

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Murilo Delgobo

A diferenciação mielóide de células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*: envolvimento da via do receptor de IL-6

Florianópolis

2018

Murilo Delgobo

A diferenciação mielóide de células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*: envolvimento da via do receptor de IL-6

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Co-orientador: Prof. Dr. Johan Van Weyenbergh

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Delgobo, Murilo

A diferenciação mielóide de células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*:

envolvimento da via do receptor de IL-6 / Murilo Delgobo ; orientador, André Báfica, coorientador, Johan Van Weyenbergh, 2018.

196 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

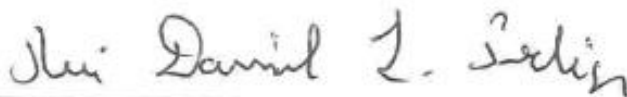
1. Farmacologia. 2. Tuberculose. 3. Mielopoiese. 4. Interleucina 6. 5. Células Tronco/Progenitoras Hematopoiéticas. I. Báfica, André . II. Van Weyenbergh, Johan. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

"A diferenciação mielóide de células tronco/progenitoras hemotopoiéticas humanas durante a infecção por Mycobacterium tuberculosis: envolvimento da via do receptor de IL-6"

Por

Murilo Delgobo

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (026/2018/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

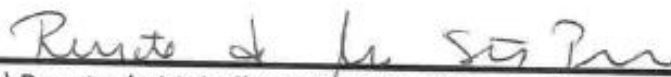


Prof.(a) Dr.(a) Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



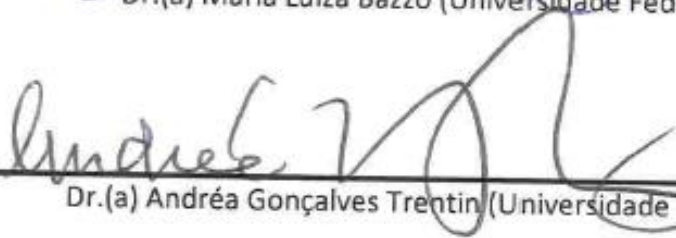
Dr.(a) André Luiz Barbosa Báfica (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



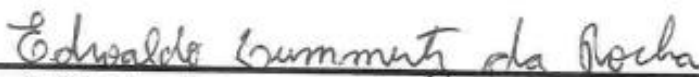
Dr.(a) Renata de Meirelles Santos Pereira - membro externo (Universidade Federal do Rio de Janeiro)



Dr.(a) Maria Luiza Bazzo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Andréa Gonçalves Trentin (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Edroaldo Lummertz da Rocha (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de setembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca examinadora,

Ao Prof. André Báfica, pela orientação, por todos os ensinamentos nesses 4 anos e pelo grande investimento na minha formação e desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pela oportunidade que tive de começar um novo projeto no laboratório, por sua determinação e paixão pela ciência e por também sempre buscar o melhor em cada um de nós.

Ao Prof. Johan Van Weyenbergh, pela co-orientação, pelos ensinamentos nos últimos 2 anos do meu doutorado, pela crítica colaboração científica e por também fornecer reagentes e técnicas indispensáveis para elaboração desse projeto, em particular às células CD34⁺ purificadas e análise do transcriptoma. Agradeço pelo investimento que teve em disponibilizar esses reagentes, muitas vezes fazendo longas viagens e trabalhando nos finais de semana no Brasil.

Ao Prof. Daniel Mansur e ao Prof. Fernando Spiller pelas enriquecedoras discussões, críticas e sugestões de experimentos.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Maria Luiza Bazzo, Prof. José Henrique M. Oliveira, Prof. Juliano Ferreira e Prof. José Eduardo da Silva Santos pela avaliação e contribuição científica feita ao trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Imunobiologia pela convivência, suporte e amizade que demonstraram nesses anos. Por toda diversão nos inúmeros *happy hours*, saídas à praia, festas juninas, churrascos, etc. Agradeço por todos os ensinamentos, científicos e pessoais, os quais foram cruciais para realização do doutorado e por muitos terem, literalmente, dado o sangue pelo trabalho.

Aos colegas do LiDI Lucas Mascarin, Daniel Mendes, Greicy Dias, Daniel Patrício, Edgar Koslova e Gabriela Luiz pela colaboração nos experimentos de microscopia, CFU, Western blot, qPCR e bioinformática presentes nessa tese. Agradeço por sempre estarem dispostos a colaborar e por passarem inúmeras madrugadas e finais de semana ajudando nos experimentos. Agradeço também à Yonne Menezes como aos demais colegas acima por terem feito experimentos enquanto eu não

estava no laboratório.

À Dr. Maíra Bicca, pela colaboração nos experimentos de microscopia confocal enquanto esteve no LiDI, como também pela amizade e convivência nesse período. À Prof. Joanita del Moral, do hospital universitário, por disponibilizar as amostras de medula óssea humana utilizadas nesse trabalho.

À Dr. Gaelle Breton, da Rockefeller University, por disponibilizar os anticorpos e seu *expertise* na análise de células dendríticas humanas.

Ao Dr. Edroaldo Rocha, da Harvard University, pela colaboração nas análises de bioinformática do trabalho, em especial pela análise de *Cellnet* presente na tese.

Ao Prof. Juliano Bordignon, do Instituto Carlos Chagas, por ter fornecido anticorpos para análise de citometria de fluxo e por fornecer o kit de ELISA para detecção de IL-6.

Ao Prof. Edmundo Grisard, Prof. Mario Steindel e à Prof. Patrícia Stoco por cederem reagentes e equipamentos do Laboratório de Protozoologia para alguns experimentos

de biologia molecular.

À equipe do LAMEB pela disponibilização de equipamentos que foram utilizados em alguns experimentos desse trabalho.

Aos professores e colegas do PPFMC por participarem da minha formação, discussões científicas e amizades no *safe e unsafe*.

Ao *TB Team* pelos momentos de diversão e descontração como também pela parceria nesses anos todos.

À minha família, pelo amor incondicional, por sempre apoiarem e darem suporte às minhas decisões. Agradeço por todo esforço que fizeram para eu estar aqui hoje e por terem me ensinado os valores fundamentais.

À minha esposa Priscila Z. Schinaider pelo amor e companheirismo de todos esses anos, por acreditar em meu trabalho e estar sempre ao meu lado nos melhores e piores momentos. Agradeço em especial por todo suporte e compreensão que teve nessa fase da minha vida.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro

*Aquilo que hoje está provado não foi
outrora mais do que imaginado*

William Blake

RESUMO

A produção de células imune hematopoiéticas são rapidamente iniciadas durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, sendo estas posteriormente mantidas por uma rara população de células denominada Células Tronco/Progenitoras Hematopoiéticas (HSPCs). Enquanto leucócitos adultos pertencentes a imunidade inata e adaptativa foram extensivamente estudados no contexto de doenças infecciosas, evidências recentes sugerem que HSPCs podem ser reguladas no contexto de infecções, onde a exposição a patógenos ou citocinas pro-inflamatórias resulta em mudanças globais no sistema hematopoiético. Ao passo que o patógeno *Mycobacterium tuberculosis* é classicamente conhecido por promover infecção no tecido pulmonar humano, estudos conduzidos nos últimos oito anos demonstram que Mtb infecta efetivamente células da medula óssea humana, estabelecendo um nicho para subversão da resposta imune e dormência no hospedeiro. Nesse cenário, evidências clínicas demonstraram uma associação entre a tuberculose humana e modificações em toda série hematopoiética, incluindo anemia, hiperplasia medular, expansão mielóides e linfopenia. Dessa forma, hipotetizamos que mudanças no

sistema hematopoiético ocorrem como resultado da ativação de HSPCs por Mtb. Utilizando um modelo *in vitro* de infecção, demonstramos que HSPCs (CD34⁺) humanas são infectadas por Mtb e que o patógeno replica nesse sistema. Notavelmente, infecção por Mtb esteve associada a expansão de progenitores mielóides e aumento na produção de monócitos por HSPCs. Esse processo requer a viabilidade do patógeno e enquanto Mtb induziu pSTAT1, comprometimento mielóide e proliferação bacteriana não foram dependentes da sinalização por IFNAR2 e IFN- γ . Em contraste, síntese de IL-6 foi aumentada em cultura de HSPCs infectada com Mtb e a sinalização por IL-6R foi necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação de Mtb em nosso modelo. Ao todo, esses resultados revelam um possível mecanismo pelo qual Mtb “sequestra” o comprometimento mielóide induzido por IL-6, contribuindo para a sobrevivência do patógeno.

Palavras-Chave: Tuberculose, Mielopoiese, Interleucina 6, Células Tronco/Progenitoras Hematopoiéticas

ABSTRACT

Production of hematopoietic derived immune cells are rapidly initiated during multicellular organism's development and are further maintained by a rare population of cells nominated Hematopoietic Stem/Progenitor cells (HSPCs). While mature leukocytes from innate and adaptive arms have been extensively studied in infectious diseases context, recent evidences suggest that HSPCs can be fined tuned during infectious diseases, where exposure to pathogens or inflammatory cytokines results in global changes in the hematopoietic system. Whereas *Mycobacterium tuberculosis* is classically known to promote infection in the lung tissue, studies conducted over the last eight years have shown that Mtb can successfully infect human bone marrow cells, which provide a niche for bacteria dormancy and immune system subversion. In that scenario, clinical evidences have shown an association with human tuberculosis and changes in the whole hematopoietic system, including anemia, bone marrow hypercellularity, myeloid cell expansion and lymphopenia. Therefore, we hypothesize that changes in the hematopoietic system are a result of HSPC activation by Mtb. Using an *in vitro* model of infection, we have showed that human HSPCs are

infected by Mtb and that the pathogen replicates in this system. Also, infection was correlated with myeloid progenitor expansion and increased monocyte output in CD34⁺ cell culture system. This process required pathogen viability and while Mtb induced pSTAT1, myeloid conversion and bacteria proliferation were not dependent on IFNAR2 and IFN- γ signaling. In contrast, IL-6 synthesis was enhanced in HSPCs cultures infected with Mtb and IL-6R signaling was necessary for myeloid expansion and bacteria proliferation in our model. Altogether, these results reveal a possible mechanism by which Mtb hijacks IL-6 induced myeloid commitment contributing to pathogen survival.

