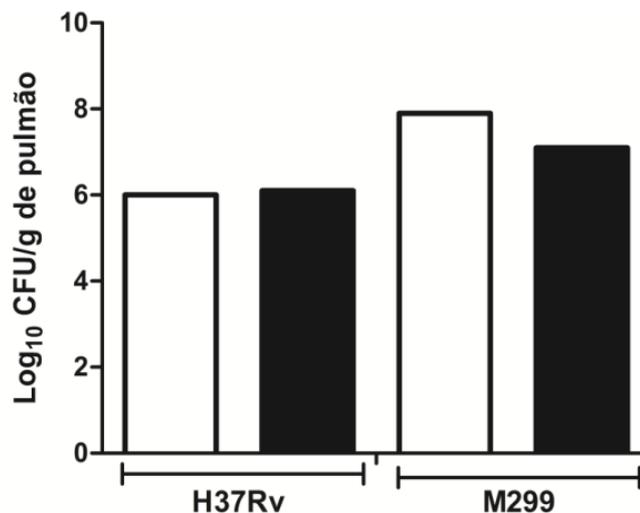


FIGURA 13: Avaliação do crescimento micobactérico no pulmão dos camundongos infectados que foram tratados durante a fase crônica da infecção com CTIPD. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram infectados com 100 bacilos das cepas de *Mtb* H37Rv e M229. Os animais receberam via intraperitoneal $2 \cdot 10^5$ CTIPD nos dias 106 e 113 após a infecção (barras pretas), os animais que não receberam as células foram injetados de PBS (barras brancas). Após 120 dias da infecção os pulmões foram coletados, e os homogenizados pulmonares foram submetidos ao teste de contagem de células bacterianas em meio sólido. As colônias de bactéria foram contadas após 21 dias de incubação a 37° C, e o número de colônias em Log10 por grama de pulmão foi calculado.

5.5. Avaliao da patologia nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com CTIPDh

A patologia pulmonar causada pela infeccao micobacteriana esta associada a infiltraao do pulmão pelos leucocitos, formao dos granulomas e diferentes sinais patol6gicos da inflamaao como acúmulo dos exsudados serosos e celulares nas vias respiratórias, morte celular e necrose tecidual, entre outros. Desta forma, pode-se fazer um paralelo entre o peso do pulmão e a extensao do infiltrado de células no pulmão e acúmulo dos exsudados. O aumento do peso do pulmão nos camundongos infectados como as cepas mais virulentas (M299 e MP287) foi maior em comparao com animais infectados com a cepa H37Rv (figura 14). O peso do pulmão dos camundongos infectados foi comparado com os dos animais que receberam tratamento com as CTIPDh, com a rifampicina ou combinaao dos dois. Os resultados do tratamento foram avaliados aos 28 e 120 dias após a infeccao.

Após 28 dias da infeccao, o tratamento com CTIPDh reduziu aumento do peso do pulmão na maioria dos animais infectados pelas cepas mais virulentas (cerca de 20% nos animais infectados pela cepa M299 e 28% - em animais infectados pela cepa MP287), sem efeito na infeccao com a cepa H37Rv. Entretanto, em alguns animais, o efeito não foi observado o que reduziu a significância estatística da média. A média da reducao no grupo M299 foi de cerca de 4% ($p > 0.05$) e no grupo MP287 – cerca de 25% ($p < 0.05$). O tratamento dos camundongos infectados com rifampicina promoveu a reducao do peso do pulmão em 15%. A combinaao da rifampicina com CTIPDh causou reducao mais acentuada – cerca de 30%, demonstrando o melhor resultado terapêutico.

Após 120 dias da infeccao, os pulmões dos camundongos infectados apresentam aumento do peso, o que esta associado a progressao lenta da patologia pulmonar que leva ao aumento da consolidao do pulmão. O tratamento dos animais pela as CTIPDh, ou pela combinaao de CTIPDh com a rifampicina, na fase aguda da infeccao (no dia 14 e dia 21) não alterou o aumento do peso pelos animais infectados na fase crônica da doenca. Entretanto, o peso médio do pulmão em grupo dos camundongos tratados pelas CTIPDh em combinaao com a rifampicina foi cerca de 7% menor em comparao com o grupo dos animais infectados e não tratados (figura 14).

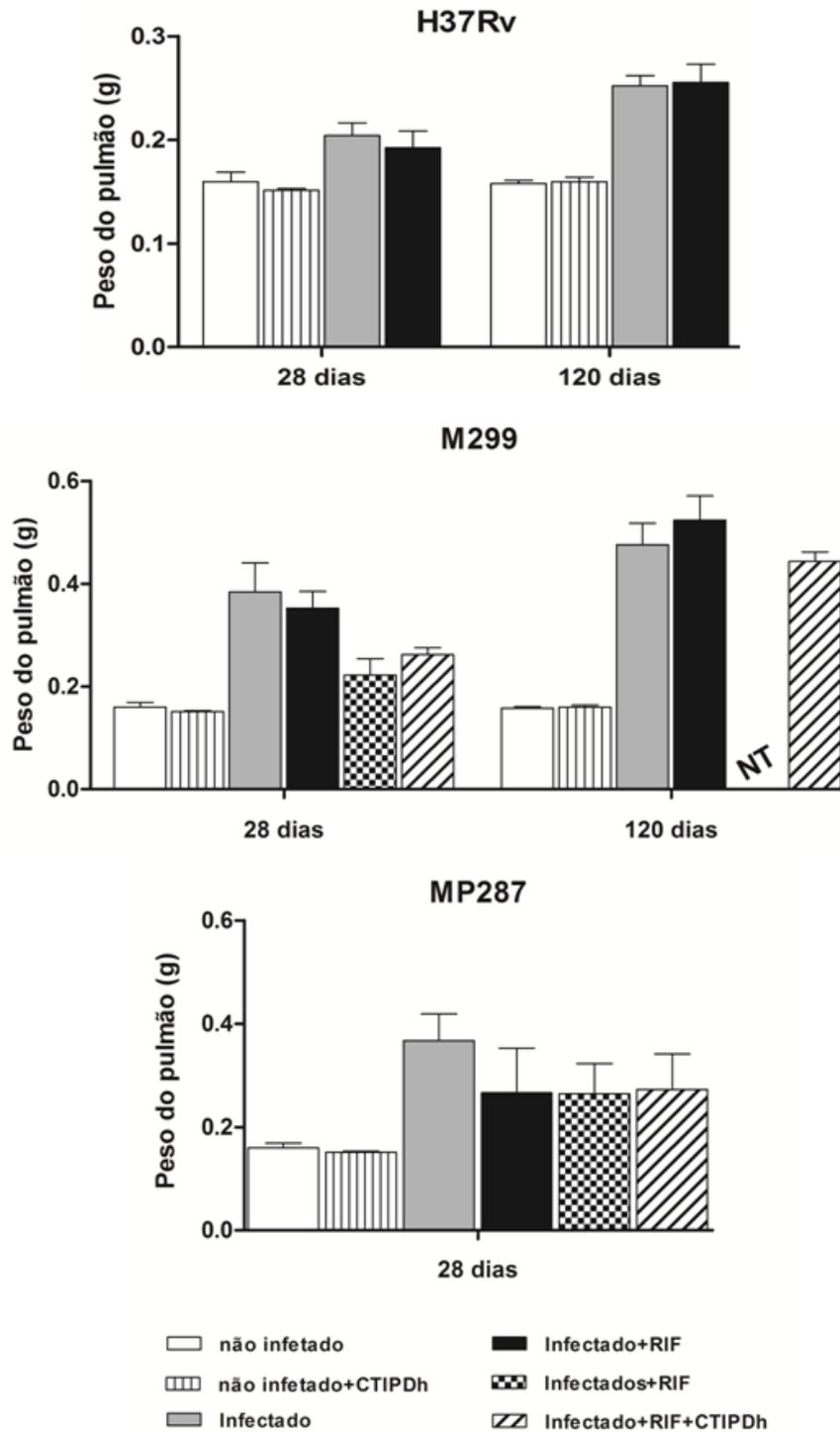


Figura 14: Análise de peso dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados e transplantados com CTIPDh. Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com as cepas H37Rv, M299 e MP287 e posteriormente tratados ou não com CTIPDh e/ou rifampicina. Um grupo de animais infectados recebeu intraperitonealmente 2×10^5 CTIPDh no dia 14 e dia 21 após a infecção. Outro grupo foi tratado com rifampicina 13 dias consecutivos a partir do dia 14. Mais um grupo recebeu tratamento duplo: CTIPDh nos dias 14 e 21 após a infecção em combinação com a rifampicina do dia 13 ao 27 de infecção. Os animais foram eutanasiados após 28 e 120 dias de infecção. Os animais infectados pela cepa MP287 foram analisados somente no dia 28 devido de alta mortalidade dos animais neste grupo. Os pulmões foram extraídos e pesados. Resultados estão apresentados em peso do pulmão em gramas. As diferenças significativas entre grupos tratados em comparação ao grupo não tratado está indicado pelo asteriscos * ($P < 0,05$). NT – não testado.

Para aprofundar a análise do efeito da terapia celular na patologia pulmonar da TB, foram realizados testes de histopatologia do pulmão. De acordo com as observações anteriores, a infecção dos camundongos com cepa M299 (Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014) e cepa MP287 (Amaral, Ribeiro *et al.*, 2014) induziu uma extensa pneumonia granulomatosa (figura 15) com áreas de alveolite (alvéolos preenchidos com macrófagos, linfócitos e neutrófilos, espessamento das paredes alveolares) e múltiplos focos de necrose (áreas acelulares). Os animais infectados com as mesmas cepas e que foram inoculados com as CTIPDh apresentaram redução de área de alveolite e ausência de necrose pulmonar. Diferentemente das cepas hipervirulentas, a cepa de *Mtb* H37Rv causou uma patologia menos severa com pequenos granulomas perivasculares compostos de macrófagos e linfócitos. A injeção das CTIPDh não alterou o padrão das lesões patológicas observadas neste grupo dos animais (figura 15).

As imagens de histopatologia na Figura 15 demonstram que os camundongos infectados com as cepas hipervirulentas, *Mtb* M299 e *Mbv* MP287, apresentaram uma extensa pneumonia granulomatosa com áreas de alveolite (alvéolos preenchidos com macrófagos, linfócitos e neutrófilos, espessamento das paredes alveolares) e múltiplos focos de necrose (áreas acelulares). Os animais infectados com as mesmas cepas e que foram transplantados com as CTIPDh apresentaram redução de área de alveolite e ausência de necrose pulmonar. Diferentemente das cepas hipervirulentas, a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv causou uma patologia menos severa com pequenos granulomas perivasculares compostos de macrófagos e linfócitos. A injeção das CTIPDh não alterou o padrão das lesões patológicas observadas neste grupo dos animais.