Key words: Tuberculosis, Myelopoiesis, Interleukin 6, Hematopoietic Stem/Progenitor Cells

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema representativo da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em seres humanos.....33
- Figura 2 – Disseminação de Mtb para tecidos extrapulmonares.....37
- Figura 3 – Produção de células da linhagem linfóide, mielóide e eritróide por HSPCs.....42
- Figura 4 – Diferentes vias de ativação das HSPCs em infecções.....50
- Figura 5 – Protocolo de expansão de CD34+ humanas.....59
- Figura 6 – *Mycobacterium tuberculosis* se associa a células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas..... 76
- Figura 7 – *Mycobacterium tuberculosis* infecta HSPCs humanas *in vitro*.....78
- Figura 8 – *Mycobacterium tuberculosis* prolifera na cultura de HSPCs humanas.....80
- Figura 9 – Proliferação de *Mycobacterium tuberculosis* observada por coloração de *Kynioun* em HSPCs humanas.....81

Figura 10 – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induz o aumento da expressão de CD38 em HSPCs humanas.....	84
Figura 11 – Infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resulta em aumento na expressão de marcadores mielóides em HSPCs do PBMC human <i>in vitro</i>	86
Figura 12 – Infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induz a expressão de marcadores mielóides em HSPCs derivadas da medula óssea humana <i>in vitro</i>	89
Figura 13 – Infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> não altera a viabilidade de HSPCs.....	92
Figura 14 – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induz a expansão de progenitores mielóides CD4+CD64+ em cultura de HSPCs purificadas.....	94
Figura 15 – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> promove aumento na produção de monócitos em cultura de HSPCs humanas.....	97
Figura 16 – Monócitos produzidos por HSPCs após infecção por Mtb apresentam semelhante fenótipo aos gerados na ausência de infecção.....	100
Figura 17 – Análise do transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb pela plataforma <i>Cellnet</i> confirma diferenciação monocítica.....	101
Figura 18 – Processos biológicos enriquecidos no transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb.....	103

Figura 19 - A via de sinalização do IFN do tipo I está ativada em HSPCs expostas a Mtb.....	105
Figura 20 – A via de sinalização do IFNAR2 não é necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação de Mtb em HSPCs.....	108
Figura 21 – A via de sinalização do IFN γ não é necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação de Mtb em HSPCs.....	111
Figura 22 – Aumento no transcrito e proteína de IL-6 em HSPCs expostas a Mtb.....	113
Figura 23 – A ativação da via do receptor de IL-6 em HSPCs infectadas com Mycobacterium tuberculosis.....	116
Figura 24 – A via de sinalização do IL-6R é necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação de Mtb em HSPCs.....	119
Figura 25 – A via de sinalização do IL-6R é suficiente para o comprometimento mielóide e produção de monócitos induzidos pela infecção de Mtb em HSPCs.....	123
Figura 26 – Hipótese para disseminação de Mtb através do mecanismo de Mielopoiese humana.....	156

ANEXO

Figura 27 – Controle da inibição dos receptores IFNAR2 em PBMC humano.....	159
Figura 28 – Controle da inibição de IFN γ em PBMC humano.....	159
Figura 29 – Controle da inibição de IL-6R (CD126) em PBMC humano.....	160
Figura 30 – Expressão de CD10 em células Lin ⁻ CD34 ⁺ do PBMC humano.....	161
Figura 31 – Frequência de monócitos e neutrófilos produzidos por HSPCs após 5 dias de infecção.....	161
Figura 32. Frequência de células eritróide CD235a ⁺ em HSPCs expostas a Mtb.....	162
Figura 33 – Frequência de neutrófilos, células dendríticas mielóides tipo 1 e megacariócitos/plaquetas na cultura de HSPCs expostas a Mtb e α IFNAR2.....	163
Figura 34 - Frequência de neutrófilos, células dendríticas mielóides tipo 1 e megacariócitos/plaquetas na cultura de HSPCs expostas a Mtb na presença de α IFN- γ	163
Figura 35 - Frequência de neutrófilos, células dendríticas mielóides do tipo 1 e megacariócitos/plaquetas na cultura de HSPCs expostas a Mtb e α IL-6R.....	164
Figura 36 - Frequência de granulócitos, megacariócitos/plaquetas, células eritróides e mDCs tipo 1 em meio Stemspan completo ou apenas	

na presença da citocina IL-6 20 µg/mL por 5 dias.....165

Figura 37 - Frequência de células CD10+ em HSPCs de cordão umbilical humano expostos a Mtb por 5d.....166

Figura 38 – Frequência de células NK, células dendríticas plasmocitóides e células dendríticas mieloides tipo 2 na cultura de HSPCs expostas a Mtb.....167

Figura 39 – Frequência de monócitos expressando baixos níveis de HLA-DR após infecção por Mtb.....168

Figura 40 - Curva padrão e quantificação das citocinas IL-10 e IFN-γ no sobrenadante de HSPCs expostas a Mtb.....169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDCA1 – Antígeno de diferenciação CD1 alfa 3

BMMC – Células mononucleares da medula óssea

C/EBP β - *CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta*

CB – *Cord Blood*

CCL2 – Quimiocina com motivo C-C 2

CD10 – Neprisilina

CD11b – Integrina alfa M

CD14 – Cluster de diferenciação 14

CD16 – Receptor Fc gama III

CD19 – Antígeno de linfócito B

CD235a – Glicoforina A

CD33 – SIGLEC-3

CD34 – *Cluster of differentiation 4* – Sialomucina

CD38 – ADP Ribosil ciclase

CD4 – T4/Leu3 – Cluster de diferenciação 4

CD41a – Receptor de fibrinogênio

CD64 – Receptor Fc Gama de alta afinidade

CD66b - *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8*

CD8 – Cluster de diferenciação 8

CFP 10 – Proteína do filtrado proteico de 10 kDa

CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

cGAS – GMP-AMP cíclico sintase

CLP – Progenitor Linfóide Comum

CMP – Progenitor Mielóide Comum

CXCL12 – Fator derivado de células estromais 1

CXCR4 – Receptor de quimiocina 4 tipo C-X-C

DAMPs – Padrões moleculares associados a perigo

DEGs – Genes diferencialmente expressos

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção enzimático

ESAT-6 - *6 kDa early secretory antigenic target*

F4/80 - *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*

Flt3l – Ligante de Tirosina quinase 3 relacionado ao fator Fms

FVS – Fixable viability staining

G-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos

GMP – Progenitor de Granulócito/Monócito

gp130 – Glicoproteína 130

HK Mtb – *Heat-killed Mtb*

HLA-DR – Antígeno leucocitário humano DR

HSCs – Células tronco hematopoiéticas

HSPCs – *Hematopoietic Stem/Progenitor cells*

IFNAR2 – Cadeia beta do receptor de IFN α/β

IFNGR – Receptor de Interferon gama

IFN- γ – Interferon gama

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-27 – Interleucina 27

IL-3 – Interleucina 3

IL-6 – Interleucina 6

IL-6R(CD126) – Cadeia alfa do receptor de IL-6

IRF2 – Fator regulatório do Interferon 2

ISGs – Genes estimulados por Interferon

LCMV – Vírus da coriomeningite linfocítica

LDH – Lactato desidrogenase

LMPP – Progeitor mutipotente linfo-mielóide

LPS – Lipopolissacarídeos

LSK – *Lineage negative Sca+ c-Kit negative*

LT-HSCs – Células tronco hematopoiéticos de longa duração

MEP – Progenitor Megacarióide/Eritróide

MFI – Mediana de Intensidade de Fluorescência

MOI – Multiplicidade de Infecção

MPPs – Progenitores Multipotentes

MSCs – Células tronco mesenquimais

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NFκB – Fator Nuclear κB

NK – *Natural-killer Cells*

NO – Óxido Nítrico

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão Fosfato-salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PET-CT – Positron emission tomography

Poly (I:C) - *Polyinosinic–polycytidylic acid*

PRR – Receptor do reconhecimento de padrões

RIG-I – Gene induzido por ácido retinóico I

SCF – Fator de célula tronco

SFEM II – Serum Free Expansion Media II

STAT1 - *Signal transducer and activator of transcription 1*

STAT3 - *signal transducers and activators of transcription 3*

TB – Tuberculose

TLR2 – Receptor do tipo *Toll 2*

TLR4 – Receptor do tipo *Toll 4*

TNF – Fator de necrose tumoral

TPO – Tromboeritropoietina

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	29
1.1 Resposta do hospedeiro Humano à infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
1.2 Infecção extra-pulmonar por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
1.3 O sistema hematopoiético humano.....	37
1.4 Resposta de HSPCs à infecção.....	45
2. Objetivos.....	54
2.1 Geral.....	54
2.2 Específicos.....	54
3. Metodologia Experimental.....	55
3.1 Reagentes.....	55
3.2 Coleta de Sangue periférico humano.....	55
3.3 Obtenção da fração de células mononucleares do sangue periférico.....	56
3.4 Cultivo de células tronco/progenitoras hematopoiéticas (CD34+) do cordão umbilical humano.....	57
3.5 Cultivo de Mtb H37Rv e marcação com corante syto24.....	59
3.6 Contagem de Unidades formadoras de colônia.....	61
3.7 Determinação de Mtb em HSPCs por coloração de Kinyoun.....	62

3.8	Determinação de Mtb em HSPCs por microscopia de fluorescência.....	63
3.9	Determinação do conteúdo de proteína por Immunoblotting.....	63
3.10	Reação de PCR em tempo real.....	65
3.11	Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	67
3.12	Quantificação de LDH no sobrenadante de HSPCs expostas a Mtb.....	68
3.13	Inibição da sinalização de IFNAR2, IFN γ e IL-6R em HSPCs.....	69
3.14	Citometria de Fluxo.....	70
3.15	Análise do transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb.....	73
3.16	Processamento dos dados e Análise estatística.....	74

4. Resultados.....75

4.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> infecta células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas (CD34 ⁺).....	75
4.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> prolifera na cultura de células CD34 ⁺ humanas.....	79
4.3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> induz aumento na expressão de marcadores mielóides em HSPCs do PBMC humano.....	82
4.4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> induz a expressão de marcadores mielóides em HSPCs da medula óssea humana.....	88
4.5	Expansão e cultura de células tronco hematopoiéticas purificadas do cordão umbilical humano.....	90

4.6	Infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> não promove a morte de HSPCs <i>in vitro</i>	92
4.7	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> induz a expansão de progenitores mielóides <i>in vitro</i>	95
4.8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> promove aumento na produção de monócitos em cultura de HSPCs humana.....	100
4.9	Análise do transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb confirma diferenciação monocítica.....	103
4.10	A via de sinalização do IFN α / β /Stat1 está ativada em HSPCs expostas a Mtb.....	106
4.11	A via de sinalização do IFNAR2 não é necessária para o comprometimento mielóide e produção de monócitos por HSPCs frente a infecção por Mtb.....	111
4.12	Infecção por Mtb em HSPCs resulta na produção de IL-6.....	117
4.13	A via de sinalização do IL-6R é necessária para o comprometimento mielóide e produção de monócitos por HSPCs frente a infecção por Mtb.....	120
5.	Discussão	125
6.	Conclusões	158
7.	Anexo	159
8.	Referências Bibliográficas	170

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Resposta do hospedeiro humano à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose é uma doença infecciosa, transmitida principalmente pelo ar e causada por organismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Em seres humanos, a infecção pode ser classicamente dividida entre dois estados, sendo eles: (1) Infecção Latente, na qual o hospedeiro apresenta resposta imunológica a antígenos da micobactéria, na ausência de sintomas clínicos da doença. A sensibilidade imunológica apenas pode ser detectada quando os pacientes desenvolvem a resposta imune adaptativa a Mtb, respondem ao *Tuberculosis Skin Test*, conhecido como teste da tuberculina ou derivado protéico purificado (PPD). No entanto, o teste com maior sensibilidade e recomendado para detecção de tuberculose latente consiste na liberação da citocina IFN- γ pelas células T do hospedeiro quando estimuladas com antígenos da micobactéria ESAT-6 e CFP 10 [1]. Estima-se que a tuberculose latente represente 90% das infecções por Mtb em seres humanos, presente em 2 bilhões de indivíduos no mundo todo. Os 10% restantes

representam a (2) Tuberculose ativa, no qual os pacientes desenvolvem os sintomas clínicos da doença que incluem febre noturna, perda de peso, tosse, hemoptise e apresentam evidência microbiológica da infecção por Mtb (cultura de escarro com confirmação por coloração álcool-ácido resistente, PCR, radiografia do pulmão por Raio-X e PET-CT) [1,2].

Seres humanos são os únicos reservatórios conhecidos de Mtb e portanto são responsáveis por manterem a micobactéria na população [3]. Enquanto se encontram na fase ativa pulmonar da doença, promovem a transmissão ao expelirem gotículas de aerossol contendo o bacilo. A principal via de entrada da bactéria ocorre pelo trato respiratório, onde Mtb encontra inicialmente macrófagos alveolares que internalizam o patógeno através de fagocitose mediada por receptores [3]. A partir desse ponto, é possível que os fagócitos e demais células residentes do pulmão eliminem a bactéria. No entanto, ao longo da co-evolução com o hospedeiro humano, Mtb desenvolveu inúmeras estratégias que subvertem a resposta do sistema imune. Uma das estratégias mais bem caracterizadas é o bloqueio da fusão do fagossomo com o lisossomo, o qual permite a sobrevivência da micobactéria em um ambiente com pH

mais próximo do neutro e com fontes de nutrientes necessários para sua perpetuação [2, 4]. Após resistir a resposta inicial pelos macrófagos, Mtb atinge o interstício pulmonar onde demais populações de monócitos e células dendríticas são infectadas pela micobactéria. Células infectadas migram para os linfonodos drenantes onde apresentam antígenos de Mtb para as populações de células T [2]. Ao reconhecerem o antígeno cognato na presença de moléculas co-estimulatórias, clones de células T expandem no linfonodo drenante e migram para o foco da infecção por gradiente de quimiocinas.

Esses eventos culminam na migração de células para o foco inicial da infecção, formando uma estrutura denominada granuloma, principal característica patológica da doença. Esse agregado celular se apresenta como uma estrutura organizada, formada por macrófagos, células dendríticas, linfócitos T, B e granulócitos os quais se acumulam em resposta a estímulo persistente [5]. Dados obtidos em modelo animal e em seres humanos sugerem que granulomas são vantajosos para o hospedeiro, pois contêm o espalhamento da bactéria para os demais tecidos do organismo [6]. No entanto, granulomas propiciam um microambiente onde a bactéria pode permanecer em

estado latente e posteriormente iniciar a proliferação e reativação da doença [7]. O estudo de autópsias revelou que na tuberculose ativa e latente, granulomas exibem heterogeneidade morfológica, representada por lesões necróticas, áreas mineralizadas, formação de tecido fibrótico e presença de cavidades. Além das diferenças morfológicas, granulomas podem ser classificados como estéreis, estáveis ou com disseminação da bactéria. Os modelos propostos sugerem que o balanço na produção de citocinas pró (TNF, IFN- γ) e anti inflamatórias (IL-10, TGF- β) e a ativação de células do sistema imune do hospedeiro, contribuem para o desfecho das lesões estéreis. Nos cenários das lesões estáveis, fatores como resposta imune exacerbada ou disfunção das células do hospedeiro favorecem a presença da bactéria, mesmo quando há eficiente produção de citocinas pró e anti inflamatórias. Por último, o excesso de imunopatologia na presença de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como também a presença de fatores de virulência da bactéria (lipoproteínas, ácidos micólicos, proteínas associadas a dormência, metaloproteases, proteínas inibidoras da apoptose, proteínas do sistema de secreção, proteínas da família PE/PPE) levam a granulomas com altas cargas de Mtb. Tanto a

variabilidade na resposta imune do hospedeiro à infecção quanto os fatores de virulência associados à bactéria fornecem evidências para a heterogeneidade da tuberculose em seres humanos [8-9].

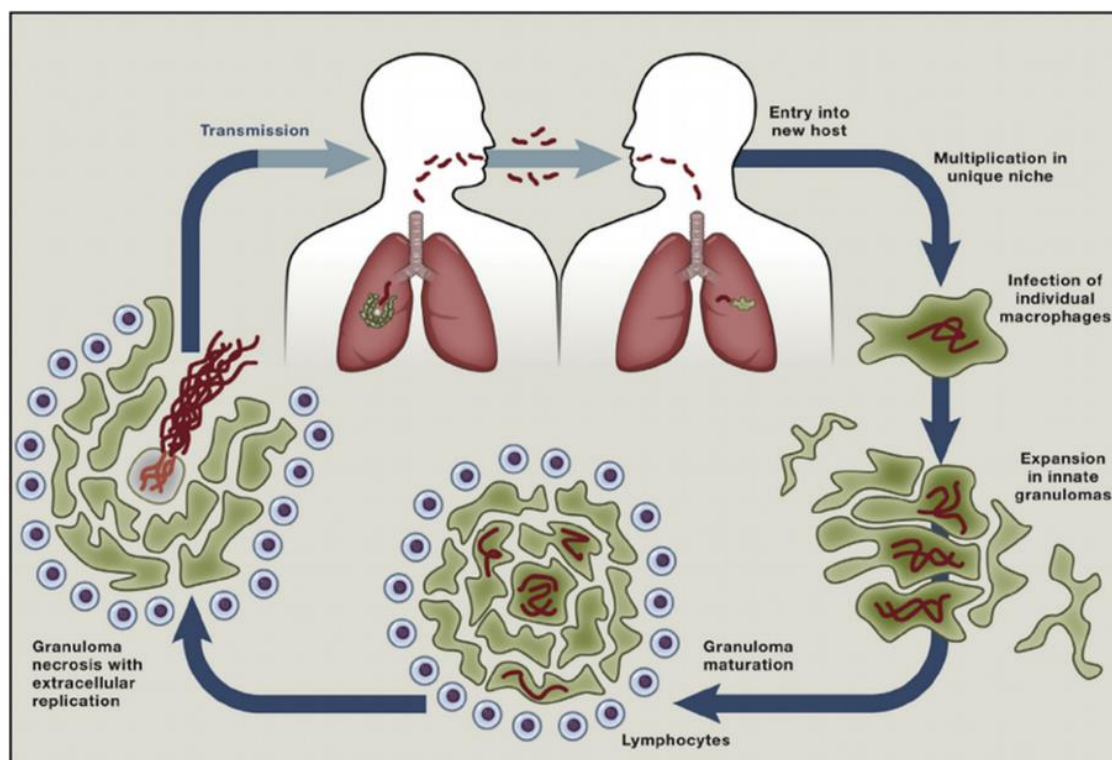


Figura 1 – Esquema representativo da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em seres humanos (Adaptado de Cambier C.J., Falkow S. and Ramakrishnan L., Cell., 2014).

1.2 Infecção extra-pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*

Embora seja considerado um patógeno preferencialmente pulmonar, Mtb pode infectar células de origem não-mielóide e não-linfóide (células imune não-clássicas) e causar doença em diferentes tecidos do corpo. Estima-se que, globalmente, um quinto dos

invíduos infectados apresentem tuberculose extra-pulmonar, já sendo descrita a presença da bactéria e sinais da patologia no fígado, rins, baço, intestino delgado, cavidade peritoneal, sistema nervoso central, meninges e medula óssea [10 – 17].

As primeiras evidências que apontam a capacidade de Mtb se propagar em células não-imune clássicas datam do começo da década de 1950, quando *Sheperd* demonstrou que a cepa virulenta de Mtb H37Rv pode invadir e replicar em células de câncer cervical (HeLa), células renais de macaco em células amnióticas humanas). Desde então, populações de células não fagocíticas ganharam interesse na investigação de mecanismos pelos quais Mtb subverte e evade a resposta imune protetora do hospedeiro [20]

Os diversos mecanismos pelos quais Mtb se espalha no organismo não foram totalmente elucidados, porém a disseminação da bactéria para os demais tecidos pode ocorrer rapidamente (7 a 12 dias) após a infecção, onde o bacilo infecta células adjacentes ao tecido pulmonar até atingir os linfonodos, baço e a circulação sistêmica [21]. Nesse contexto, Mehta e colaboradores demonstraram que células epiteliais do alvéolo pulmonar humano (linhagem A549) suportam números

significativamente maiores de bacilo internalizado quando comparados a macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ou a linhagem de macrófagos J774. Sugere-se que essas células sejam um ponto de transição na promoção da disseminação do bacilo, pois a infecção por Mtb resulta em quebra da integridade do epitélio. Além desse mecanismo, Mtb pode se distribuir para outros órgãos ao infectar populações de células migratórias do hospedeiro [23]. Nesse contexto, Raghuvanshi e colaboradores demonstraram que células tronco mesenquimais (MSCs) migram para o pulmão de camungondos infectados com Mtb e suprimem a resposta imune mediada por células T através da produção de óxido nítrico (NO). MSCs também foram encontradas em maior frequência e próximas a granulomas de pacientes com linfadenite tuberculosa. [25]. Somando-se a esses dados, Das e colaboradores demonstraram a capacidade replicativa de Mtb em MSCs e a presença da bactéria em MSCs na medula óssea de animais infectados. Além dos dados observados em modelo animal, MSCs da medula de seres humanos já tratados por 6 meses com antibioticoterapia continham DNA de Mtb, sendo possível o isolamento de unidades formadoras de colônia provenientes de MSCs purificadas

em 2 dos 9 pacientes analisados [25,26]. A presença da bactéria em diferentes nichos acrescenta uma camada a mais de complexidade na identificação e tratamento da doença, além de propiciar condições favoráveis à bactéria para o escape da resposta imune do hospedeiro [27].

Dessa forma, a medula óssea humana passa de um nicho pouco apreciado na tuberculose para um de alta relevância biológica e clínica, onde a bactéria se encontra em células imunoprivilegiadas que apresentam bombas de efluxo, condições que dificultam a eliminação do patógeno via ação do sistema imune e via antibioticoterapia [27, 169]. Além dos mecanismos de evasão mencionados, a presença de Mtb em MSCs da medula óssea humana coloca o principal tipo celular responsável pela produção de células da linhagem linfóide, mielóide e magacarióide, as células

tronco/progenitoras hematopoiéticas [28], em contato próximo com o patógeno.

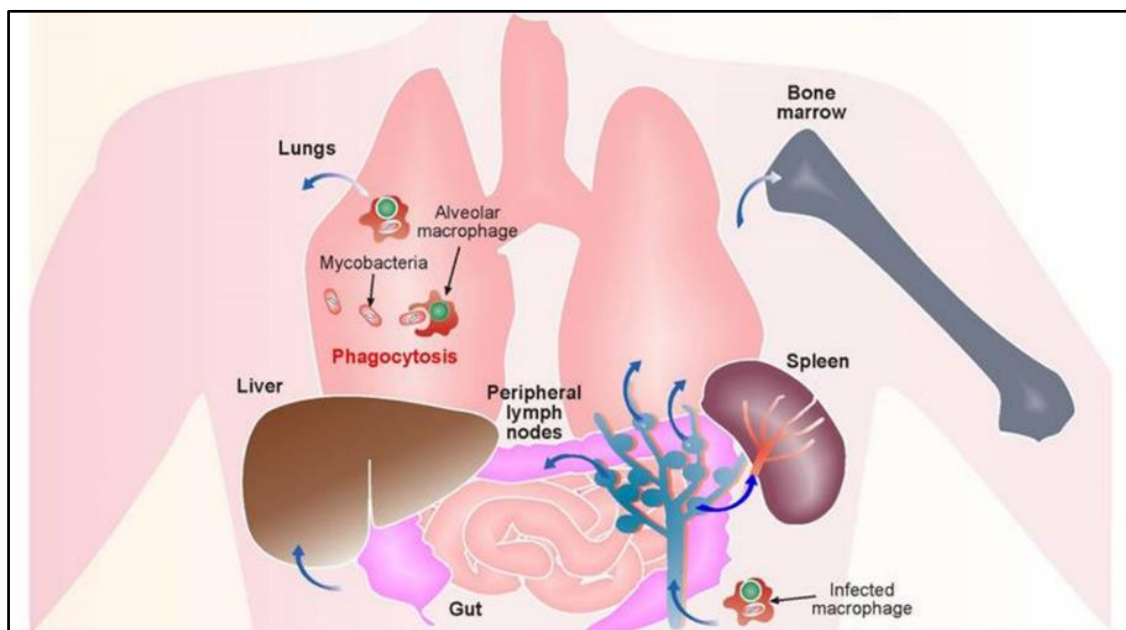


Figura 2 – Disseminação de Mtb para tecidos extra-pulmonares (Adaptado de Cadena, AM., Fortune SM. and Flynn JL., Nat Rev. Microb., 2017).

1.3 O sistema hematopoiético humano

HSPCs conferem ao sangue sua impressionante capacidade regenerativa, produzindo aproximadamente 10^{12} células diariamente a partir da medula [29]. Estudos iniciais apontaram, através da observação morfológica das células da medula óssea de mamíferos [30], que a hematopoiese é um processo organizado e hierárquico, derivado de uma célula precursora comum. Os primeiros indícios sugerindo a existência das células tronco hematopoiéticas datam de 1866, quando Ernst Neumann descreveu a presença de células eritróide nucleadas na

medula óssea. Também foram observados diferentes tipos morfológicos na população leucocítica, levando a conclusão que os processos de eritropoiese e leucopoiese ocorriam na medula óssea, por meio de uma célula comum a ambas as linhagens [20,170]. Posteriormente, em 1945, a demonstração da existência de células com capacidade de autorenovação e produção das linhagens eritróide e leucocítica ocorreu após a conclusão de estudos sobre os efeitos da radiação nas vítimas da bomba atômica em Hiroshima e Nagasaki.