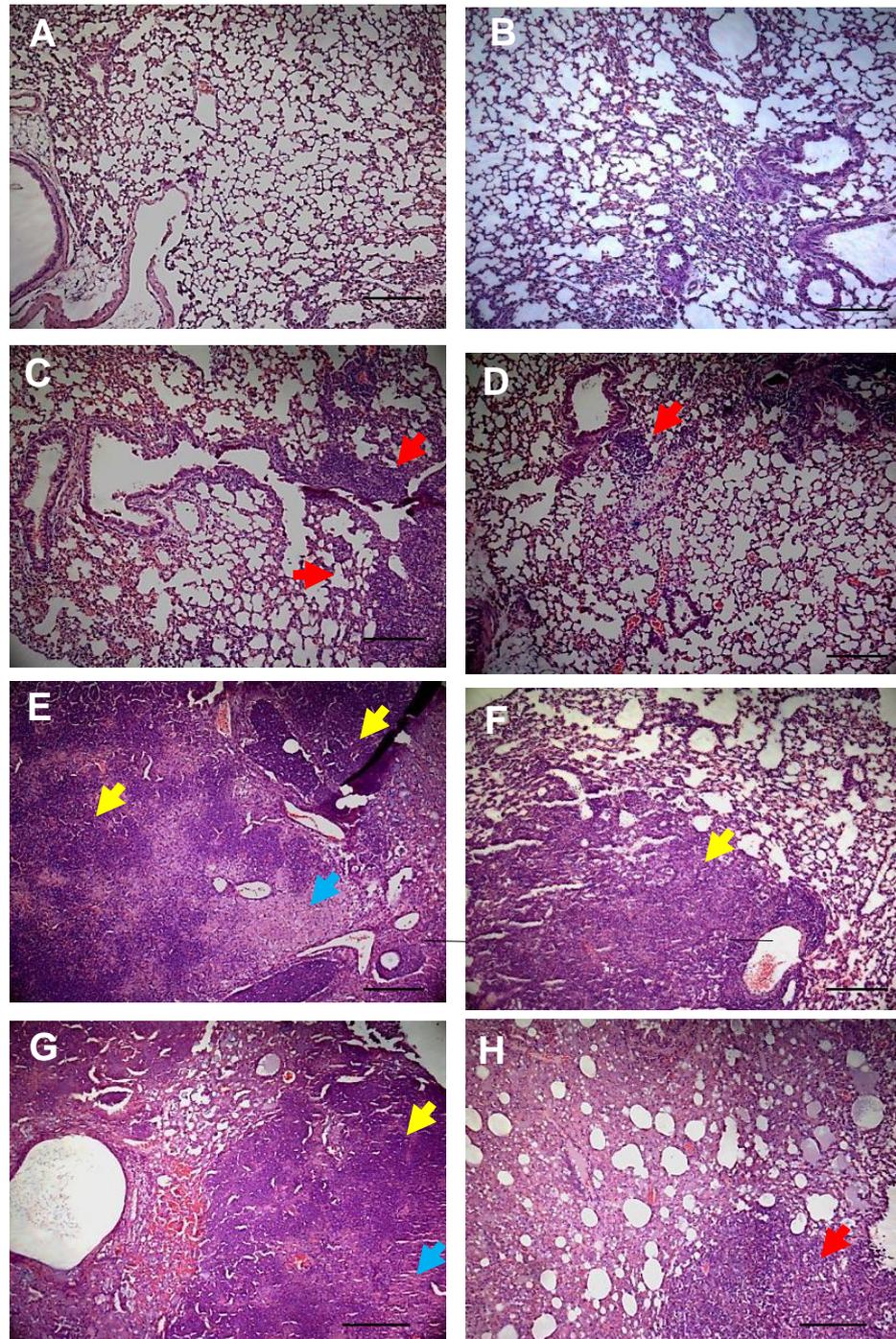


Figura 15: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 28 dias após a infecção e tratamento com CTIPDh. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 100 bacilos das diferentes cepas de micobactérias e tratados com CTIPDh após 14 e 21 dias de infecção, linhagem celular DL4. Após 28 dias da infecção 3 camundongos de cada grupo foram eutanasiados e os pulmões foram coletados, fixados em formol tamponado. Os órgãos foram emblocados em parafina e feitos cortes de 4-5 μ m. Os cortes histológicos foram corados com HE e analisados através de microscopia de campos claro. Em **A** – não infectado, **B** – não infectado e tratado com CTIPDh, **C** – infectado com H37Rv, **D** – infectado com H37Rv e tratados com CTIPDh, **E** – infectado com M299, **F** – infectado com M299 e tratados com CTIPDh, **G** – infectados com MP287 e, **H** – infectados com MP287 e tratados com CTIPDh. Formação de granulomas (seta em vermelho); regiões de necrose (setas em azul); regiões de alveolite (setas em amarelo). Aumento 200 X; as escalas correspondem à 100 μ m.

Para avaliar o efeito terapêutico das CTIPDh na fase crônica da infecção, a análise dos cortes histológicos dos pulmões dos camundongos infectados pelas cepas H37Rv e M299 foi realizada após 120 dias de infecção (figura 16). De acordo com os dados anteriores (Amaral, Ribeiro *et al.*, 2014), os camundongos infectados pela cepa *M. bovis* MP287 demonstraram a progressão rápida da doença com morte precoce dos animais após 28-32 dias da infecção e não poderia ser estudados nos prazos posteriores. Nos camundongos infectados pela cepa M299, a histopatologia foi apresentada por amplas áreas de macrófagos espumosos (setas amarelas, figura 11) e pequenas granulomas secundários compostos por linfócitos. As áreas da necrose, que foram associadas a pneumonia neutrofílica na fase aguda da infecção (figura 15), no dia 120 após infecção foram parcialmente substituídas pela fibrose (figura 16). O tratamento com CTIPDh preveniu o desenvolvimento da necrose, como foi demonstrado na figura 10, e sua progressão a fibrose na fase crônica. Nos animais tratados foi observada uma redução das áreas de macrófagos espumosos, sem alteração do número dos granulomas linfocitários (figura 16). O efeito do tratamento com CTIPDh foi menos evidente nos animais infectados pela cepa laboratorial H37Rv, sendo que ambos os grupos de animais, tratados e não-tratados pela CTIPDh, apresentaram patologia pulmonar similar, que foi caracterizada pelo lento aumento do tamanho dos granulomas e ampliação das áreas ocupadas pelos macrófagos espumosos (figura 16).

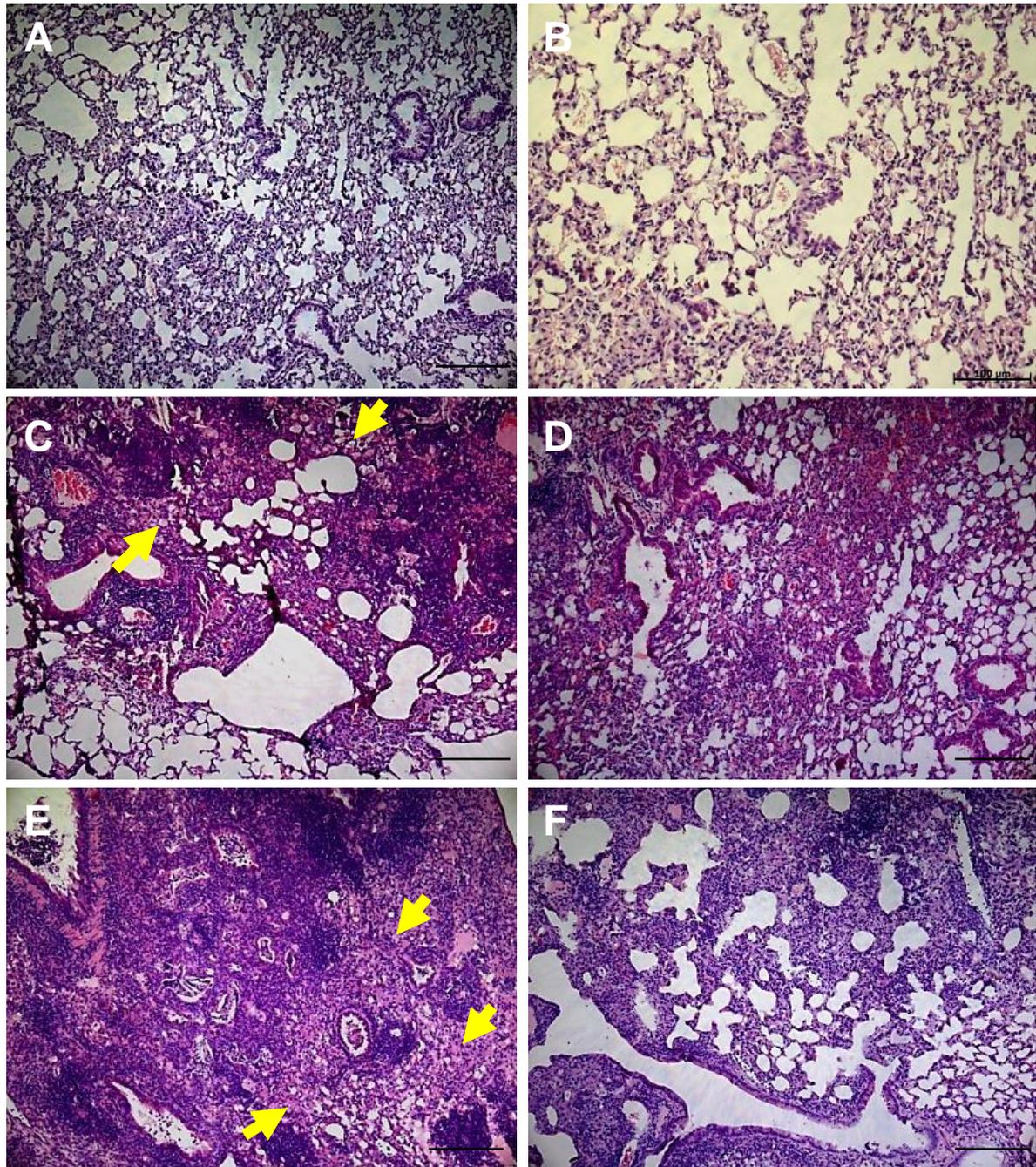


Figura 16: Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 120 dias após a infecção com *M. tuberculosis* e tratamento com CTIPDh. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 100 bacilos das diferentes cepas de micobactérias e tratados com CTIPDh após 14 e 21 dias de infecção, linhagem celular DL4. Após 120 dias de infecção, 3 camundongos de cada grupo foram eutanasiados e os pulmões foram coletados, fixados em formol tamponado. Os órgãos foram emblocados em parafina e feitos cortes de 4-5 μm . Os cortes histológicos foram corados com HE e analisados através de microscopia de campos claros. Os cortes histológicos foram corados com HE e analisados em microscópio de campos claros. histológicos foram corados com HE e analisados através de microscopia de campos claros. Em **A** – não infectado, **B** – não infectado e tratado com CTIPDh, **C** – infectado com H37Rv, **D** – infectado com H37Rv e tratado com CTIPDh, **E** – infectado com M299, **F** – infectado com M299 e tratado com CTIPDh. Regiões de macrófagos espumosos (setas em amarelo). Aumento 200 X; as escalas correspondem à 100 μm .

Para analisar melhor a formaçoão do tecido fibrótico, os cortes pulmonares foram submetidos a coloraçoão de Masson para marcaçoão de colágeno. No tecido do pulmão dos animais não infectados (animais do grupo controle) foi observada marcaçoão do colágeno (na cor azul) em volta dos brônquios, bronquíolos, vasos sanguíneos e nos septos alveolares, o que caracteriza a presença de tecido conjuntivo fibroso de sustentação. Após 28 dias da infecçoão dos animais pela cepa H37Rv, o padrão de localizaçoão do colágeno no pulmão foi similar, sem aparente fibrose nos granulomas primários (figura 17). A inoculaçoão das CTIPDh não alterou o quadro da distribuicao do tecido conjuntivo no pulmão destes animais.

Nos pulmões dos animais infectados com as cepas hipervirulentas M299 e MP287, a marcaçoão de colágeno foi mais acentuada. As áreas da alveolite com grande número das células inflamatórias intra-alveolares foram coradas em cor vermelho escuro devido a marcaçoão dos núcleos. As fibras do colágeno foram observadas nas paredes alveolares tanto nas áreas da pneumonia, quanto no tecido pulmonar adjacente (seta vermelha). As áreas da necrose apresentaram uma marcaçoão difusa na cor azul-claro (seta amarela) (figura 17). Nos animais tratados pelas CTIPDh foi observada diminuicao dos infiltrados celulares inflamatórios, ausência da necrose e reduçoão dos sinais da fibrose.

Após 120 dias de infecçoão (figura 18), foi observado aumento da fibrose nas áreas dominadas pelos macrófagos espumosos, tanto nos camundongos infectados pela cepa H37Rv (figura 18B) quanto nos infectados pela cepa M299 (figura 18D). As áreas da necrose nos animais infectados pela cepa M299 foram substituídas por tecido conjuntivo fibroso (estrela amarela, figura 18C). As vias aéreas, que na fase aguda foram obstruídas pelo infiltrado celular inflamatório, continuam sem regeneraçoão do epitélio respiratório (seta, figura 18C). Nos pulmões dos camundongos infectados que receberam as CTIPDh a patologia pulmonar foi menos severa: as cicatrizes fibrosas não foram observadas, as áreas de macrófagos espumosos foram menores, o epitélio nas pequenas vias aéreas foi recuperado (figura 18G); foi observado maior número de granulomas secundários compostos por linfócitos (figura 18H).