Observou-se que, civís expostos aos menores índices letais de radiação, morriam principalmente por aplasia do sistema hematopoiético. Através da utilização de modelos animais que mimetizavam a alta exposição a radiação, descobriu-se que era possível reverter a falha hematopoiética ao transplantarem células do baço ou medula de um camundongo saudável para o animal irradiado [31,32]. Com a busca pelos mecanismos responsáveis por esse fenótipo, chegou-se a uma rara população celular capaz de restabelecer todas as linhagens linfóide, mielóide e eritróide/megacarióide semanas após transplante [33]. A essa população celular foi dado o nome de células tronco hematopoiéticas, sendo hoje possível caracterizá-las de acordo com estado de

diferenciação, comprometimento e proliferação através da expressão de diversas proteínas de superfície e expressão de fatores de transcrição.

A explicação para como células tronco hematopoiéticas suportam a hematopoiese ao longo da vida foi dada por suas duas principais características, sendo elas: **(1)** A capacidade de se auto-renovar através de divisões assimétricas, mantendo o *número* de células contínuo ao longo da vida do organismo [34]. Esse mecanismo assegura que enquanto uma pequena fração de HSCs entra no processo de diferenciação e comprometimento, a maior parte das células tronco reside em estado quiescente na homeostasia. Rossi e colaboradores sugerem que esse mecanismo protege HSCs, por diminuir a frequência de eventos como dano no DNA que pode ocorrer durante replicação, porém promovem o acúmulo de danos ao DNA durante o envelhecimento do organismo. Simultaneamente, Milyavsky e colaboradores demonstraram que HSCs humanas são mais resistentes à ativação de p53 após dano no DNA. Diferentes abordagens experimentais demonstraram que a manutenção da quiescência é necessária para eficiente produção de células adultas por HSCs. Nos trabalhos de Sato e colaboradores, observou-

se que camundongos *Knockout* para o gene IRF2, o qual regula negativamente a ativação da via de sinalização de IFNAR, continham números reduzidos de diversos progenitores hematopoiéticos, enquanto os números de HSCs estavam aumentados na medula dos animais. No mesmo contexto, Baldrige e colaboradores demonstraram que infecção por *Mycobacterium avium* promove exaustão de HSCs em um mecanismo dependente de IFN- γ . Nos dois cenários, a ativação crônica de HSCs resultou em diminuição na produção de progenitores e células adultas, culminando posteriormente em aplasia medular. Portanto, é de grande interesse nas ciências básicas e aplicada a descoberta de alvos que controlem o estado de quiescência de HSCs. Através do *screening* de 5280 compostos para verificar sua habilidade de promover a expansão de células humanas CD34⁺CD45RA⁻, Fares e colaboradores identificaram moléculas derivadas de pirimidindol, independente da via do receptor de Aril-hidrocarboneto, sendo capazes de manter e reconstituir a hematopoiese humana em camundongos imunocomprometidos por até 6 meses.

A segunda propriedade que caracteriza HSCs é :

(2) A geração de progenitores multipotentes, os quais

através de etapas consecutivas de diferenciação, produzem as células da linhagem eritróide/megacarióide (hemáceas e plaquetas), mielóide (granulócito, monócitos, células dendríticas) e linfóide (linfócitos B, T, células dendríticas plasmocitóides e células NK) as quais são distribuídas para o sangue e demais tecidos do organismo [40]. Um modelo hierárquico, onde HSCs são colocadas na posição mais alta, seguido dos respectivos progenitores e células adultas, foi extensivamente utilizado para explicar a diversidade na geração de células hematopoiéticas em mamíferos. Nesse modelo, HSCs humanas em estado de auto-renovação eventualmente migram para um estado de auto-replicação, conhecido como *short-term* HSCs, os quais diferenciam-se para progenitores multipotentes [41]. Os mecanismos envolvidos na transição de estados e comprometimento para as diferentes linhagens compreendem modificações epigenéticas e remodelamento da cromatina em regiões promotoras e amplificadoras do DNA [42,43]. A partir do somatório de diferentes fatores de transcrição, progenitores multipotentes adquirem o potencial de gerarem células da linhagem mielóide (progenitor mielóide comum – CMP) ou da linhagem linfóide (progenitor linfóide comum CLP).

Progenitores mielóide diferenciam-se então para células com potencial megacarióide/eritróide (MEP) ou para progenitores de granulócito/monócito (GMP), enquanto a fração linfóide gera células com potencial para diferenciarem-se em linfócito T, B e células NK. Nesse modelo, células dendríticas são geradas a partir de ambos os progenitores, sendo a população de célula dendrítica plasmocitóide derivada de progenitores linfóides enquanto os outros dois subtipos de células dendríticas são originadas de progenitores mielóides [44,45].

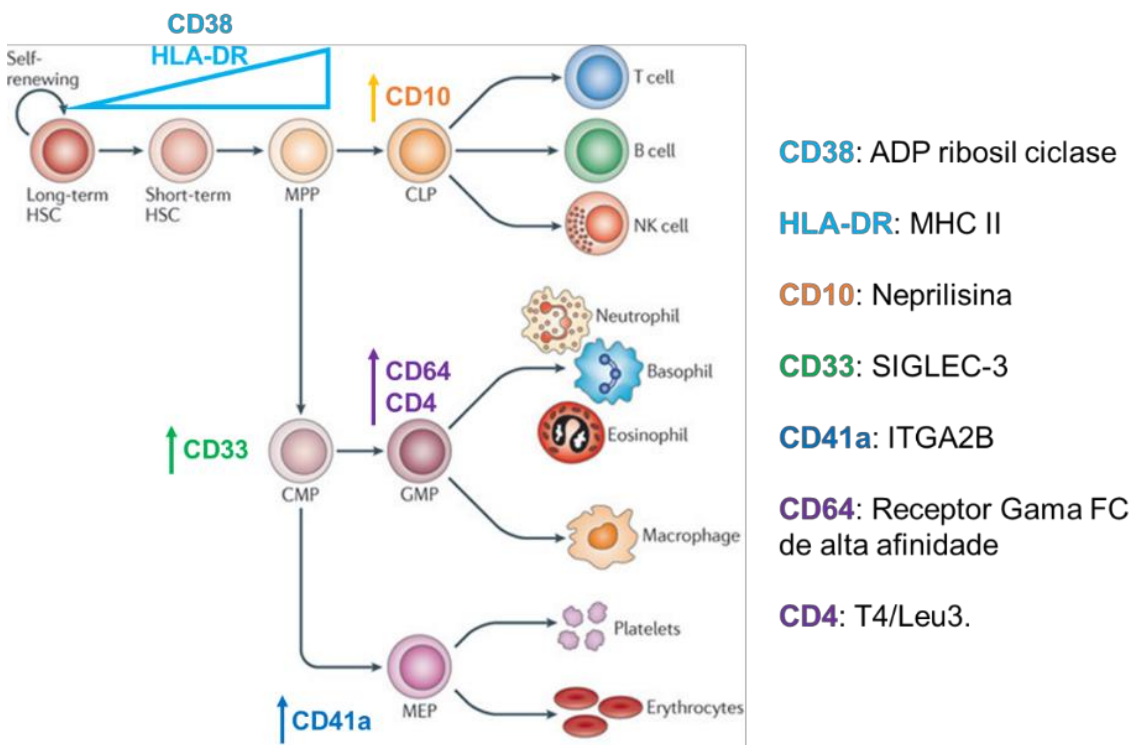


Figura 3 – Geração de células da linhagem linfóide, mielóide e eritróide por HSPCs (Adaptado King KY and Goodell MA, Nat. Rev. Immunol., 2011) HSC: Célula tronco hematopoiética, MPP: Progenitor multipotente, CLP: Progenitor linfóide comum, CMP: Progenitor mielóide comum, GMP: Progenitor de Granulócito/Monócito, MEP: Progenitor megacarióide/eritróide.

Apesar deste modelo ser amplamente estudado e sua utilização ter permitido o isolamento e caracterização de diferentes populações hematopoiéticas, dados recentes do transcriptoma, perfil de abertura da cromatina e modificações epigenéticas em HSCs a nível de *single-cell* desafiam o modelo clássico. Primeiramente, enquanto sugeria-se que o processo de diferenciação ocorria de forma determinística (transição de estado celular A para B), evidências provenientes do transcriptoma a nível de *single-cells* sugerem que o comprometimento ocorre como um *contínuo*, através de transições de um estado mais primitivo para um mais diferenciado [46 – 48]. No trabalho de Novershtern e colaboradores, dados de transcriptoma de HSPCs humanas foram coletados e fatores de transcrição que participam da escolha de linhagem foram selecionados a partir de teoria de redes biológicas. Para formalmente demonstrar a participação de cada um desses fatores de transcrição na eritropoiese e mielopoiese, shRNAs foram desenhados para cada TF e a produção de células CD235a⁺ ou CD11b⁺ foram medidas por citometria de fluxo. Com exceção de algumas populações de macrófagos residentes e populações de células T de

memória, todas as populações de leucócitos do indivíduo adulto são produzidas a partir de células tronco hematopoiéticas [50,51]. Notavelmente, foi demonstrado que progenitores megacarióides e eritróides se assemelham mais, à nível transcripcional, com HSCs quando comparados aos demais progenitores linfóides e mielóides. Nesse modelo revisado da hematopoiese, a geração de MEPs ocorre previamente e de forma independente ao comprometimento mielóide ou linfóide. Além disso, sugere-se a existência de um estado no qual progenitores apresentam tanto potencial linfóide quanto mielóide (LMPP), posterior a fase multipotente [49].

Portanto, pode-se concluir que perturbações no funcionamento de HSCs podem comprometer todo o funcionamento do sistema imune, a homeostasia e por fim, o transporte de oxigênio e nutrientes para os tecidos. A compreensão dos mecanismos e das populações que participam da hematopoiese humana são de alta relevância para o estudo de patologias onde é observado alterações no sistema hematopoiético como na precisa manipulação da hematopoiese para fins terapêuticos e biotecnológicos.

1.4 Resposta de HSPCs à infecção.

Células tronco/progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) foram por muitos anos normalmente observadas como uma população de células quiescentes, as quais raramente saíam desse estado e entravam na fase proliferativa apenas em condições extremas ao sistema hematopoiético, como depleção da medula óssea por radio e quimioterapia. Dessa forma, acreditava-se que a resposta de HSPCs ao estresse provenientes de infecção, inflamação ou diminuição do volume sanguíneo era apenas compensatória, reflexo da redução em tecidos extra-medulares dos números de leucócitos, hemáceas e plaquetas. Quando observava-se a hematopoiese sob a perspectiva de infecção, hipotetizava-se que o aumento na produção de progenitores linfóides comuns após estímulo com LPS *in vivo* ocorria como uma resposta compensatória à apoptose de linfócitos T [52]. O mesmo racional foi utilizado para justificar o aumento na produção de células da linhagem eritróide em hemorragias e células da linhagem mielóide durante infecção bacteriana [53].