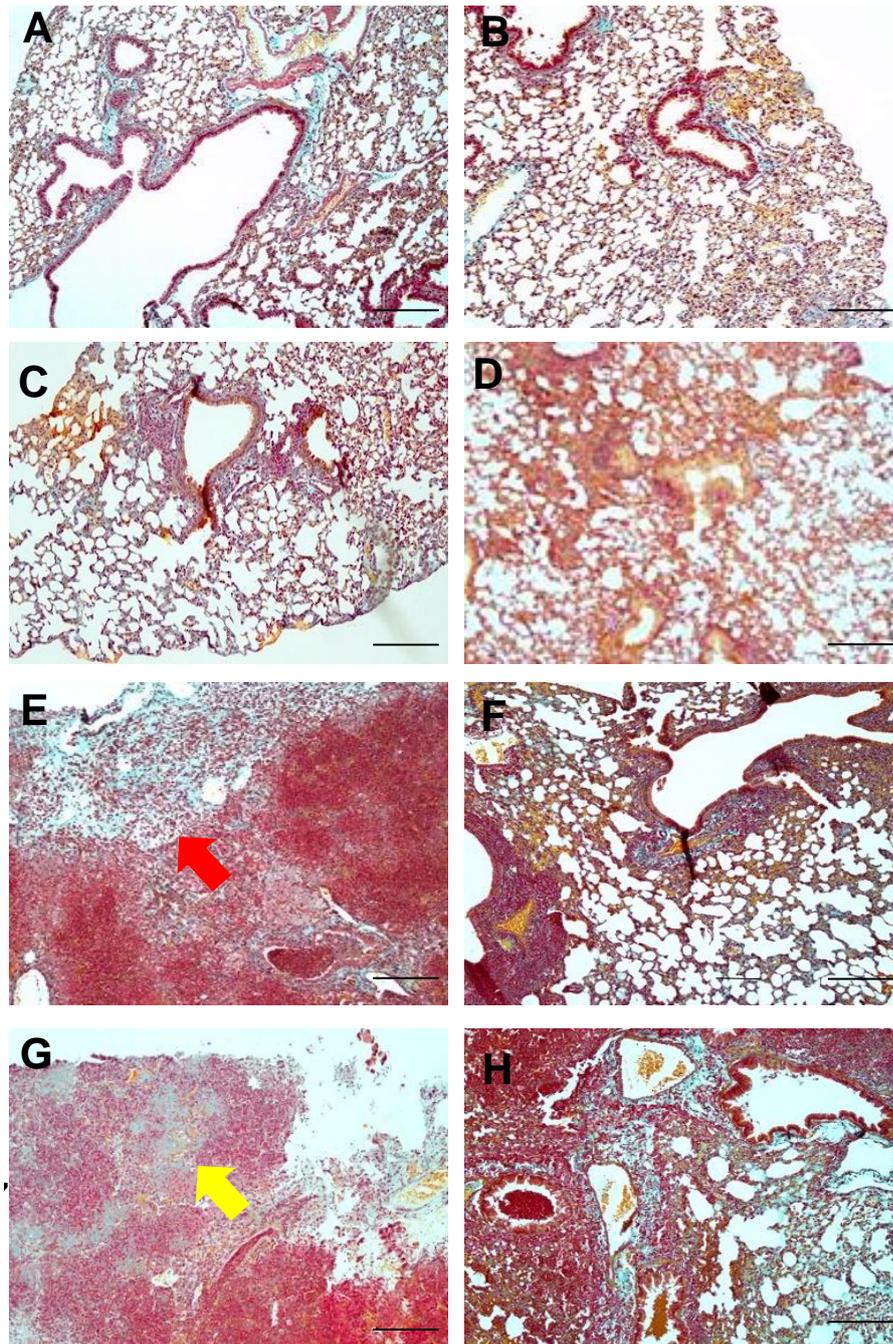


Figura 17: Análise do tecido fibroso nos pulmões dos camundongos C57BL/6 no dia 28 após a infecção e tratamento com CTIPDh. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 100 bacilos das diferentes cepas de micobacterias, e tratados com 2×10^5 CTIPDh nos dias 14 e 21 após a infecção. Após 28 dias da infecção 3 animais de cada grupo foi eutanasiado. Os pulmões foram coletados, fixados em formol tamponado e emblocados em parafina, foram feitos cortes de 4-5 μm de espessura. Os cortes histológicos do pulmão foram corados pela técnica de Masson para análise de tecido fibroso. O tecidos foram analisados em microscópio de campos claro. Em **A** – não infectado, **B** – não infectado e tratado com CTIPDh, **C** – infectado com H37Rv, **D** – infectado com H37Rv e tratados com CTIPDh, **E** – infectado com M299, **F** – infectado com M299 e tratados com CTIPDh, **G** – infectados com MP287 e, **H** – infectados com MP287 e tratados com CTIPDh. Fibras de colágeno (coloração em azul), aumento da fibrose (seta vermelha), região de necrose (seta em amarela). Aumento 200 X; as escalas correspondem à 100 μm .

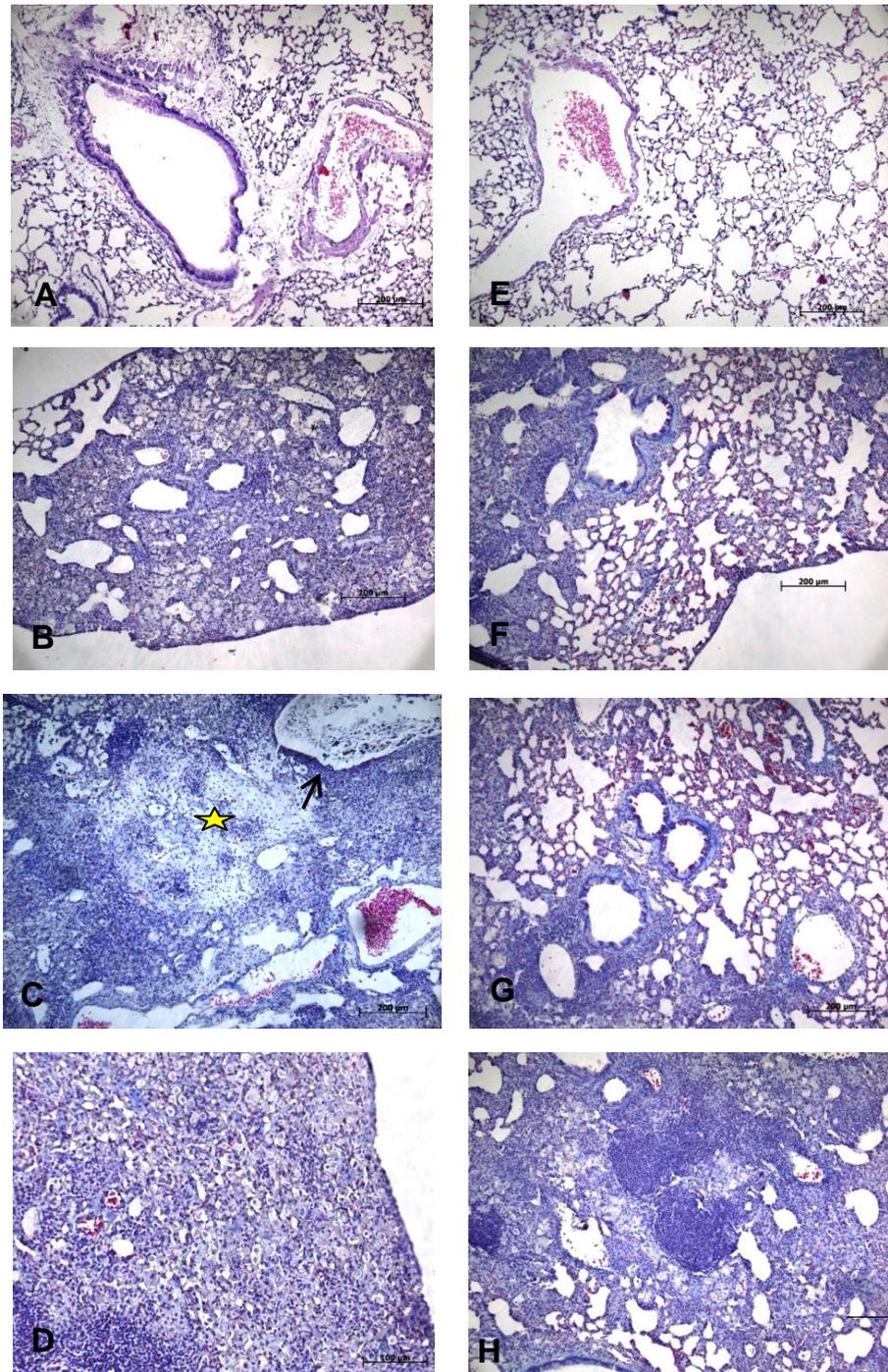


Figura 18: Análise do tecido fibroso nos pulmões dos camundongos C57BL/6 no dia 120 após a infecção com *Mtb* e tratamento com CTIPDh. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 100 bacilos das diferentes cepas de micobacterias, e tratados com 2×10^5 CTIPDh nos dias 14 e 21 após a infecção. Após 120 dias da infecção 3 animais de cada grupo foi eutanasiado. Os pulmões foram coletados, fixados em formol tamponado e emblocados em parafina, foram feitos cortes de 4-5 μm de espessura. Os cortes histológicos do pulmão foram corados pela técnica de Masson para análise de tecido fibroso. O tecidos foram analisados em microscópio de campos claro. Em **A** – não infectado, **E** – não infectado e tratado com CTIPDh, **B** – infectado com H37Rv, **F** – infectado com H37Rv e tratados com CTIPDh, **C e D** – infectado com M299, **G e H** – infectado com M299 e tratados com CTIPDh. Fibras de colágeno em azul, região de necrose (estrela), bronquíolo sem epitélio respiratório (seta). Aumento de 100x.

5.6. Análise da composição de células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados por micobactéria e tratados com CTIPDh

Como as CTMs possuem propriedades anti-inflamatórias (De Miguel, Fuentes-Julian *et al.*, 2012; Gao, Chiu *et al.*, 2016), avaliamos a capacidade das CTIPDh de diminuir o fluxo de células inflamatórias para os pulmões dos animais infectados na fase aguda da infecção, 28 dias após a infecção intratraqueal. Para avaliar a composição das células inflamatórias recrutadas para o pulmão dos camundongos, nos quantificamos diferentes populações de leucócitos mielóides através de citometria de fluxo. A estratégia de seleção das populações está apresentada na figura 19.

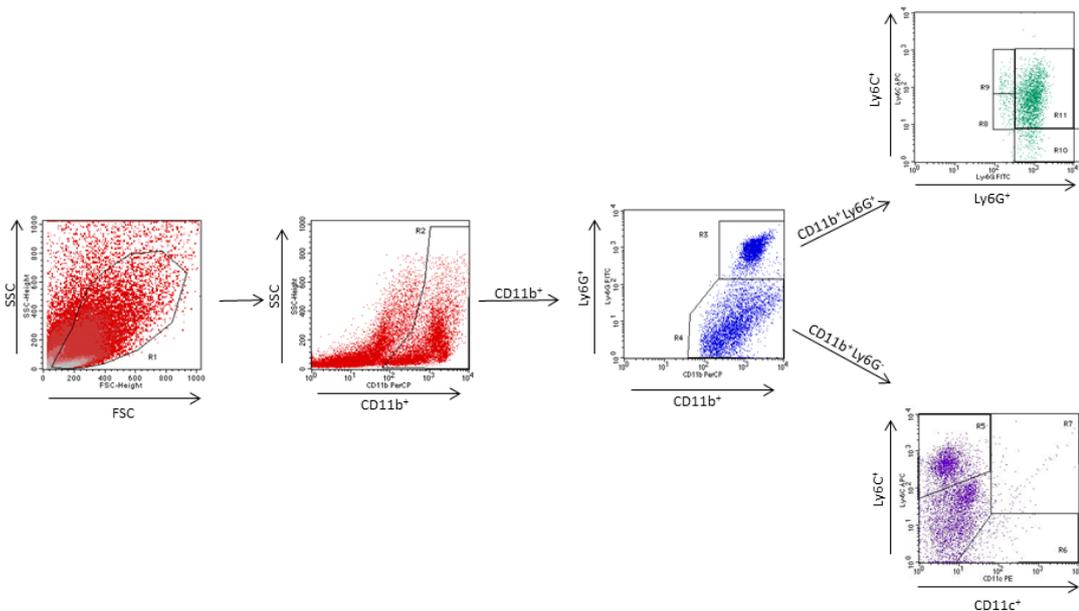


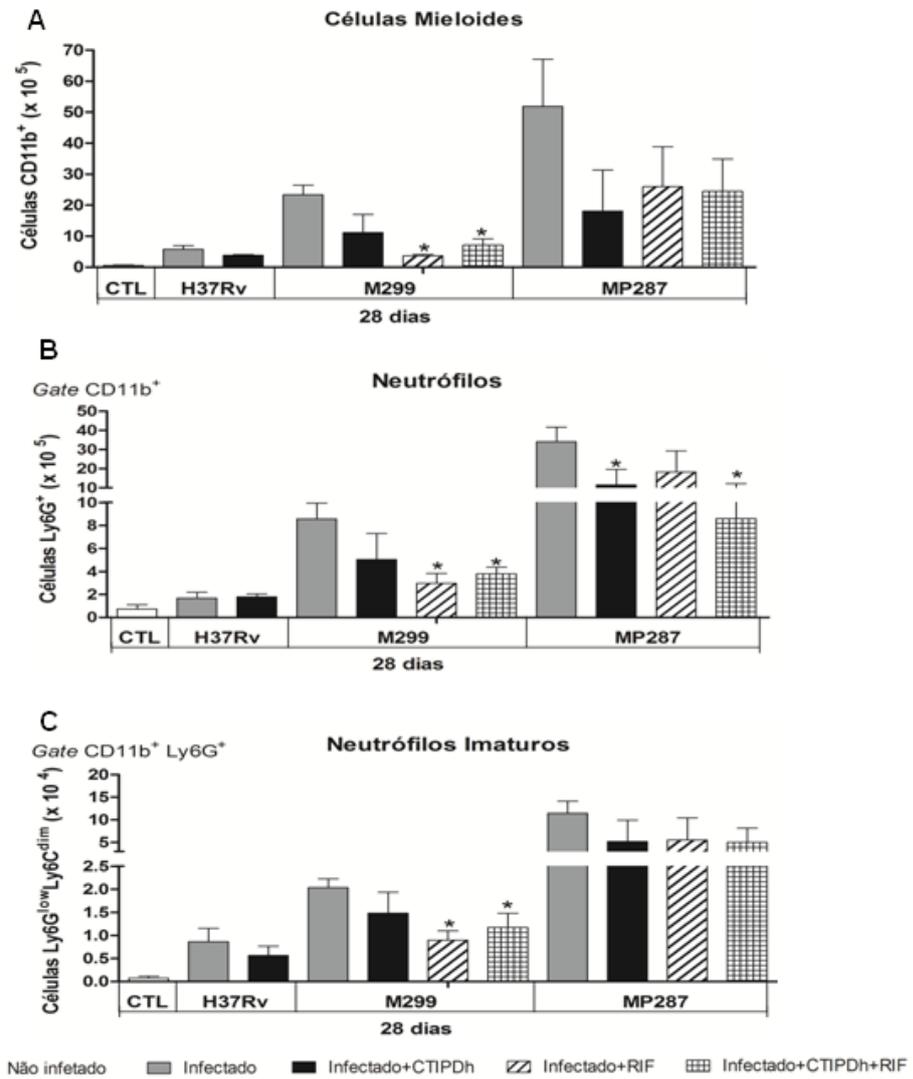
Figura 19: Estratégia de análise das subpopulações de leucócitos mielóides nos pulmões dos camundongos infectados por cepas de micobactéria e tratados com CTIPDh.

A população de leucócito mielóide foi identificada pela expressão do marcador CD11b (gate R2) e subdividida nas subpopulações de acordo com a expressão de outros marcadores, as células Ly6G⁺ (gate 3) e Ly6G⁻ (gate 4). As células Ly6G⁺ foram discriminadas adicionalmente pelo nível de expressão do marcador Ly6C, como as células Ly6G⁺Ly6C⁺ (neutrófilos, gate R11) e células Ly6G^{low}Ly6C^{dim} (neutrófilos imaturos, correspondente a G-MDSC, gates R8 e R9). As células Ly6G⁻ foram classificadas de acordo com a expressão dos marcadores Ly6C e CD11c, como células Ly6C^{hi} CD11c⁻ (monócitos e macrófagos inflamatórios, gate R5), células Ly6C⁻ CD11c⁺ (células dendríticas, gate R6) e células Ly6C^{hi} CD11c⁺ (células dendríticas derivadas de monócitos, gate R7).

Os resultados demonstram que nos camundongos infectados ocorreu um forte recrutamento dos leucócitos mielóides CD11b⁺ para os pulmões, que correlacionou com a virulência da cepa de micobactéria utilizada para a infecção (figura 20). O maior acúmulo dessas células foi observado nos animais infectados com as cepas

mais virulentas, as cepas M299 e MP287, sendo que foi 6 e 10 vezes maior, respectivamente, em relação ao infecção com a cepa H37Rv (figura 20A). As subpopulações dos neutrófilos (figura 20B) e dos monócitos\macrófagos inflamatórios (figura 20D) foram os principais grupos celulares recrutados aos pulmões 28 dias após infecção. Foi observado também um aumento nas subpopulações das células dendríticas (figura 20E) e células dendríticas derivadas dos monócitos (figura 20F). O tratamento dos camundongos infectados com as CTIPDh causou queda no número de células recrutadas ao pulmão. O número total de células CD11b⁺ nos animais infectados que receberam as CTIPDh foi de 1.5, 1.7 e 2.8 vezes menor em relação aos animais infectados com as cepas H37Rv, M299 e MP287, respectivamente, e que não foram tratados. Quando comparamos o efeito do tratamento com CTIPDh nas diferentes subpopulações das células inflamatórias no pulmão, foi observado maior queda no número dos neutrófilos; nos animais infectados com a cepa M299, a redução foi de 3 vezes e nos infectados com a cepa MP287 foi de 6 vezes em relação aos respectivos grupos de animais infectados e não tratados. Os resultados do tratamento dos animais infectados com as CTIPDh, a rifampicina e pela combinação da rifampicina e das CTIPDh foram bem similares; a diferença entre grupos que receberam diferentes tipos do tratamento não foi significativa.

A infecção por micobactérias causou também aumento no pulmão da subpopulação dos neutrófilos imaturos com fenótipo CD11b⁺ Ly6G^{low}Ly6C^{dim} (figura 15C), que foram demonstrados para expressar as propriedades de supressores mielóides, das células G-MDSC (Condamine e Gabilovich, 2011). Nível do recrutamento dessas células em diferentes grupos dos animais infectados correlacionou com a severidade da inflamação induzida pela micobactéria. Os números das G-MDSC nos animais infectados pela cepa MP287 foram 5 vezes maiores que nos animais infectados pela cepa M299, e 10 vezes maiores em comparação com a infecção pela cepa H37Rv. O tratamento dos animais com CTIPDh levou a uma leve diminuição do recrutamento dessas células ao pulmão, que foi significativa somente no grupo dos animais tratados com a rifampicina (figura 20C).



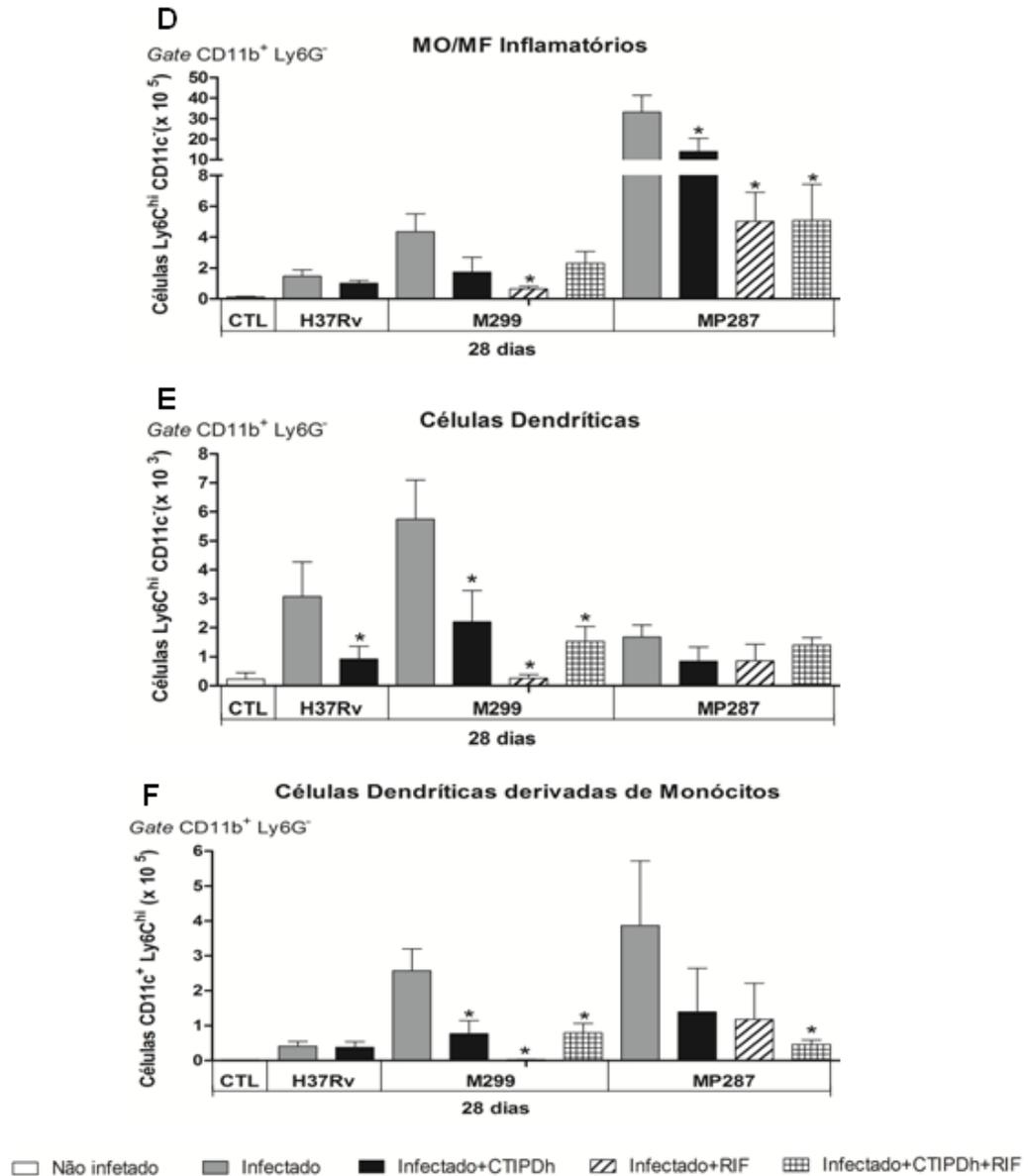


Figura 20: Recrutamento de células mielóides na fase aguda da infecção nos pulmões de camundongos infectados com micobactéria e tratados com CTIPDh. Os camundongos foram infectados com 100 bacilos via intraqueal, após 14 e 21 dias alguns animais receberam 2×10^5 CTIPDh via intraperitoneal e outros grupos foram tratados com rifampicina do dia 14 a dia 27 da infecção. Após 28 dias da infecção os animais foram eutanasiados. As células dos pulmões foram extraídas e marcadas com anticorpos contra os marcadores de leucócitos. As populações de células mielóides foram identificadas por citometria de fluxo. Os números totais de células CD11b⁺ e subpopulações, incluindo os neutrófilos (células CD11b+Ly6G+Ly6C⁺), de neutrófilos imaturos (CD11b+Ly6G^{low}Ly6C^{dim}), monócitos e macrófagos inflamatórios (células CD11b + Ly6C^{hi}CD11c-Ly6G⁻), células dendríticas derivadas de monócitos (CD11b+CD11c+Ly6C^{hi}Ly6G⁻) e células dendríticas (CD11b + CD11c + Ly6C-Ly6G⁻), foram quantificados. Os valores apresentados representam o número médio de células por pulmão de três experimentos independentes com 3 camundongos cada experimento. As diferenças significativas entre grupos tratados em comparação ao grupo não tratado está indicado pelo asteriscos * (P < 0,05).

Avaliamos também os números totais de células mielóides e de neutrófilos no pulmão do camundongo na fase crônica da doença, no dia 120 após a infecção. Os resultados demonstram que a redução dessas populações celulares, que foi observada no pulmão nos animais infectados e tratados com CTIPDh (tratamento realizado nos dias 14 e 21 após infecção) não foi mantida na fase crônica (figura 16). Após 120 dias da infecção, os números de células mielóides e de neutrófilos nos grupos dos animais tratados e não-tratados com as CTIPDh foram similares, demonstrando que o efeito terapêutico do tratamento com CTIPDh foi temporário. Posteriormente, os números das células mielóides nos pulmões dos animais tratados aumentaram. Entretanto, a proporção dos neutrófilos em relação dos fagócitos mononucleares no pulmão, que foi maior que 50% na fase aguda da infecção (figura 20), na fase crônica foi menor (cerca de 30% na população das células mielóides) (figura 21), sugerindo maior contribuição dos macrófagos (macrófagos espumosos) no aumento observado.

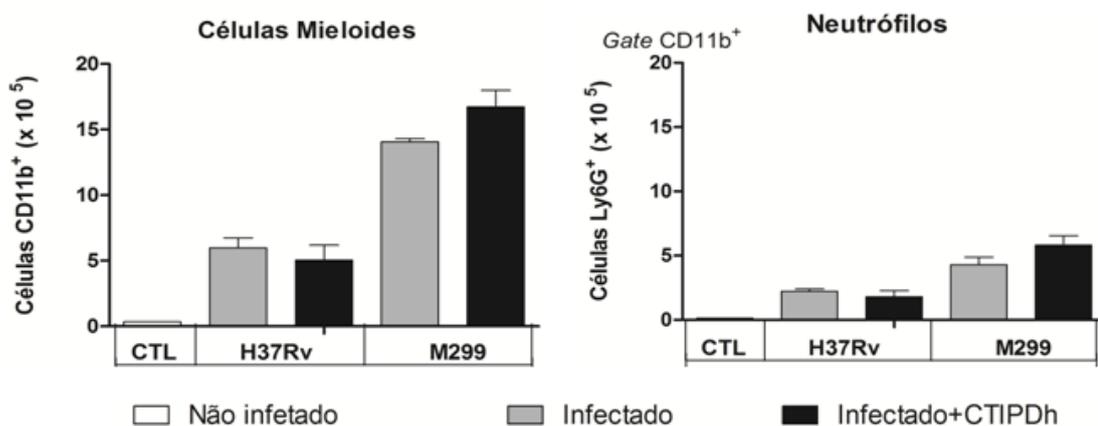


Figura 21: Recrutamento de células mielóides na fase crônica da infecção nos pulmões de camundongos infectados e tratados com CTIPDh. Os camundongos foram infectados com 100 bacilos via intraqueal, após 14 e 21 dias os animais receberam 2×10^5 CTIPDh via intraperitoneal. Após 120 dias da infecção os animais foram eutanasiados. As células do pulmão foram extraídas e marcadas com anticorpos contra marcadores de leucócitos. Os números totais de células CD11b⁺ e dos neutrófilos (células CD11b⁺ Ly6G⁺) foram quantificados. Os valores apresentados representam o número médio de células por pulmão de três experimentos independentes.