No entanto, um conjunto de evidências adquiridas nos últimos 15 anos sugerem que HSPCs respondem

direto e imediatamente há infecção e respectivos mediadores produzidos pelo sistema imune do hospedeiro. Utilizando de um modelo de infecção pulmonar por *E. coli*, Shahbazian e colaboradores demonstraram que células tronco hematopoiéticas de camundongos (população LSK) expandiram na medula óssea, mesmo na ausência de leucopenia. Nesse mesmo modelo, níveis elevados de G-CSF foram encontrados no soro de animais infectados, sugerindo o envolvimento dessa citocina na expansão das células LSKs. Evidências demonstrando a capacidade proliferativa de HSCs após estímulo infeccioso foram obtidas em camundongos injetados com LPS, um componente da parede de bactérias gram-negativas, capaz de ativar receptores *Toll-like* do tipo 4 (TLR4). Células LSK da medula óssea, marcadas com o corante CFSE, apresentaram alta taxa de diluição do mesmo após 8 dias de estímulo com LPS quando comparado ao grupo controle [54]. Esses dados sugerem que a resposta inflamatória produzida pela exposição ao LPS, ou a própria sinalização de TLR4 em células LSKs é responsável por promover a proliferação dessa população *in vivo*. De fato, Nagai e colaboradores demonstraram a presença de receptores TLR2 e TLR4 funcionais na fração de células tronco hematopoiéticas,

progenitores linfóide comum e progenitores de granulócito e monócito. Nas respectivas populações, a ativação dos receptores levou a diferenciação mielóide, pelo aumento de células F4/80⁺ e produção de células dendríticas por progenitores linfóides. A biologia das HSPCs também pode ser alterada por vias de sinalização produzidas durante a infecção que afetam o nicho da medula óssea. Em particular, HSCs expressam altos níveis do receptor de quimiocina CXCR4, enquanto o respectivo ligante CXCL12 é expresso na medula óssea principalmente por osteoblastos, mantendo assim durante homeostase contato próximo com as HSCs. No entanto, o aumento na produção da citocina G-CSF durante infecções reprime a expressão de CXCL12, promovendo a mobilização de HSCs [56]. Esse mecanismo foi então aplicado no contexto clínico, onde rhG-CSF é administrado em seres humanos com o intuito de mobilizar HSCs da medula óssea para o sangue periférico [57].

Além do reconhecimento direto dos patógenos, alterações no compartimento de HSPCs, como ciclo celular e balanço na produção dos diferentes progenitores hematopoiéticos, parecem ser mediados por citocinas pró-inflamatórias produzidas nesse contexto. Na

ativação de LSKs por LPS, demonstrou-se que a combinação de IL-6, TNF e CCL2 foram suficientes para promover a expansão dessa população *in vivo*. Esse efeito, quando prologando, levou a exaustão das HSPCs e defeito na reconstituição da hematopoiese, quando comparado ao controle [58]. Portanto, a cinética de infecção pode produzir efeitos opostos na regulação da hematopoiese. Infecções crônicas por *M. avium* em modelo animal levam a ativação prolongada de HSCs, em mecanismo dependente da sinalização do IFNGR [38]. Embora inicialmente seja observado o aumento em células LSKs, a ativação prolongada resulta em exaustão e perda de plasticidade dessas células, levando a redução em toda série hematopoiética dos camundongos. No contexto de infecções por *Plasmodium berghei*, Furusawa e colaboradores demonstraram que o aumento na produção de neutrófilos, células dendríticas e mastócitos ocorria de forma dependente a via sinalização de IL-27/STAT1/STAT3 nas células LSKs⁺, as quais se diferenciam para progenitores mielóides comum. Utilizando vírus da coriomeningite linfocítica e injeção de poly(I:C), questionou-se o impacto de infecções virais e da subsequente via de sinalização dos IFNs do tipo I, classicamente ativados no contexto de infecção viral.

Contrário ao observado em modelos de infecção bacteriana, a infecção por vírus ou tratamento com poly(I:C) resultou em grande redução no número de progenitores na medula óssea. Esse efeito foi abolido quando a infecção foi feita em camundongos deficientes para o receptor IFNAR1, mas não para IFNGR, indicando o envolvimento dos IFNs- α/β mas não IFN- γ no fenótipo observado [60,61]. O papel dos IFNs- α/β também foi explorado em camundongos deficientes em IRF-2, um supressor da transcrição da sinalização dos IFNs do tipo I. Na ausência de IRF-2, IFN- α induziu a proliferação da população quiescente de HSCs, levando após estimulação crônica ao prejuízo nos mecanismos de auto-renovação e diferenciação [37]. Dessa forma, a

duração do estímulo por IFN- α em HSCs é capaz de promover diferentes desfechos na hematopoiese.

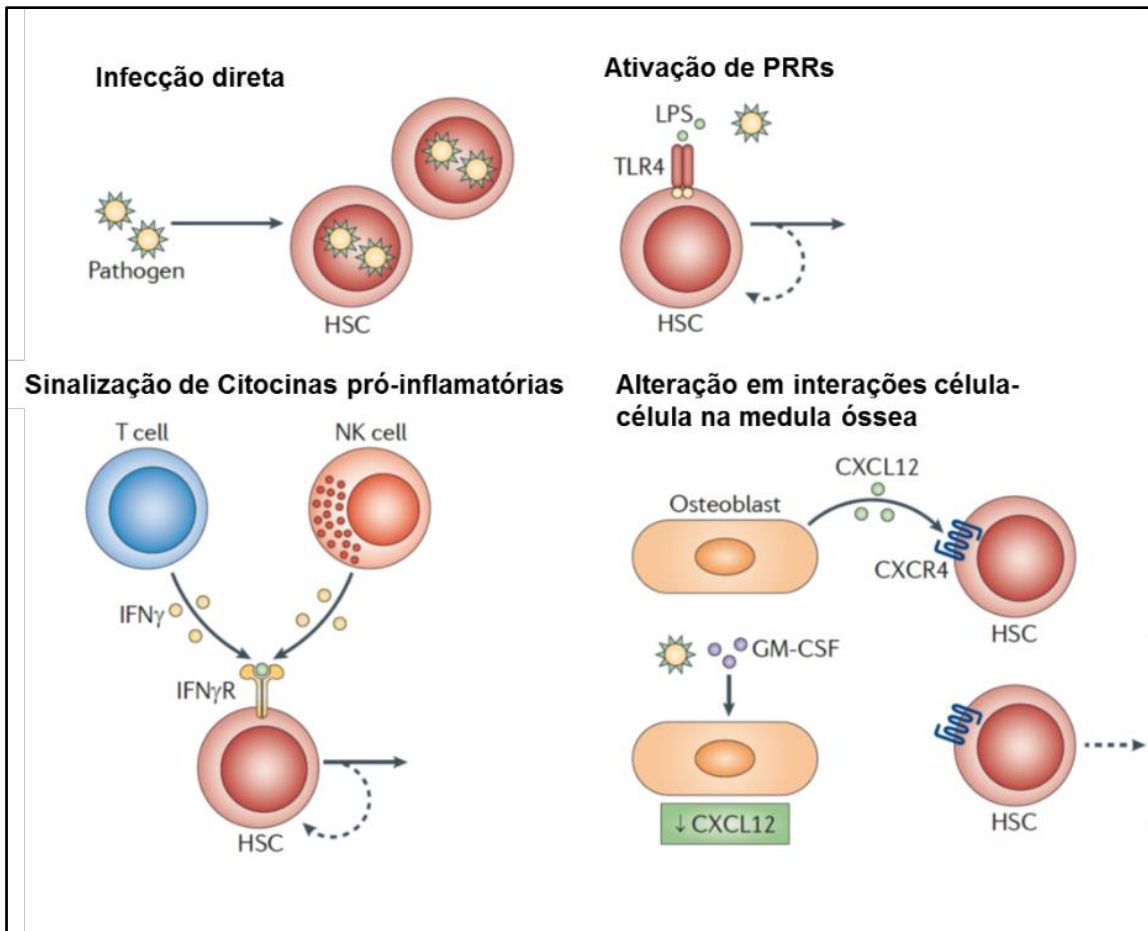


Figura 4 – Diferentes vias de ativação das HSPCs em infecções (Adaptado de King KY and Goodell MA, Nat. Rev. Immunol., 2011). Modificações na resposta de HSCs podem ocorrer como resultado direto da infecção por patógenos, pela ativação dos receptores do reconhecimento de padrões (PRR), através da sinalização de citocinas pró-inflamatórias produzidas durante infecção ou mesmo através de alterações na expressão de quimiocinas e seus respectivos receptores, os quais controlam a permanência de HSCs na medula óssea.

Além da presença de receptores para os IFNs do tipo I e II, progenitores multipotentes e progenitores mielóides expressam altos níveis da cadeia alpha do receptor de IL-6, enquanto não foi detectada a expressão

desse receptor em LT-HSCs e progenitores linfóides [62, 63]. Diversos patógenos possuem a habilidade de rapidamente induzir a produção de IL-6 *in vitro* e *in vivo*, o qual sinaliza via IL-6R α e a subunidade beta transdutora do sinal (gp130), comum a demais citocinas da família do IL-6. A ativação dessa via leva a ativação dos mediadores Janus-Kinase, Tirosina-kinase e subsequente fosforilação do fator de transcrição STAT3 [64]. Também foi observado que a via de sinalização de IL-6R é capaz de promover a fosforilação dos fatores de transcrição STAT1 e ativação de C/EBP β , sendo o último necessário para mielopoiese de emergência em modelo de infecção fúngica [65 – 67]. IL-6 apresenta a habilidade única de sinalizar não apenas em células que expressão IL-6R α na membrana, como também através da forma solúvel do receptor expressado junto a proteína gp130 [68 – 69]. Observou-se que MPPs estimulados com IL-6 diferenciação majoritariamente para a linhagem mielóide, enquanto a produção de células CD19⁺ é inibida [63]. Em modelo de infecção viral, células CD8⁺ ativadas migram para a medula óssea e estimulam a produção de IL-6 em macrófagos e MSCs residentes através de IFN- γ [70]. IL-6 então sinaliza em progenitores multipotentes levando a aumento na mielopoiese. Embora não apresentem IL-

6R α , HSCs produzem IL-6 após ativação da via TLR/NF κ B. Notavelmente, a quantidade de IL-6 produzida por HSPCs nesse sistema foi muito superior quando comparado a células adultas do sistema imune como macrófagos e linfócitos [63]. Em conjunto, pode-se concluir que HSPCs dispõem das ferramentas necessárias para responder diretamente (receptores TLR, RIG-I e cGAS) e indiretamente (Receptores para IFNs do tipo I e II, TNF, IL-6, IL1 β , IL-27, G-CSF) a infecção, onde a ativação das células tronco tem impacto direto no hospedeiro e no agente invasor [71].

Frente a presença e persistência de *Mycobacterium tuberculosis* na medula de seres humanos, primeiramente demonstrada em MSCs e posteriormente em HSPCs circulantes, propomos o conceito que Mtb pode influenciar a hematopoiese humana, através de sua interação com células tronco hematopoiéticas. De fato, alterações em toda a série hematopoética já foram reportadas no sangue e medula de pacientes com tuberculose ativa. Destas, as mais encontradas são a anemia, a pancitopenia e de forma contrastante, a hiper celularidade medular com aumento da atividade mielóide seguida por linfopenia [72-73]. Em estudos do fim da década de 1970 e em trabalhos

publicados recentemente [74-75], observa-se aumento em células da linhagem mielóide no sangue de pacientes com tuberculose ativa, enquanto linfócitos encontram-se diminuídos. Porém, os mecanismos envolvidos na alterações entre séries mielóides/linfóides, como o impacto dessas mudanças na patogênese e disseminação da micobactéria permanecem desconhecidos.

Considerando as dificuldades inerentes em obter amostras dessa natureza, pouquíssimos trabalhos retraram o funcionamento do compartimento da medula óssea durante a infecção por Mtb em humanos. Portanto, não está estabelecido na literatura a ligação entre as alterações na hematopoiese em seres humanos e a infecção por Mtb. Uma possível explicação é que células tronco/progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) são ativadas durante a infecção por Mtb. Considerando o conjunto de evidências apresentado até o momento, o presente trabalho visa compreender como Mtb pode afetar o sistema hematopoiético do hospedeiro pela interação direta com células tronco/progenitoras hematopoiéticas, e como esse processo contribui para a patogênese e disseminação da bactéria em seu hospedeiro.

2 - OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar as relações entre células tronco/progenitores hematopoiéticas humanas e *Mtb*, com o objetivo de caracterizar processos de infecção, diferenciação e produção das células adultas da linhagem hematopoiética.