5.6. Análise das citocinas pro- e anti- inflamatórias produzidas pelas células nos pulmões dos camundongos infectados por micobactéria e tratados com CTIPDh

As células extraídas dos pulmões nos grupos dos camundongos infectados que foram tratados ou não com as CTIPDh foram cultivadas *ex vivo* por 48 horas e o perfil de citocinas e quimiocinas pro- inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, KC, MIP-2, G-CSF e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10) produzidas foi quantificado no sobrenadante da cultura através de ensaio multiplex. Os resultados apresentados na Figura 22 demonstram que o transplante das CTIPDh foi capazes de modular o padrão de citocinas e quimiocinas produzidas na fase aguda, 28 dias após a infecção, e fase crônica, 120 dias após a infecção. No dia 28 após a infecção, as células dos pulmões dos animais infectados com as cepas hipervirulentas (M299 e MP287) apresentaram maior produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCXC2/MIP-2, IFN- γ , IL-17) em relação as células dos animais infectados com a cepa H37Rv. O tratamento dos animais com as CTIPDh causou uma forte queda na produção da maioria dessas citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCXC2/MIP-2, CXCL1/KC).

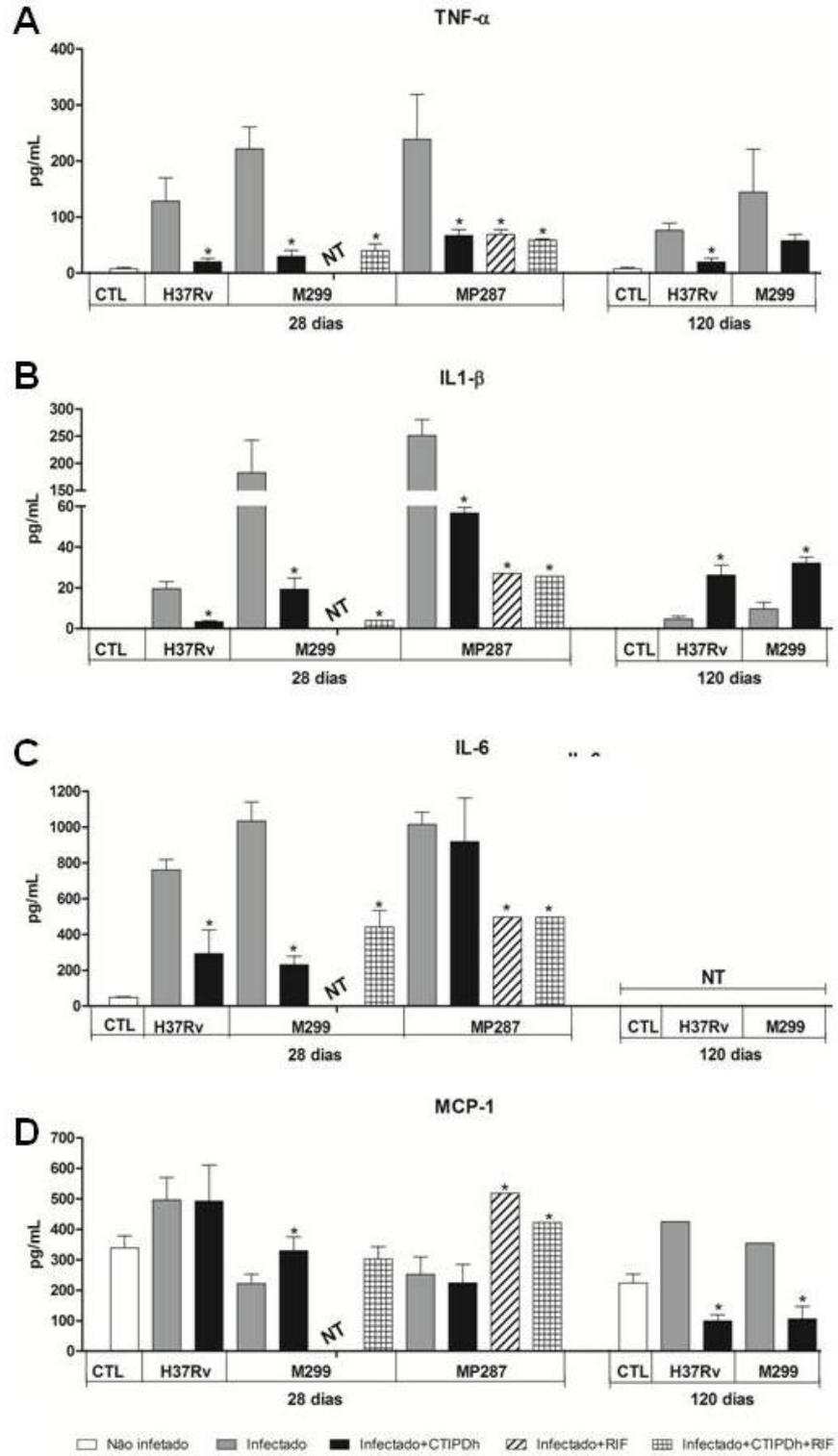
A produção de IFN- γ e IL-17 não foi alterada, sendo que nos animais infectados pela cepa MP287 (figura 22I), houve aumento da produção de IL-17. Interessante, que o primeiro grupo das citocinas é produzido principalmente por macrófagos, e o IFN- γ e a IL-17 são linfocinas, as citocinas produzidas por linfócitos; o que sugere que o efeito inibitório das CTIPDh foi direcionado principalmente aos fagócitos mononucleares. A única citocina cuja produção foi aumentada após tratamento com as CTIPDh foi a quimiocina CCL2/MCP-1, proteína de quimioatração de monócitos. A produção de MCP-1 foi inibida nos animais infectados pelas cepas hipervirulentas e o aumento da sua produção nos animais tratados pelas CTIPDh pode refletir o efeito imunomodulatório dessas células. Entretanto, o aumento foi observado somente nos animais infectados pela cepa M299, sem efeito na infecção pela cepa MP287.

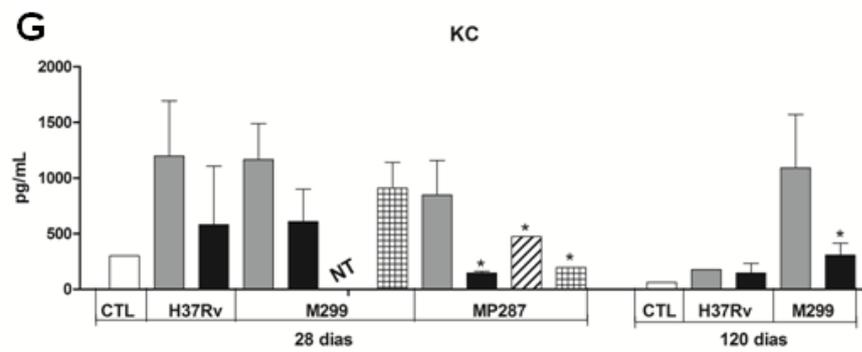
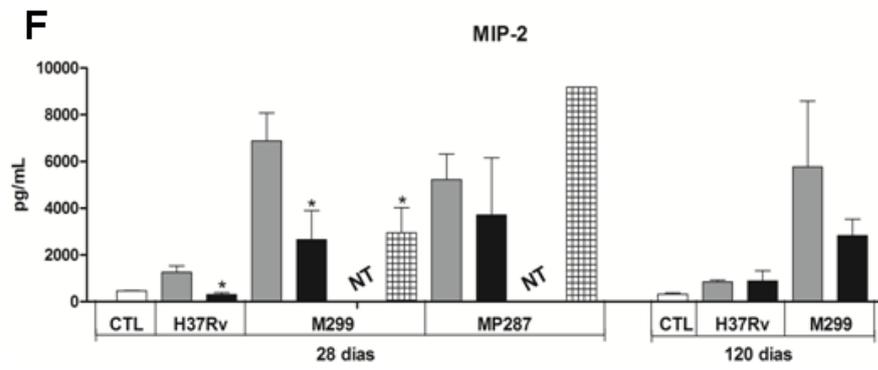
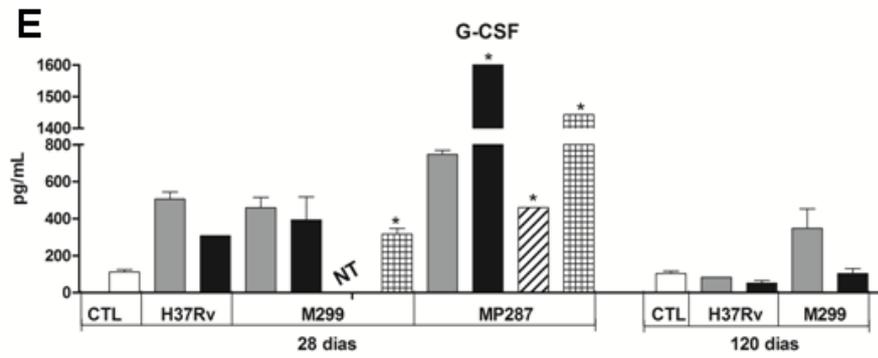
Entre as citocinas que foram fortemente inibidas pelas CTIPDh estão MIP-2 e KC, as quimiocinas responsáveis pelo recrutamento dos neutrófilos. A inibição da produção destas quimiocinas nos animais tratados pelas CTIPDh pode contribuir para a redução do acúmulo dos neutrófilos nos pulmões infectados pelas cepas hipervirulentas que foi observado neste trabalho. A redução da produção de TNF- α ,

IL-1 β , IL-6, principais citocinas pró-inflamatórias, também contribuiu a supressão da inflamação e da patologia associada que foram observadas no pulmão dos animais tratados com as CTIPDh. Importante relatar que o efeito anti-inflamatório das CTIPDh não foi associado com aumento da produção da citocina imunossupressora IL-10. Ao contrario, a produção desta citocina pelas células do pulmão foi reduzida nos animais tratadas com as CTIPDh (figura 22J), demonstrando que outros mecanismos, não associados com a produção da IL-10, são responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios das CTIPDh observado no nosso modelo.

A comparação dos efeitos terapêuticos de CTIPDh na produção de citocinas pelas células do pulmão com os efeitos da terapia convencional, utilizando o antibiótico rifampicina ou a combinação da rifampicina com as CTIPDh para o tratamento dos camundongos infectados pelas cepas hipervirulentas, demonstrou que a utilização da rifampicina também promoveu uma redução na produção das citocinas. O nível da redução de TNF- α , MIP-2, KC e IL-10 foi similar nos grupos de animais submetidos aos diferentes tratamentos. A redução de IL-1 β e IL-6 foi maior nos grupos tratados com a rifampicina. Além disso, a utilização da rifampicina inibiu a produção das linfocinas IFN- γ e IL-17 (figura 22).

Na fase crônica da infecção (dia 120 após a infecção), a produção da maioria das citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , G-CSF, CCXC1/KC, IFN- γ , IL-17) no pulmão dos animais infectados foi bem menor em comparação com a fase aguda (dia 28 após a infecção), o que demonstra a capacidade dos camundongos C57BL/6 de controlar a inflamação exacerbada observada no início da doença. A produção da IL-10 também foi menor na fase crônica da doença, pelo menos no dia da investigação (dia 120 dias após a infecção). Nos animais que foram tratados anteriormente pelas CTIPDh, a produção das citocinas pro-inflamatórias foi ainda menor em comparação com animais que não foram tratados, exceto das duas citocinas: IL-1 β e IFN- γ , cuja produção foi maior nos grupos dos animais tratados.