Objetivos específicos:

- Investigar a susceptibilidade de HSPCs humanas à infecção por *Mtb*
- Analisar o impacto da infecção no comprometimento de progenitores hematopoiéticos
- Caracterizar a produção de células adultas da linhagem mielóide, eritróide e linfóide em HSPCs expostas a *Mtb*
- Investigar os fatores produzidos por HSPCs após exposição a *Mycobacterium tuberculosis*, como sua relevância no fenótipo observado.

3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

As citocinas recombinantes humanas IFN- α 2a, IFN- β 1b, IFN- γ e IL-6 foram obtidos pela empresa Immunotools e utilizadas em diferentes unidades e concentrações indicadas em cada ensaio. Os anticorpos neutralizantes anti- IFNAR2A (PBL[®]), anti-IFN- γ (Immunotools[®]) e anti-IL-6R (Tocilizumab – Roche[®]) humanos foram utilizados nas concentrações de 1, 10 e 1 μ g/mL respectivamente.

3.2 Coleta de sangue periférico humano

Doadores saudáveis que não continham histórico médico de doença e não haviam feito uso de medicamentos até 2 semanas prévia à coleta foram eleitos para participarem do estudo. O sangue periférico foi coletado com sistema *vacutainer*[®] em tubos de 6 ou 10 mL contendo heparina lítica ou em tubo seco de 4 mL para obtenção do soro. O protocolo para utilização das amostras de sangue humano foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos 283/08.

3.3 Obtenção da fração de células mononucleares do sangue periférico humano

O sangue periférico humano coletado em tubos contendo heparina lítica foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e diluído em solução de salina estéril na proporção 1:1. A solução sangue-salina foi lentamente adicionada acima do reagente Ficoll-Paque (GE healthcare), em ângulo de 45° e na proporção 2:1, seguindo recomendações do fabricante. Na sequência os tubos foram centrifugados por 40 min. a 400 x g, 20°C, na ausência de aceleração e freio. Após centrifugação, a fração superior contendo soro foi cuidadosamente removida com pipeta *pasteur* e a fração mononuclear (PBMC) intermediária foi coletada com pipeta *pasteur* e transferida para novo tubo cônico de 50 mL. As células foram lavadas com a adição de salina (Med Flex®), no volume final de 50 mL, e centrifugadas por 10 min. a 400 x g, 20°C. O sobrenadante foi removido por inversão, pellet de células foi ressuspendido em volume residual de salina e as células foram lavadas duas vezes com 20 mL de solução salina por 10 min. a 200 x g, 20°C, para otimizar a remoção de plaquetas. Células foram então suspendidas em meio RPMI 1640 (Life technologies)

suplementado com 1% de soro autólogo inativado, 2mM de L-glutamina (Life Technologies), 1 mM de piruvato de sódio (Life Technologies) e 25 mM de HEPES (Life Technologies) na densidade de 3×10^6 células/mL. O total de 6×10^5 células foram semeadas em placa de 96 poços de fundo chato estéreis (Kasvi) no volume final de 200 μ L por poço. Além da fração mononuclear do sangue periférico, em alguns experimentos foi utilizada a fração de células mononucleares da medula óssea humana (BMMC). Para isso, 3 amostras de aspirado de medula óssea, sem presença de malignidade, foram gentilmente cedidas pela Dra. Joanita Del Moral do HU UFSC. Amostras foram coletadas em tubo contendo heparina lítica e células mononucleares da medula óssea foram obtidos utilizando o reagente Ficoll e o mesmo protocolo para obtenção de PBMCs humana.

3.4 Cultivo de Células tronco/progenitoras hematopoiéticas (CD34⁺) do cordão umbilical humano

As células tronco/progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) foram obtidas pela empresa STEMCELL Technologies – Vancouver, na densidade de 2×10^5 células por criotubo. Células foram rapidamente

descongeladas em banho a 37°C e o conteúdo de células foi rapidamente transferido para tubo cônico de 15 mL com pipeta volumétrica estéril. Células foram lavadas pela lenta adição de volume suficiente para 15 mL da solução PBS estéril (Lonza) a 4°C. Após adição, células em meio de congelamento e PBS foram gentilmente homogeneizados com o uso de pipetador volumétrico. A suspensão de células foi centrifugada a 300 x *g* por 10 minutos, 20°C com aceleração e freio em 5. O sobrenadante foi removido com pipeta volumétrica, em lado oposto ao *pellet* de células. Após remoção completa do sobrenadante, as células foram resuspendidas em meio SFEM II, a 37°C, suplementado com coquetel de citocinas (STEMCELL Technologies) de acordo com instruções do fabricante (*Cytokine cocktail 1x*) na densidade de 5 x 10⁴ células/mL em placa de 12 poços. Após 4 dias de expansão, as células foram lavadas e diluídas em meio SFEM na ausência do coquetel de citocinas para posterior utilização nos experimentos. Nesse tempo, a frequência de células CD34⁺ foi avaliada por citometria de fluxo e demonstrou ser superior à 90% **(Figura 5)**.

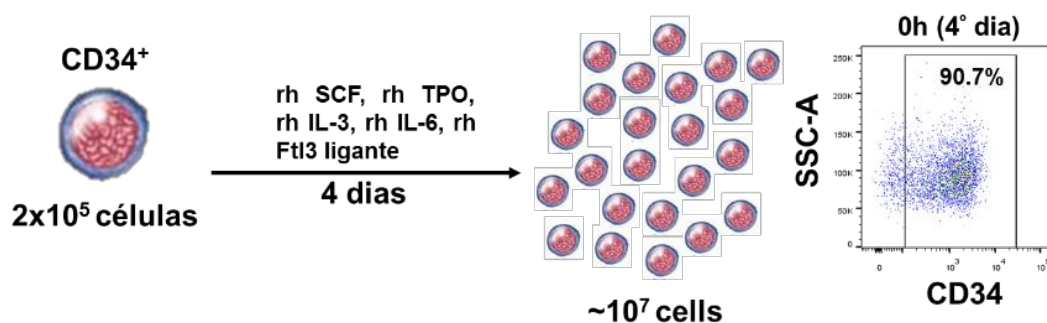


Figura 5 – Protocolo de expansão de CD34⁺ humanas. Vials contendo 2x10⁵ células CD34⁺ foram rapidamente descongelados, células foram lavadas e mantidas no meio SFEM II suplementado com as citocinas: SCF, TPO, IL-3, IL-6 e ligante de FTL3 em concentrações sugeridas pelo fabricante (*Cytokine cocktail 1x*). Após 4 dias, foi observada uma expansão de ~50 vezes na densidade de células. Dot plot representativo mostra a frequência de células CD34⁺ no 4^o dia. Esse tempo foi considerado como o tempo 0h em relação à infecção com Mtb.

3.5 Cultivo de Mtb H37Rv e marcação com corante syto24.

Todos os procedimentos e experimentos envolvendo a cepa laboratorial *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foram realizados em cabine de fluxo laminar nível de biossegurança 3 (BS3), utilizando como proteção individual máscaras N-95 (3M), luvas, toucas e jalecos descartáveis. As culturas de Mtb foram mantidas com repiques semanais provenientes de alíquotas congeladas a -80°C. Após descongelamento, as alíquotas foram diluídas 4 vezes em solução salina estéril e 100 µL da suspensão bacteriana foi adicionado ao meio sólido Löwestein-Jensen (LJ – Laborclin). Culturas

mantidas em incubadora a 37°C foram utilizadas dentro do período de 4 a 6 semanas. Prévio ao uso, uma suspensão bacteriana foi preparada a partir da coleta de colônia crescidas no meio LJ e ruptura em solução salina estéril utilizando esferas de vidro. A concentração bacteriana foi determinada por comparação com escala 1 de McFarland, correspondente a 3×10^8 bactérias/mL. Para experimentos de infecção *in vitro*, a escala 1 McFarland foi diluída em meio de cultivo humano (RPMI para PBMC/BMMC e SFEM II sem citocinas para células CD34⁺) na desejada multiplicidade de infecção (MOI). Em cada experimento a solução bacteriana foi plaqueada em meio Middlebrook 7H10 (BD Biosciences) suplementado com 10% do complexo Ácido oléico – Albumina – Dextrose (OADC) e incubado a 37°C para confirmar a quantidade de bactéria utilizada no experimento. Em alguns experimentos a cepa H37Rv foi incubada com o corante Syto24 (Thermo[®]) para detecção de Mtb fluorescente. Brevemente, 500 nM de Syto24 foram adicionados a 1 mL de escala McFarland 1 e incubado a 37°C por 60 minutos. Posteriormente a solução bacteriana foi centrifugada a 12.000 x g por 20 min. 20°C, o sobrenadante foi descartado com pipeta e 1 mL de solução salina foi adicionado para remoção do excesso

do corante. A suspensão bacteriana foi novamente centrifugada a $12.00 \times g$ por 20 min, 20°C e ressuspendidas em respectivo meio de cultivo humano.

3.6 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia de *Mycobacterium tuberculosis* (UFC)

Em diferentes períodos de infecção *in vitro*, células CD34^{+} foram coletadas da placa por jateamento e transferidas para tubo cônico de 1,5 mL. A suspensão de células e bactéria foi então centrifugada a $400 \times g$ por 10 minutos a 20°C . Os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C e as células foram lavadas uma vez com solução salina estéril. Após a lavagem, o sobrenadante foi removido e as células foram lisadas com 200 uL de solução 0,05% de Tween 80 (Vetec) em salina estéril. Os lisados celulares foram diluídos em diferentes concentrações (10^{-1} a 10^{-5}) e o volume de 50 uL foi semeado em placa de meio Middlebrook 7H10 suplementado com com 10% do complexo Ácido oléico – Albumina – Dextrose (OADC) e incubado a 37°C . As placas foram vedadas com parafilme e mantidas invertidas por 24 horas. Após esse tempo, placas foram viradas, colocando a superfície com ágar voltada para cima. Após 28 dias, unidades formadoras de colônia

(UFC) foram contadas e o resultado foi expresso graficamente como CFU/mL.

3.7 Determinação de Mtb em HSPCs por coloração de *Kinyoun*

Em diferentes tempos após a infecção, as células CD34⁺ foram lavadas e fixadas com solução de paraformaldeído (PFA) 2% e mantidas *overnight* a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com água ultrapura (Miliq) e aderidas em lâminas por centrifugação *cytospin* (2000 RPM, 10 min.). Após a secagem das lâminas, amostras foram tratadas por 5 minutos com metanol (Vetec[®]), lavadas com água ultrapura e coradas com solução carbol-fuscina (Sigma[®]) por 2 minutos. As amostras foram lavadas uma vez com água ultrapura e contracoradas com o corante azul de metileno (Sigma[®]) por 30 segundos. As lâminas foram lavadas mais uma vez e lamínulas foram então fixadas através do meio de montagem Permount (Sigma[®]) e examinadas em microscópio Olympus BX40 utilizando a câmera Olympus DP72.

3.8 Determinação de Mtb em HSPCs por microscopia de fluorescência.

A suspensão de Mtb marcada com o corante Syto24 (Thermo) foi obtida conforme a seção métodos **x5**. Brevemente, após 4 dias de expansão, 1×10^5 células CD34⁺ foram semeadas em placa de 24 poços no volume final de 500 μ L e infectadas com Mtb Syto24 no MOI 3:1 (3 bactérias para uma célula), por 4 horas. Posteriormente, células foram lavadas com solução salina estéril, fixadas com PFA 2% e aderidas à lamínula por centrifugação *cytopspin* (2000 RPM, 10 min.). Para visualização do núcleo, as células foram marcadas com o corante Hoeschst 33342 1 μ g/mL (Immunochemistry technologies[®]) por uma hora. As células foram lavadas uma vez com água miliq e montadas para análise no microscópio confocal DMI6000 B (Leica[®]).