Não infectado
 Infectado
 Infectado+CTIPDh
 Infectado+RIF
 Infectado+CTIPDh+RIF

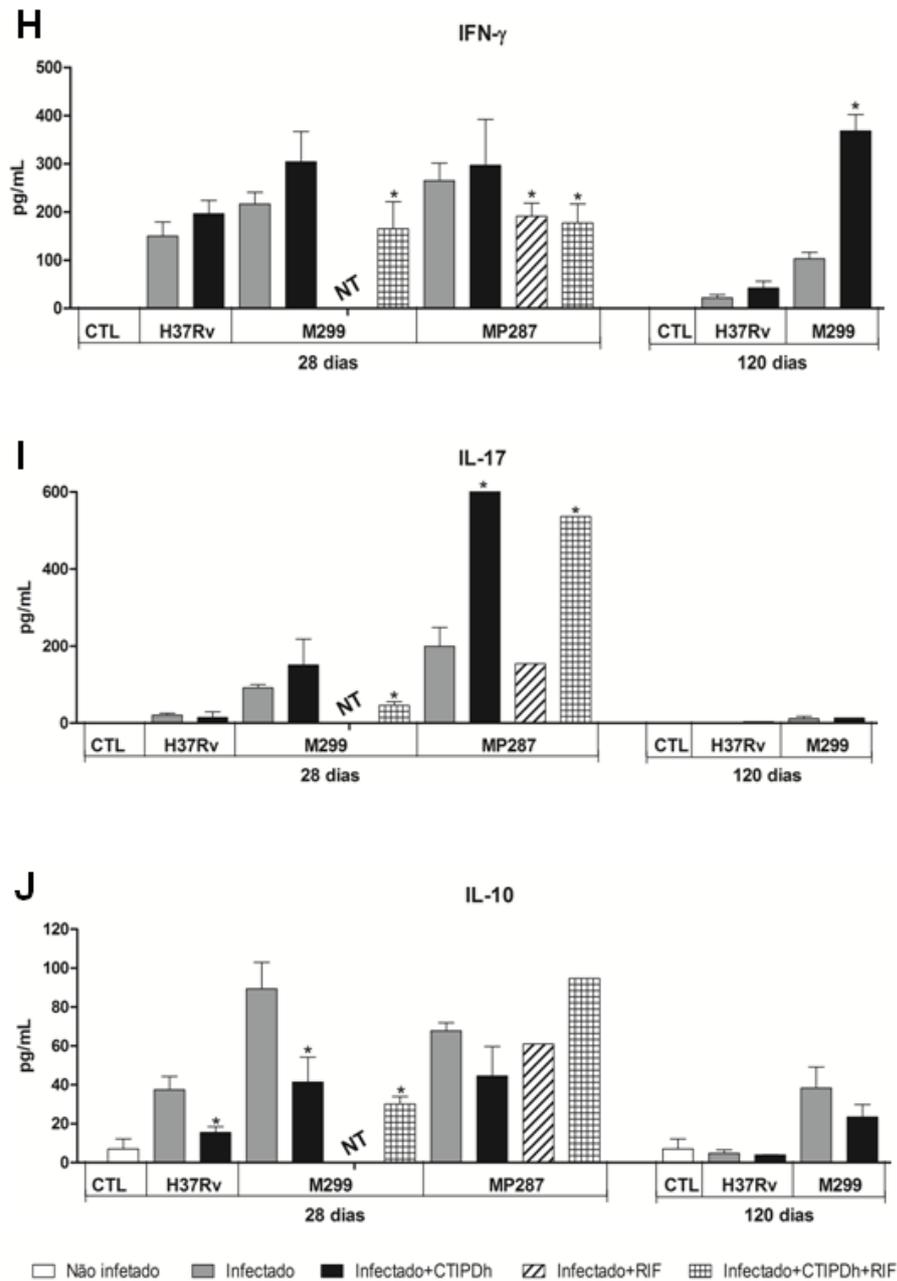


Figura 22 : Produção de citocinas pelas células dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com as cepas de micobactérias e tratados com CTIPDh. Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com 100 bacilos das cepas H37Rv, M299 e MP287. Nos dias 14 e 21 após a infecção, os animais infectados receberam intraperitonealmente 2×10^5 CTIPDh e/ou receberam rifampicina (inoculação intraperitoneal diária, do dia 14 ao dia 27). No dia 28 e dia 120 após a infecção, os animais foram eutanasiados. 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. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. As diferenças significativas entre os grupos tratados em comparação ao grupo não tratado está indicado pelo asteriscos * ($P < 0,05$). CTL (animais não infectados). NT- não testado.

Sabendo que as células-tronco mesenquimais produzem PGE_2 quando estimuladas, e que esta prostaglandina pode ter papel imunorregulador através de inibição da sinalização do receptor de células T e seu papel importante na resolução de inflamação (Wiemer, Hegde *et al.*, 2011; De Miguel, Fuentes-Julian *et al.*, 2012; Gao, Chiu *et al.*, 2016), nós avaliamos a produção deste mediador pelas células pulmonares extraídas de camundongos infectados e transplantados com as CTIPDh. Os resultados demonstram que todas as cepas foram capazes de induzir a produção de PGE_2 pelas células do pulmão (figura 23). A inoculação das CTIPDh nos animais infectados com as cepas H37Rv e M299 levou ao aumento da produção de PGE_2 pelas células do pulmão. Entretanto, nos animais infectados com a cepa MP287 foi observada uma forte queda na produção deste mediador. Os tratamentos utilizando a rifampicina não alteraram a produção de PGE_2 . Não foi observada diferença na produção de PGE_2 pelas células dos camundongos infectados e destes que foram tratados na fase crônica da infecção. Estes resultados sugerem que o efeito das CTIPDh no nível de produção de PGE_2 no local de inflamação foi temporário, provavelmente associado com a presença das células CTIPDh transplantadas, cuja permanência no pulmão não foi observada no dia 120 após da infecção (figura 23)

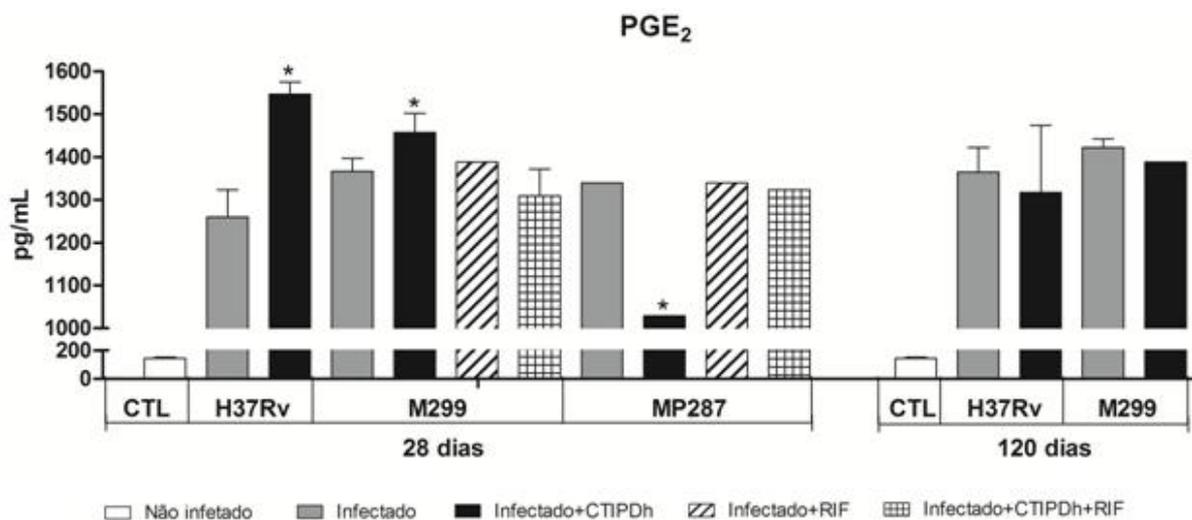


Figura 23: Produção de PGE_2 pelas células dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com as cepas de micobactérias e tratados com CTIPDh. Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com 100 bacilos das cepas H37Rv, M299 e MP28., Nos dias 14 e 21 após a infecção, os animais infectados receberam intraperitonicamente 2×10^5 CTIPDh e/ou receberam rifampicina (inoculação intraperitoneal diária, do dia 14 ao dia 27). No dia 28 e dia 120 após a infecção, os animais foram eutanasiados. As células dos pulmões foram extraídas e cultivadas ex vivo por 48 horas, a dosagem da prostaglandina PGE_2 nos sobrenadantes das culturas foi feita por *Kit* de Elisa Caliman, usando o protocolo do fabricante. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes. As diferenças significativas entre grupos tratados em comparação ao grupo não tratado está indicado pelo asteriscos * ($P < 0,05$). CTL (animais não infectados). RIF (rifampicina).

6. Discussão

Neste trabalho foi investigado o papel das células-tronco mesenquimais (CTM) intrínsecas (do próprio camundongo) e extrínsecas (foram utilizadas células xenogênicas) na patogenia da TB provocada por cepas de diferentes graus de virulência em modelo de camundongos C57BL/6.

Nos experimentos preliminares foi estabelecido um modelo de TB pulmonar severo, que reproduz no pulmão a patologia necrótica, associada à exacerbada inflamação promovida pelo recrutamento e acúmulo no foco da infecção dos neutrófilos (manuscrito submetido à publicação, Anexo II). Essa patologia foi induzida nos camundongos através de infecção intratraqueal pelas cepas hipervirulentas (isolados clínicos de *M. tuberculosis* Beijing, cepa M299, e de *M. bovis*, cepa MP287), cuja virulência foi estabelecida no nosso laboratório anteriormente (Amaral, Ribeiro *et al.*, 2014; Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014). Além disso, nós utilizamos o modelo convencional de infecção dos camundongos C57BL/6 pela cepa *M. tuberculosis* de referência de virulência (cepa H37Rv), que induz no pulmão uma doença moderada, caracterizada pela formação de granulomas nos pulmões (lesões sólidas).

Para investigar o acúmulo das CTMs intrínsecas nos locais da infecção caracterizadas pelos diferentes tipos de patologia, realizamos testes de imunohistoquímica para imunolocalização das CTMs no pulmão e baço dos camundongos infectados pelas diferentes cepas de micobactéria. Os resultados obtidos demonstram que células positivas para os marcadores mesenquimais (Sca-1, CD90, CD271 e vimentina) se acumularam ao redor dos infiltrados granulomatosos, como previamente foi demonstrado por Raghuvanshi (Raghuvanshi, Sharma *et al.*, 2010). Foi observado o maior acúmulo de células nos órgãos dos animais infectados com a cepa de maior virulência (cepa M299), o que pode ser devido ao processo de hiperinflamação e maior nível de lesão tecidual causado por essa cepa em comparação com lesões induzidas pela cepa H37Rv, de menor virulência. As CTMs apresentam quimiotaxia para os sítio de inflamação e injúria tecidual semelhantes às células do sistema imunológico. Vários mediadores, como TNF- α , MCP-1, IL-1 β e DNA extracelular, são conhecidos agentes quimiotáticos para as células-tronco mesenquimais (Spaeth, Klopp *et al.*, 2008; Yarygin, Lupatov *et al.*, 2016).

1 Nossos resultados demonstram que as células extraídas dos pulmões dos
2 animais infectados com as cepas hipervirulentas M299 e MP287, diferentemente das
3 células dos animais infectados com a cepa H37Rv, apresentam maior produção de
4 TNF- α , IL-1 β e várias quimiocinas. Além disso, a patologia pulmonar causada pelas
5 cepas hipervirulentas estão associada à morte necrótica celular e necrose tecidual,
6 que contribuem com a liberação da grande quantidade de DNA para o meio
7 extracelular, ativando a cascata de sinalização mediada pelos receptores P2X7 nos
8 macrófagos capazes de ligar ao ATP extracelular e promover a ativação de
9 inflamassoma (Amaral, Ribeiro *et al.*, 2014; Ribeiro, Gomes *et al.*, 2014). Altos níveis
10 dos mediadores pro-inflamatórios produzidos nos pulmões durante a infecção pelas
11 cepas hipervirulentas justificam o maior recrutamento e acúmulo nas lesões das
12 CTMs intrínsecas. O mesmo foi observado nos experimentos com inoculação das
13 CTM extrínsecas, quando as células tronco imaturas da polpa de dente humana, as
14 CTIPDh, foram injetadas intraperitonealmente nos camundongos infectados e sua
15 forte enxertia foi observada após 14 dias do início da sua inoculação (dia 28 do
16 experimento) nos pulmões dos animais infectados com as cepas hipervirulentas
17 (M299 e MP287) quando comparado com os infectados com a cepa H37Rv .

18 É importante ressaltar, que a permanência do enxerto das CTIPDh no local da
19 lesão foi transitória; 100 dias após a última inoculação (dia 120 do experimento), as
20 CTIPDh não foram detectadas nos pulmões dos animais infectados. Vários fatores
21 podem contribuir para a eliminação dessas células no organismo do receptor. Isto
22 pode ser devido ao fato de diferenciação destas células que está associada à perda
23 das suas características de imunoprivilegio e/ou imunossupressão, que acabam por
24 ser eliminadas por incompatibilidade tecidual (Ankrum, Ong *et al.*, 2014).