3.9 Determinação do conteúdo de proteínas por *Immunoblotting*

As células CD34⁺ foram semeadas na densidade de 3×10^5 em placa de 24 poços no volume final de 500 μ L e infectadas com Mtb no MOI 3. Após 5 dias de infecção, células foram centrifugadas em 450 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi armazenado a -20°C e

as células foram resuspendidas em tampão de lise M-PER (Thermo Fisher Scientific) contendo inibidor de protease (Complete Mini Protease Inhibitor tablets, Roche), em concentrações sugeridas pelo fabricante. As células foram gentilmente resuspendidas em tampão M-PER completo com o uso de uma pipeta volumétrica e mantidas a 4°C por 40 minutos. A suspensão celular foi então centrifugada a 12.000 x *g*, 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico. As proteínas foram então quantificadas através do Kit *Pierce BCA Protein assay*, seguindo protocolo do fabricante. Para o *immunoblot*, 15 µg de proteínas totais foram separadas em gel *precast* de acordo com as instruções do fabricante e transferidas para membrana de difluoreto de polivinildina 0.22 µm. A membrana foi bloqueada por 1 hora com solução 5% BSA em TBST (Tampão Tris com Tween 20 0.1%) (p/v) e subsequentemente lavada três vezes com TBST, 5 minutos cada lavagem. As membranas foram então incubadas em anticorpo primário diluído em BSA 1% (p/v), 0,1% Tween 20 em TBS, sob agitação branda a 4°C *overnight*. Os anticorpos primários utilizados foram: pSTAT1 Y701 1:1000 (M135 – Abcam), STAT1 1:1000 (SM1 – Abcam), C/EBP β 1:250 (sc-150 – Santa Cruz) e

β -Actina 1:5000 (mAbcam 8226 – Abcam). As membranas foram posteriormente lavadas três vezes com TBST e incubadas com o respectivo anticorpo secundário conjugado a HRP 1:10000 (*Horseradish peroxidase*) por 2 horas a temperatura ambiente. Membranas foram então lavadas três vezes com TBST e duas vezes com TBS. A quimioluminescência foi observada frente a adição do substrato ECL (Pierce) e fotodocumentada nos tempos de 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos e 10 minutos. Filmes foram digitalizados e passados para escala preto e branco pelo *software* ImageJ.

3.10 Reação de PCR em tempo real

O RNA total foi extraído de HSPCs infectadas ou não com Mtb nos tempos de 1, 3 e 5 dias de cultura. A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Thermo) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA em cada amostra foi estimada pela leitura de absorvância em 260 nm e 1 μ g de RNA foi aplicado para a reação de transcriptase reversa, utilizando o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Dois microlitros do produto da reação de transcrição reversa

foi diluído 1:8 em água ultrapura estéril *nuclease-free* (Lonza) e utilizado para a reação de PCR quantitativa em tempo real na presença do corante *SyBrGreen* (Applied Biosystems) e dos seguintes iniciadores humanos: *Ilf6* F: 5'- CCACACAGACAGCCACTCAC -3', R: 5'- AGGTTGTTTTCT GCCAGTGC-3'. *Ilf16* F: 5' - ACTGAGTACAACAAAGCCATTTGA - 3', R: 5' - TTGTGACATTGTCCTGTCCCCAC - 3'. *Mx1* F: 5' - ATCCTGGGATTTTGGGGCTT - 3', R: 5' - CCGCTTGTCGCTGGTGTCTG - 3'. *Isg15* F: 5' - TCCTGGTGAGGAATAACAAGGG - 3', R: 5' - CTCAGCCAGAACAGGTCGTC - 3'. *18s* F: 5' - TAGAGGGACAAGTGGCGTTC - 3', R: 5' - CGCTGAGCCAGTCAGTGT - 3'. *Hprt* F: 5' - CCTGCTGGATTACAT CAAAGCACTG - 3', R: 5' - TCCAACACTTCGTGGGGTCTCCT - 3'. Os resultados foram expressos como expressão relativa de cada gene, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e comparando aos controles endógenos 18s e HPRT e células controle não infectadas em respectivos tempos de cultura.

3.11 Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A dosagem da citocina IL-6 (eBioscience) foi feita a partir do sobrenadante de HSPCs expostas a Mtb ou na presença de meio de cultura (grupo controle). A detecção ocorreu por ELISA direto. Resumidamente, placa de 96 poços Nunc Maxisorp foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura, diluído em *coating buffer*, por 16 horas a 4°C, de acordo com instruções do fabricante. Após incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 300 µL de tampão de lavagem PBST (0,05% Tween 20 em PBS filtrado a 0.45 µm). O bloqueio foi realizado com 200 µL de tampão de bloqueio fornecido pelo fabricante por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados conforme passo anterior e incubados com 100 uL de sobrenadante diluído 1:200. Em paralelo, os poços receberam concentrações crescentes de *rhIL-6* para criação da curva-padrão. Amostras e curva-padrão foram incubados por 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados e receberam 100 µL do anticorpo de detecção diluído em *assay diluent* conforme recomendações do fabricante. As placas foram vedadas, incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e lavadas novamente. Na

sequência foram adicionados 100 μL de streptavidina conjugada a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) pelo período de 30 minutos. Após incubação, foram feitas 5 lavagens com PBST e adicionado o substrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). A reação colorimétrica ocorreu no período de 10 minutos, protegido da luz e a temperatura ambiente. Após o desenvolvimento de coloração amarela, 50 μL da solução de parada contendo H_2SO_4 2N foram rapidamente adicionados aos poços e a leitura foi realizada no equipamento SpectraMax, utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Valores da curva padrão foram utilizados para regressão linear e obtenção da equação da reta, através do software GraphPad Prism 6. Os valores de absorbância das amostras foram interpolados na equação e a concentração em $\mu\text{g/mL}$ foi determinada no gráfico.

3.12 Quantificação de LDH no sobrenadante de HSPCs expostas a Mtb

Sobrenadante das culturas de HSPCs foram coletados em diferentes tempos após infecção e armazenados a -20°C até o momento da análise. Para a quantificação de LDH no sobrenadante, foi utilizado o reagente *CytoTox-ONE*, de acordo com as instruções do

fabricante. Trinta minutos após a incubação, foi adicionada a solução de parada do kit e a leitura foi realizada no equipamento SpectraMax, utilizando o comprimento de onda 590 nm. Valores de absorbância foram utilizados para estimar a quantidade de LDH no sobrenadante.

3.13 Inibição da sinalização de IFNAR2, IFN γ e IL-6R em HSPCs

HSPCs humanas submetidas ao protocolo de expansão descrito no item 3.4 foram tratadas ou com anticorpo neutralizante anti-IFNAR2 (PBL) na concentração de 1 μ g/mL, anti-IFN- γ (Immunotools) na concentração de 10 μ g/mL ou anti-IL-6R (Tocilizumab, Roche) na concentração de 1 μ g/mL. Os três tratamentos foram feitos com 2 horas de antecedência à infecção das células. Como controle da inibição, PBMC humano foi isolado, deixado em estufa a 37°C 5% CO₂ *overnight* e posteriormente tratado com anti-IFNAR2, anti-IFN- γ ou anti-IL-6R nas devidas concentrações mencionadas anteriormente. Para a via do IFNAR2A, células tratadas com o anticorpo receberam a citocina IFN α 2a (Immunotools) na concentração de 100 U/mL; em paralelo PBMCs receberam IFN α 2a na ausência do

anticorpo neutralizante. Após 30 minutos de estímulo em banho-maria a 37°C, as células foram fixadas com PFA 2% e marcadas com anticorpo anti-pSTAT1 Y701 (clone 4a) de acordo com instruções do fabricante (descrito no item 3.14). A frequência de células positivas para pSTAT1 Y701 foi avaliada por citometria de fluxo (**Figura 27**). Para avaliar a inibição da via do IFN- γ , PBMC foi tratado com IFN- γ 100 U/mL por 24 horas, na ausência ou presença do anticorpo neutralizante respectivo. A expressão de CD38 e CD64, genes estimulados por IFN- γ em monócitos humanos [76, 77] foram avaliadas em eventos CD14⁺ (**Figura 28**). Para a via do receptor de IL-6, PBMC foi tratado com IL-6 na concentração de 50 ng/mL por 24 horas, na presença ou ausência do anticorpo neutralizante tocilizumab. A expressão de TLR2, molécula regulada por IL-6 em monocitos humanos, foi avaliada por citometria de fluxo em eventos CD14⁺ (**Figura 29**).

3.14 Citometria de Fluxo

PBMCs foram semeadas na densidade de $2,5 \times 10^6$ células/mL em placa de 96 poços e volume final de 200 μ L. Células foram mantidas por 4 horas à 37°C em estufa contendo 5% de saturação de CO₂ prévia

exposição à micobactéria. Após 4 horas, células foram infectadas com Mtb no MOI 3 em diferentes tempos. Células foram coletadas da placa através de pipetagem vigorosa, centrifugadas por 450 *x g*, 10 minutos e lavadas duas vezes com solução salina. Amostras foram então marcadas com o corante fixável de viabilidade celular FVS v450 (BD Biosciences) na concentração 1:1000 por 15 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Terminado o tempo de incubação, células foram lavadas com tampão FACS (Solução BSA 1% e azida sódica 0,1% em PBS) e incubadas com 10% de soro humano AB por 15 minutos à 4°C. Os seguintes anticorpos foram então utilizados em diferentes combinações indicadas em cada figura:

Marcação de HSPCs em PBMC humano: anti-Lin1 - FITC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20,CD56), anti-CD34 - PE (clone 581), anti-CD34 – FITC (clone 8G12), anti-CD34 – PerCP (clone 581) , anti-HLA-DR PE-Cy7 (clone L243), anti-HLA-DR – Bv510 (clone G46-6), anti-CD38 - APC (clone HIT2), anti-CD4 APC-Cy7 (clone GK1.5), anti-CD64 - Bv421 (clone 10.1), anti-CD10 – FITC (clone HI10A), anti-CD14 – V450 (clone MφP-9), anti-CD14 - Alexa488 (clone 63D3) foram adicionados em concentrações previamente tituladas e incubados por 40

minutos à 4°C. Para a marcação de pSTAT1 Y701 (clone 4 a), células foram fixadas com reagente FIX/PERM (BD) e permeabilizadas com reagente Perm III (BD) de acordo com protocolo III disponibilizado em: https://www.cytobank.org/facselect/downloads/Phosflow_Protocol_for_Human_PBMCs.pdf

Marcação de CD34⁺ provenientes de CB humano: anti-CD34 – PE (clone 581), anti-CD11b (clone M1/70), anti-CD4 – APC-Cy7 (clone GK1.5), anti-CD64 – Bv421 (clone 10.1), anti-CD14 – V450 (clone MφP-9), anti-CD14 – Alexa488 (clone 63D3), anti-CD66b – PE (clone G10F5), anti-BDCA1 – APC-Cy7 (clone L161), anti-CD41a – FITC (clone HIP8), anti-BDCA2 - APC (clone 201A), anti-BDCA3 – Bv510 (clone 1A4), anti-Clec9A – A700 (clone FAB6049P), anti-CD123 – PE (clone 5B11), anti-CD16 – APC (clone 3G8) foram adicionados em concentrações previamente tituladas e incubados por 40 minutos à 4°C.

Todas as amostras foram então lavadas com tampão FACS e ressuspendidas em PFA 2%. Eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACS Verse com o *software* FACSuite (BD Bioscience). A análise dos dados de citometria foram feitas no *software* Flowjo v. 10.1 (TreeStar).

3.15 Análise do transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb

RNA total obtido de células CD34⁺ expostas a Mtb, conforme descrito no item x10, foi enriquecido para mRNA por seleção de fitas com calda poli-A e o sequenciamento do mRNA foi feito na plataforma *Illumina Miseq*, localizada no *Nucleomics Core* da Universidade Católica de Leuven (Bélgica). Adaptadores e leituras do sequenciamento Illumina com scores de qualidade *Phred* menores que 20 foram removidos utilizando o software *Trimmomatic* (0.36). Leituras ordenadas (*Trimmed reads*) foram alinhadas ao genoma de referência (hg38 – UCSC) utilizando o software *STAR* (2.6.0c). Leituras do alinhamento foram mapeadas contra o genoma hg38 utilizando a ferramenta *featureCounts* do pacote de subleitura (1.6.1). Genes com leituras inferiores a 3 foram removidos. A metodologia baseada em modelo binomial negativo *edgeR* (3.10.0) foi utilizada para análise de expressão diferencial. Para calcular os fatores de normalização entre amostras foram utilizados os parâmetros *library-based*, TMM e *ComBat*. T-fit e e-fit com *False discovery rates* menores que 0.05 (para teste

T) foram utilizados para definir o conjunto de genes diferencialmente expressos (DEGs) [78, 79].