25 O principal objetivo deste trabalho foi avaliação do efeito terapêutico de
26 inoculação de CTM (as células CTIPDh) para tratamento da TB. Foram avaliados os
27 efeitos na patologia pulmonar, carga bacilar no pulmão e no processo inflamatório,
28 incluindo o recrutamento e acúmulo das diferentes subpopulações dos leucócitos
29 mielóides no pulmão e produção das citocinas pro- e anti-inflamatórias. O resultado
30 do tratamento com CTIPDh dos camundongos infectados foi comparado com os
31 resultados do tratamento convencional da TB, utilizando antibiótico contra
32 micobactéria (rifampicina), ou a combinação da CTIPDh e rifampicina. Entretanto, o
33 foco principal foi avaliação dos efeitos da terapia celular, sendo que este método foi

1 sugerido para tratamento dos pacientes com tuberculose resistente a múltiplas
2 drogas, MDR-TB (Skrahin, Ahmed *et al.*, 2014).

3 A infiltração do pulmão pelos leucócitos, a formação dos granulomas, a morte
4 celular necrótica e a necrose intragranulomatosa são as marcas principais da
5 patologia pulmonar provocada pela infecção micobacteriana. Em nossos
6 experimentos, a injeção de CTIPDh no 14° e 21° dia após a infecção reduziu a
7 infiltração das células mielóides nos pulmões dos animais infectados e preveniu a
8 formação das lesões necróticas causada pelas cepas de micobactéria mais
9 virulentas (cepas M299 e MP287). O efeito foi mediado pela forte queda na
10 infiltração neutrofílica, além da redução no recrutamento dos monócitos/macrófagos
11 inflamatórios e células dendríticas.

12 Uma massiva infiltração no pulmão por neutrófilos e posterior morte dessas
13 células leva à liberação de uma variedade de substâncias citotóxicas armazenadas
14 em grânulos de neutrófilos que podem causar a morte de células do epitélio
15 respiratório e a degradação de membranas basais alveolares, resultando em
16 necrose do tecido pulmonar (Grommes e Soehnlein, 2011). O papel patogênico dos
17 neutrófilos na TB foi bem demonstrada (Lowe, Redford *et al.*, 2012; Dorhoi,
18 Iannaccone *et al.*, 2014). A inibição do influxo de neutrófilos para os pulmões pode
19 ser associada a reduzida produção das quimiocinas responsáveis pelo recrutamento
20 dessas células (KC e MIP- 2) que foi observada nos animais que receberam as
21 CTIPDh. A produção das outras citocinas pró-inflamatórias, produzidas
22 principalmente por macrófagos (TNF- α , IL-1 β e IL-6), também foi reduzida nos
23 animais tratados com as CTIPDh. A redução pode ser associada quanto a
24 diminuição do número de macrófagos inflamatórios recrutados ao pulmão, com a
25 supressão da sua atividade. Foi demonstrado que o co-cultivo de macrófagos com
26 CTMs causa a mudança de um perfil inflamatório (M1) para um perfil anti-
27 inflamatório (M2) dos macrófagos com redução na produção de citocinas pró-
28 inflamatórias e aumentou da secreção da citocina imunossupressora IL-10 (Cho, Kim
29 *et al.*, 2014). Entretanto, nos nossos experimentos não foi observado aumento na
30 produção da IL-10 nos animais tratados com as CTIPDh, sugerindo que outros
31 mecanismos podem contribuir para efeitos anti-inflamatórios dessas células.

32 Nossos dados demonstram que o tratamento com as CTIPDh não alterou a
33 produção das linfocinas IFN- γ e IL-17 pelas células presentes no pulmão. Nos
34 estudos anteriores foi demonstrado que o controle de neutrófilos no pulmão durante

1 a TB pode ser associado aos efeitos contra-reguladores de IFN- γ , que são capazes
2 de limitar o recrutamento de neutrófilos e sua viabilidade no pulmão (Nandi e Behar,
3 2011).

4 O IFN- γ é uma citocina que regula negativamente a resposta de IL-17 nas
5 infecções micobactérias agindo diretamente na diferenciação dos linfócitos Th17
6 ou indiretamente, através da produção de Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) por
7 células não hematopoiéticas (Cruz, Khader *et al.*, 2006) e CTMs, ativando as
8 propriedades imunomoduladoras destas células (Laan, Cui *et al.*, 1999; Miyamoto,
9 Prause *et al.*, 2003). As CTMs ativadas por IFN- γ secretam prostaglandina PGE2
10 (Yagi, Soto-Gutierrez *et al.*, 2010). Altas concentrações de IDO e PGE2 regulam
11 negativamente a atividade de células TH17 e apresentam efeitos imunomodulatórios
12 na inflamação. As instilações intranasais de PGE2 ou aumento da produção
13 endógena deste mediador pela inibição farmacológica da 5-lipooxigenase reduziram
14 o números de *M. tuberculosis* no pulmão e patologia necrótica nos camundongos
15 com tuberculose severa e inflamação pulmonar exacerbada, aumentando sobrevida
16 dos animais (Nandi e Behar, 2011). Da mesma forma, o aumento na produção de
17 PGE2 que foi observado nos camundongos inoculados com as CTIPDh no nosso
18 modelo de tuberculose severa, pode contribuir para o controle da inflamação e
19 redução da necrose pulmonar.

20 Consequentemente, a redução da necrose pulmonar nos animais tratados com
21 CTIPDh refletiu na diminuição de áreas de fibrose nos pulmões na fase crônica da
22 infecção. As CTIPDh podem ter contribuído diretamente com a inibição da formação
23 dos tecido fibroso através da secreção de TGF- β e de MMPs que degrada e
24 reorganiza as fibras de colágeno, como mostrado por Wu e colaboradores em
25 modelo de camundongos C57BL/6 de fibrose epitelial induzida por bleomicina (Wu,
26 Huang *et al.*, 2013). Ou simplesmente por inibirem a formação de necrose pulmonar
27 impedindo que estas áreas sejam substituídas por tecido fibroso formando uma
28 cicatriz no tecido pulmonar de forma irreversível, com perda de área respiratória.

29 Entre outros efeitos do tratamento com CTIPDh no nosso modelo, foi
30 observada uma tendência a redução celular em relação aos que não receberam. Os
31 mecanismos deste fenômeno devem ser estudado melhor. No modelo murino de
32 pneumonia causada por *E. coli*, a injeção de CTMs levou a redução da carga
33 bacteriana nos pulmões destes animais e reduziu a inflamação, aumentando a
34 sobrevida dos animais (Gupta, Krasnodembskaya *et al.*, 2012). Neste trabalho, os

1 autores atribuíram a produção da lipocalina 2 pelas CTMs como responsável pela
2 diminuição da carga de *E. coli* nos pulmões dos animais (Gupta, Krasnodembskaya
3 *et al.*, 2012). A produção da lipocalina 2 ou outros produtos bactericidas produzidos
4 pelas CTIPDh ainda não foi investigado. Outro mecanismo que pode contribuir a
5 redução da carga bacteriana foi a redução do número de células fagocíticas
6 (neutrófilos, monócitos) permissíveis para a reprodução de micobactéria que foi
7 observada nos pulmões dos animais transplantados com as CTIPDh. Entretanto, a
8 redução de carga micobactérianos nos animais tratados com CTIPDh foi pequena, o
9 que demonstra a necessidade de combinar o tratamento celular com os fármacos
10 anti-micobactérianos, como a rifampicina. A combinação do tratamento combinado
11 de CTIPDh com a rifampicina foi mais eficaz na redução do crescimento de
12 micobactérianos, tanto quando na redução da patologia.

13 Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as
14 CTIPDh são capazes de modular a resposta inflamatória gerada em modelo de
15 infecção de camundongos C57Bl/6 infectados com micobactérias hipervirulentas,
16 prevenindo a necrose pulmonar na fase aguda da infecção e a formação de tecido
17 fibroso na fase crônica.

7. Conclusões

- Há acúmulo de células intrínsecas com marcação mesenquimal nas lesões dos pulmões e baços dos animais infectados;
- As células tronco mesenquimais xenogênicas (CTIPDh) inoculadas nos camundongos com tuberculose são capazes de migrar e se inserir nos pulmões;
- A permanência do transplante de CTIPDh no pulmão é temporária, sendo que as células não foram detectadas no pulmão após 120 dias de infecção.;
- A cepa de virulência elevada (M299 e MP287), em comparação com a cepa de virulência moderada (H37Rv), causou um maior recrutamento ao pulmão de células com marcação mesenquimal intrínsecas e células CTIPDh, injetadas nos camundongos, o que foi associado com a maior gravidade da patologia pulmonar induzida por cepa M299;
- O tratamento dos animais com as CTIPDh reduz a patologia pulmonar induzida pela micobactéria. O efeito foi maior nos animais infectados com as cepas hipervirulenta (M299 e MP287) que causou nos animais C57BL/6 pneumonia tuberculosa necrótica. O tratamento com CTIPDh foi capaz reduzir área de pneumonia e prevenir o desenvolvimento da necrose.
- O tratamento com CTIPD não reduziu significativamente a carga de micobactéria no pulmão o que demonstra a necessidade de combinar o tratamento celular com fármacos anti-micobactérianos.
- O efeito terapêutico do tratamento celular está mediado pelo efeito anti-inflamatório das CTIPDh, sua capacidade de inibir produção das citocinas e quimiocinas com propriedades pro-inflamatórias e de quimioatração dos leucócitos;
- A redução da patologia pulmonar foi associada a inibição da inflamação e recrutamento dos neutrófilos no pulmão;

➤ A redução de necrose na fase aguda de infecção diminuiu a formação das áreas de fibrose pulmonar na fase crônica.

8. Referências Bibliográficas

- Amaral, E. P., Ribeiro, S. C., Lanes, V. R., Almeida, F. M., de Andrade, M. R., Bomfim, C. C., Salles, E. M., Bortoluci, K. R., Coutinho-Silva, R., Hirata, M. H., Alvarez, J. M., Lasunskaja, E. B. e D'Imperio-Lima, M. R. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. PLoS Pathog, v.10, n.7, Jul, p.e1004188. 2014.
- Ankrum, J. A., Ong, J. F. e Karp, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. Nat Biotechnol, v.32, n.3, Mar, p.252-60. 2014.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S. e Hasko, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends Mol Med, v.19, n.6, Jun, p.355-67. 2013.
- Barry, C. E., 3rd, Boshoff, H. I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R. J. e Young, D. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. Nat Rev Microbiol, v.7, n.12, Dec, p.845-55. 2009.
- Baustian, C., Hanley, S. e Ceredig, R. Isolation, selection and culture methods to enhance clonogenicity of mouse bone marrow derived mesenchymal stromal cell precursors. Stem Cell Res Ther, v.6, p.151. 2015.
- Brudey, K., Driscoll, J. R., Rigouts, L., Prodinger, W. M., Gori, A., Al-Hajj, S. A., Allix, C., Aristimuno, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, C., Evans, J. T., Fauville-Dufaux, M., Ferdinand, S., Garcia de Viedma, D., Garzelli, C., Gazzola, L., Gomes, H. M., Gutierrez, M. C., Hawkey, P. M., van Helden, P. D., Kadival, G. V., Kreiswirth, B. N., Kremer, K., Kubin, M., Kulkarni, S. P., Liens, B., Lillebaek, T., Ho, M. L., Martin, C., Mokrousov, I., Narvskaia, O., Ngeow, Y. F., Naumann, L., Niemann, S., Parwati, I., Rahim, Z., Rasolofo-Razanamparany, V., Rasolonavalona, T., Rossetti, M. L., Rusch-Gerdes, S., Sajduda, A., Samper, S., Shemyakin, I. G., Singh, U. B., Somoskovi, A., Skuce, R. A., van Soolingen, D., Streicher, E. M., Suffys, P. N., Tortoli, E., Tracevska, T., Vincent, V., Victor, T. C., Warren, R. M.,

Yap, S. F., Zaman, K., Portaels, F., Rastogi, N. e Sola, C. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol, v.6, p.23. 2006.

Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res, v.9, n.5, Sep, p.641-50. 1991.

Caplan, A. I. e Sorrell, J. M. The MSC curtain that stops the immune system. Immunol Lett, v.168, n.2, Dec, p.136-9. 2015.

Chan, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J. e Bloom, B. R. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages. Infect Immun, v.59, n.5, May, p.1755-61. 1991.

Chang, Y. S., Oh, W., Choi, S. J., Sung, D. K., Kim, S. Y., Choi, E. Y., Kang, S., Jin, H. J., Yang, Y. S. e Park, W. S. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. Cell Transplant, v.18, n.8, p.869-86. 2009.

Cho, D. I., Kim, M. R., Jeong, H. Y., Jeong, H. C., Jeong, M. H., Yoon, S. H., Kim, Y. S. e Ahn, Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. Exp Mol Med, v.46, p.e70. 2014.

Cole, S. T. e Barrell, B. G. Analysis of the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Novartis Found Symp, v.217, p.160-72; discussion 172-7. 1998.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. e Barrell, B. G.

Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature, v.393, n.6685, Jun 11, p.537-44. 1998.

Condamine, T. e Gaborit, D. I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. Trends Immunol, v.32, n.1, Jan, p.19-25. 2011.

Cooper, A. M. e Khader, S. A. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. Immunol Rev, v.226, Dec, p.191-204. 2008.

Cosma, C. L., Sherman, D. R. e Ramakrishnan, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. Annu Rev Microbiol, v.57, p.641-76. 2003.

Cruz, A., Khader, S. A., Torrado, E., Fraga, A., Pearl, J. E., Pedrosa, J., Cooper, A. M. e Castro, A. G. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. J Immunol, v.177, n.3, Aug 1, p.1416-20. 2006.

Das, B., Kashino, S. S., Pulu, I., Kalita, D., Swami, V., Yeager, H., Felsher, D. W. e Campos-Neto, A. CD271(+) bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant *Mycobacterium tuberculosis*. Sci Transl Med, v.5, n.170, Jan 30, p.170ra13. 2013.

De Miguel, M. P., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Pascual, C. Y., Aller, M. A., Arias, J. e Arnalich-Montiel, F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. Curr Mol Med, v.12, n.5, Jun, p.574-91. 2012.

Desvignes, L. e Ernst, J. D. Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Immunity, v.31, n.6, Dec 18, p.974-85. 2009.

- Dorhoi, A., Iannaccone, M., Maertzdorf, J., Nouailles, G., Weiner, J., 3rd e Kaufmann, S. H. Reverse translation in tuberculosis: neutrophils provide clues for understanding development of active disease. Front Immunol, v.5, p.36. 2014.
- Flynn, J. L. e Chan, J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol, v.19, p.93-129. 2001.
- Francois, M., Romieu-Mourez, R., Li, M. e Galipeau, J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. Mol Ther, v.20, n.1, Jan, p.187-95. 2012.
- Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O. e Grinyo, J. M. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. Front Immunol, v.3, p.212. 2012.
- Fratti, R. A., Chua, J., Vergne, I. e Deretic, V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.9, Apr 29, p.5437-42. 2003.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. e Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation, v.6, n.2, Mar, p.230-47. 1968.
- Ganguly, N., Siddiqui, I. e Sharma, P. Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. Tuberculosis (Edinb), v.88, n.6, Nov, p.510-7. 2008.
- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., Tse, H. F., Fu, Q. L. e Lian, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. Cell Death Dis, v.7, p.e2062. 2016.
- Glenn, J. D. e Whartenby, K. A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. World J Stem Cells, v.6, n.5, Nov 26, p.526-39. 2014.

- Gopal, R., Monin, L., Slight, S., Uche, U., Blanchard, E., Fallert Junecko, B. A., Ramos-Payan, R., Stallings, C. L., Reinhart, T. A., Kolls, J. K., Kaushal, D., Nagarajan, U., Rangel-Moreno, J. e Khader, S. A. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent Mycobacterium tuberculosis HN878 infection. PLoS Pathog, v.10, n.5, May, p.e1004099. 2014.
- Grommes, J. e Soehnlein, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. Mol Med, v.17, n.3-4, Mar-Apr, p.293-307. 2011.
- Gupta, N., Krasnodembskaya, A., Kapetanaki, M., Mouded, M., Tan, X., Serikov, V. e Matthay, M. A. Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine Escherichia coli pneumonia. Thorax, v.67, n.6, Jun, p.533-9. 2012.
- Heng, T. S., Dudakov, J. A., Khong, D. M., Chidgey, A. P. e Boyd, R. L. Stem cells--meet immunity. J Mol Med (Berl), v.87, n.11, Nov, p.1061-9. 2009.
- Hunter, R. L., Armitige, L., Jagannath, C. e Actor, J. K. TB research at UT-Houston--a review of cord factor: new approaches to drugs, vaccines and the pathogenesis of tuberculosis. Tuberculosis (Edinb), v.89 Suppl 1, Dec, p.S18-25. 2009.
- Hunter, R. L., Jagannath, C. e Actor, J. K. Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs. Tuberculosis (Edinb), v.87, n.4, Jul, p.267-78. 2007.
- Hunter, R. L., Olsen, M. R., Jagannath, C. e Actor, J. K. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. Ann Clin Lab Sci, v.36, n.4, Autumn, p.371-86. 2006.
- Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J. e Pieters, J. Survival of

mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. Cell, v.130, n.1, Jul 13, p.37-50. 2007.

Kaufmann, S. H. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. Nat Rev Immunol, v.6, n.9, Sep, p.699-704. 2006.

Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G. C., Gomes Massironi, S. M., Pereira, L. V., Caplan, A. I. e Cerruti, H. F. 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.105-16. 2006.

Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A. e Mobasheri, A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. Methods, Sep 15. 2015.

Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E. e Linden, A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. J Immunol, v.162, n.4, Feb 15, p.2347-52. 1999.

Lasunskaja, E., Ribeiro, S. C., Manicheva, O., Gomes, L. L., Suffys, P. N., Mokrousov, I., Ferrazoli, L., Andrade, M. R., Kritski, A., Otten, T., Kipnis, T. L., da Silva, W. D., Vishnevsky, B., Oliveira, M. M., Gomes, H. M., Baptista, I. F. e Narvskaya, O. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. Microbes Infect, v.12, n.6, Jun, p.467-75. 2010.

Lopez, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., Barrera, L., Kremer, K., Hernandez-Pando, R., Huygen, K. e van Soolingen, D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. Clin Exp Immunol, v.133, n.1, Jul, p.30-7. 2003.

- Lowe, D. M., Redford, P. S., Wilkinson, R. J., O'Garra, A. e Martineau, A. R. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? Trends Immunol, v.33, n.1, Jan, p.14-25. 2012.
- Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegria, J., Contreras, R., Nova-Lamperti, E., Tejedor, G., Noel, D., Jorgensen, C., Figueroa, F., Djouad, F. e Carrion, F. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. Stem Cell Res Ther, v.4, n.3, p.65. 2012.
- Mabuchi, Y., Morikawa, S., Harada, S., Niibe, K., Suzuki, S., Renault-Mihara, F., Houlihan, D. D., Akazawa, C., Okano, H. e Matsuzaki, Y. LNGFR(+)THY-1(+)-VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. Stem Cell Reports, v.1, n.2, p.152-65. 2013.
- Mei, S. H., Haitsma, J. J., Dos Santos, C. C., Deng, Y., Lai, P. F., Slutsky, A. S., Liles, W. C. e Stewart, D. J. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. Am J Respir Crit Care Med, v.182, n.8, Oct 15, p.1047-57. 2010.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W. e Dilloo, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood, v.103, n.12, Jun 15, p.4619-21. 2004.
- Mishra, B. B., Moura-Alves, P., Sonawane, A., Hacoheh, N., Griffiths, G., Moita, L. F. e Anes, E. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. Cell Microbiol, v.12, n.8, Aug, p.1046-63. 2010.
- Miyamoto, M., Prause, O., Sjostrand, M., Laan, M., Lotvall, J. e Linden, A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. J Immunol, v.170, n.9, May 1, p.4665-72. 2003.

- Nandi, B. e Behar, S. M. Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection. J Exp Med, v.208, n.11, Oct 24, p.2251-62. 2011.
- O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J. e Berry, M. P. The immune response in tuberculosis. Annu Rev Immunol, v.31, p.475-527. 2013.
- Ortiz, L. A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N. e Phinney, D. G. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.14, Jul 8, p.8407-11. 2003.
- Parwati, I., van Crevel, R. e van Soolingen, D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. Lancet Infect Dis, v.10, n.2, Feb, p.103-11. 2010.
- Raghuvanshi, S., Sharma, P., Singh, S., Van Kaer, L. e Das, G. Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.107, n.50, Dec 14, p.21653-8. 2010.
- Ribeiro, S. C., Gomes, L. L., Amaral, E. P., Andrade, M. R., Almeida, F. M., Rezende, A. L., Lanes, V. R., Carvalho, E. C., Suffys, P. N., Mokrousov, I. e Lasunskaja, E. B. Mycobacterium tuberculosis strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. J Clin Microbiol, May 14. 2014.
- Ryan, J. M., Barry, F. P., Murphy, J. M. e Mahon, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. J Inflamm (Lond), v.2, Jul 26, p.8. 2005.
- Sacchettini, J. C., Rubin, E. J. e Freundlich, J. S. Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator Mycobacterium tuberculosis. Nat Rev Microbiol, v.6, n.1, Jan, p.41-52. 2008.

- Sakamoto, K. The pathology of Mycobacterium tuberculosis infection. Vet Pathol, v.49, n.3, May, p.423-39. 2012.
- Schluger, N. W. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. Respir Res, v.2, n.3, p.157-63. 2001.
- Schluger, N. W. e Rom, W. N. The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.3 Pt 1, Mar, p.679-91. 1998.
- Sharma, S. K. e Mohan, A. Multidrug-resistant tuberculosis. Indian J Med Res, v.120, n.4, Oct, p.354-76. 2004.
- Shi, M., Liu, Z. W. e Wang, F. S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. Clin Exp Immunol, v.164, n.1, Apr, p.1-8. 2011.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R. e Enninga, J. Phagosomal rupture by Mycobacterium tuberculosis results in toxicity and host cell death. PLoS Pathog, v.8, n.2, Feb, p.e1002507. 2012.
- Skrahin, A., Ahmed, R. K., Ferrara, G., Rane, L., Poiret, T., Isaikina, Y., Skrahina, A., Zumla, A. e Maeurer, M. J. Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial. Lancet Respir Med, v.2, n.2, Feb, p.108-22. 2014.
- Soleymaninejadian, E., Pramanik, K. e Samadian, E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. Am J Reprod Immunol, v.67, n.1, Jan, p.1-8. 2012.
- Souza, G. S., Rodrigues, A. B., Gioffre, A., Romano, M. I., Carvalho, E. C., Ventura, T. L. e Lasunskiaia, E. B. Apa antigen of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as a target for species-specific immunodetection of the

bacteria in infected tissues of cattle with paratuberculosis. Vet Immunol Immunopathol, v.143, n.1-2, Sep 15, p.75-82. 2011.

Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M. e Marini, F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. Gene Ther, v.15, n.10, May, p.730-8. 2008.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. e Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, v.282, n.5391, Nov 6, p.1145-7. 1998.

Torrado, E. e Cooper, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. Cytokine Growth Factor Rev, v.21, n.6, Dec, p.455-62. 2010.

van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. e van der Meer, J. W. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Rev, v.15, n.2, Apr, p.294-309. 2002.

Via, A. G., Frizziero, A. e Oliva, F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. Muscles Ligaments Tendons J, v.2, n.3, Jul, p.154-62. 2012.

Vladimirovna, I. L., Sosunova, E., Nikolaev, A. e Nenasheva, T. Mesenchymal Stem Cells and Myeloid Derived Suppressor Cells: Common Traits in Immune Regulation. J Immunol Res, v.2016, p.7121580. 2016.

Welin, A., Winberg, M. E., Abdalla, H., Sarndahl, E., Rasmusson, B., Stendahl, O. e Lerm, M. Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. Infect Immun, v.76, n.7, Jul, p.2882-7. 2008.

WHO. Global tuberculosis report 2015. 2015.

- Wiemer, A. J., Hegde, S., Gumperz, J. E. e Huttenlocher, A. A live imaging cell motility screen identifies prostaglandin E2 as a T cell stop signal antagonist. J Immunol, v.187, n.7, Oct 1, p.3663-70. 2011.
- Wong, K. W. e Jacobs, W. R., Jr. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Microbiol, v.13, n.9, Sep, p.1371-84. 2011.
- Wu, Y., Huang, S., Enhe, J., Ma, K., Yang, S., Sun, T. e Fu, X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. Int Wound J, v.11, n.6, Dec, p.701-10. 2013.
- Xu, J., Woods, C. R., Mora, A. L., Joodi, R., Brigham, K. L., Iyer, S. e Rojas, M. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.293, n.1, Jul, p.L131-41. 2007.
- Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R. G., Kobayashi, N. e Yarmush, M. L. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. Cell Transplant, v.19, n.6, p.667-79. 2010.
- Yarygin, K. N., Lupatov, A. Y. e Sukhikh, G. T. Modulation of Immune Responses by Mesenchymal Stromal Cells. Bull Exp Biol Med, Sep 3. 2016.

Anexo I



Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 198, intitulado **‘Estudo de virulência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de maior importância epidemiológica: genótipos Beijing e LAM.’** sob a responsabilidade da Dr^a. Elena Lassouskaia, Centro de Biotecnologia 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 18/12/ 2012. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 18/12/2016.

Campos dos Goytacazes, 18 de dezembro de 2012.

Clóvis da Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

Anexo II