3.16 Processamento dos dados e Análise estatística

Dados obtidos nos experimentos foi processado utilizados o *software* GraphPad Prisma 6 e analisados utilizando test T não pareado, ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias dependendo do desenho experimental. Significância estatística foi expressa da seguinte forma: $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$. Barras representam média e erro representa o erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 *Mycobacterium tuberculosis* infecta células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas (CD34⁺)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) é um patógeno exclusivo humano, o qual apresenta a capacidade de infectar múltiplos tipos celulares de diferentes ontogênias [20]. Nesse contexto, Das e colaboradores demonstraram que células tronco mesenquimais (MSCs), presentes na medula óssea humana, são infectadas por Mtb. Considerando a presença de Mtb em MSCs na medula óssea humana, foi levantada a hipótese que células tronco hematopoiéticas são infectáveis por Mtb. Para abordar a hipótese experimentalmente, PBMCs de doadores saudáveis foram isolados e posteriormente expostos à cepa laboratorial H37Rv, marcada com o corante Syto24, o qual torna a bactéria fluorescente no canal FL-1 do citômetro (**Figura 6a**). Após 4h de exposição a Mtb (MOI 3), experimentos de citometria de fluxo (**Figura 6b**) demonstraram que eventos Lin⁻CD34⁺ estavam associados a Mtb fluorescente (69%±z (**Figura 6c e 6d**)). Como controle, foi avaliada a associação de Mtb (79%±z (figura 5d) com monócitos humanos (CD14⁺), os

quais já foram caracterizados como células infectáveis por Mtb [80, 81]. Além da análise de frequência, foi utilizado o parâmetro mediana de intensidade de fluorescência (MFI), como uma forma de estimar a quantidade de bactérias associada por tipo celular. Foi observado que no tempo de 4h, os valores de MFI para syto24 foram em média oito vezes menores nas HSPCs quando comparado ao resultado encontrado nos monócitos (**figura 6e**). Esses resultados sugerem que enquanto HSPCs são permissivas a infecção por Mtb *in vitro*, apenas uma pequena quantidade de bactérias se associa a essa população, quando comparada a células fagocíticas profissionais como os monócitos.

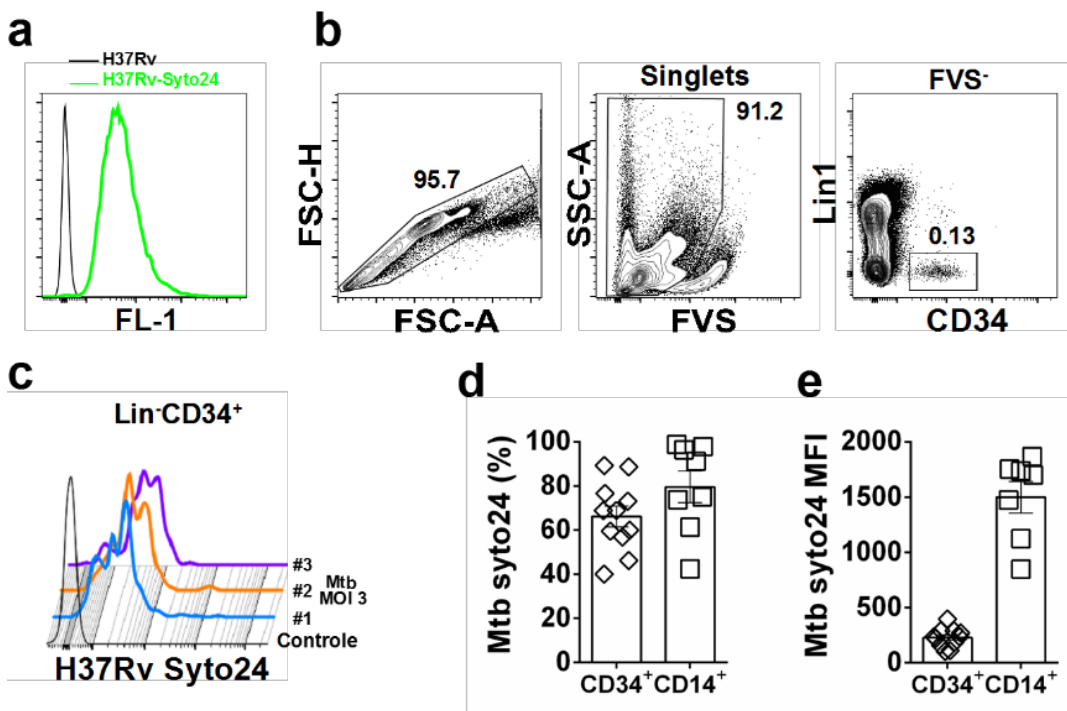


Figura 6– *Mycobacterium tuberculosis* se associa a células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas. (a) Histograma representativo mostrando a fluorescência emitida por Mtb marcada

com o corante Syto24 no canal FL-1. **(b)** *Countour plots* representativos demonstram a estratégia utilizada para analisar a associação de Mtb a HSPCs humanas. Após exclusão de dupletos e células não viáveis (FVS⁺), HSPCs foram selecionadas como eventos Lin1-CD34⁺. **(c)** Histograma ilustra a associação de Mtb a HSPCs. Linha preta: Controle não infectado. Linha azul, laranja e roxa representam 3 diferentes doadores expostos a MtbSyto24, MOI 3. **(d)** Gráfico de barras mostra a frequência de HSPCs (CD34⁺) e monócitos (CD14⁺) associados a Mtb e **(e)** a mediana de intensidade de fluorescência para syto24 nas respectivas populações. Cada símbolo representa um doador de PBMC. Barras representam média e erro representam EPM. Dados somados de 3 experimentos independentes, n: 9-11.

Os dados apresentados na Figura 5 sugerem que células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas são permissivas a infecção por Mtb. No entanto, a abordagem experimental utilizada não permite distinguir a localização da bactéria nas HSPCs. Foi demonstrado em células fagocíticas que a ligação do patógeno a membrana da célula e a internalização da bactéria desencadeiam diferentes respostas celulares associadas com a produção de citocinas e mecanismo de morte celular [82]. Para responder se HSPCs humanas são infectadas por Mtb, utilizamos a cultura de CD34⁺ purificadas, derivadas do cordão umbilical humano. Após 4 dias de expansão (métodos 3.4), HSPCs foram expostas a Mtb Syto24 no MOI 3, por 4h. As células foram lavadas, fixadas e aderidas à lamínula por centrifugação

cytopsin. Lâmina foi marcada com o corante Hoescht 33342 para visualização do núcleo e analisada por microscopia confocal. Observamos a colocação de Mtb Syto24 com o núcleo das HSPCs, sugerindo que HSPCs humanas são permissíveis a infecção por Mtb *in vitro* (Figura 7).

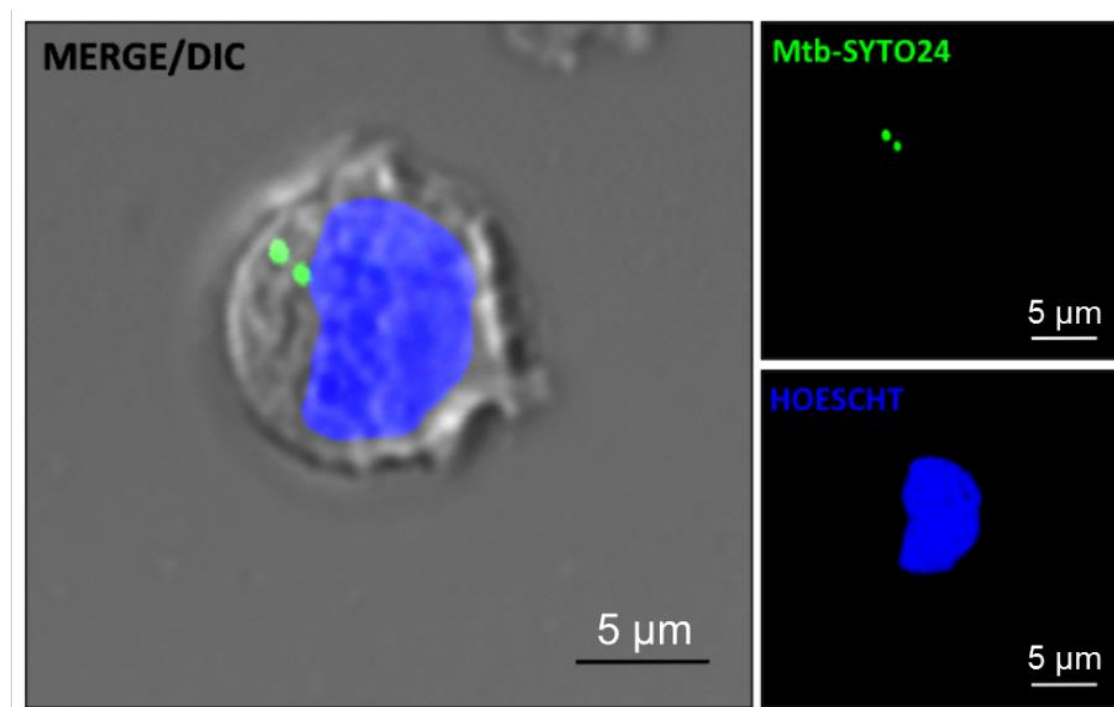


Figura 7 – *Mycobacterium tuberculosis* infecta HSPCs humanas *in vitro*. Células CD34+ purificadas de cordão umbilical humano foram expostas a Mtb Syto24, no MOI 3, por 4h. A suspensão celular foi fixada com PFA 2%, aderida à laminula por *cytopsin* e contracorada com Hoescht 33342. Imagens foram obtidas por microscopia confocal. Dados representativos de 3 experimentos independentes, n: 2. Escala: 5 µm.

Em conjunto, os dados obtidos nas análises de PBMC e células CD34+ purificadas de cordão umbilical (CB) humano demonstram que células tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas são

permissivas à infecção por Mtb *in vitro*.

4.2 *Mycobacterium tuberculosis* prolifera na cultura de células CD34⁺ humanas.

Ao longo de sua evolução no hospedeiro humano, Mtb desenvolveu inúmeras estratégias de resistência e subversão do sistema imune, permitindo sua sobrevivência e propagação em nossa espécie. Exemplos dessas estratégias incluem a inibição da maturação do fagossomo em macrófagos [83], a diminuição na eficiência de células dendríticas em apresentarem antígeno [84] e a capacidade de infectar células com propriedades evasivas ao sistema imune [24, 25]. Frente aos diversos mecanismos de evasão/propagação de Mtb e os dados apresentados nas Figuras 6 e 7, os quais ilustram que HSPCs são infectadas por Mtb, investigamos se essa população apresenta um nicho favorece seu crescimento. Para isso, células CD34⁺ purificadas foram expostas a Mtb MOI 3 por 4h, 1, 3, 5 e 7 dias. Em cada um desses tempos, células foram lavadas e lisadas para quantificação das bactérias intracelulares. Após 28 dias, unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) foram

enumeradas e representadas graficamente. Observou-se semelhantes quantidades de bactérias nos tempos iniciais de 1 e 3 dias, quando comparadas a quantidade inicial avaliada em 4h (**Figura 8**). No entanto, nos tempos de 5 e 7 dias, visualizou-se um aumento expressivo, de aproximadamente 2 logs, na quantidade de bactérias detectadas na cultura de CD34⁺ (**Figura 8**).

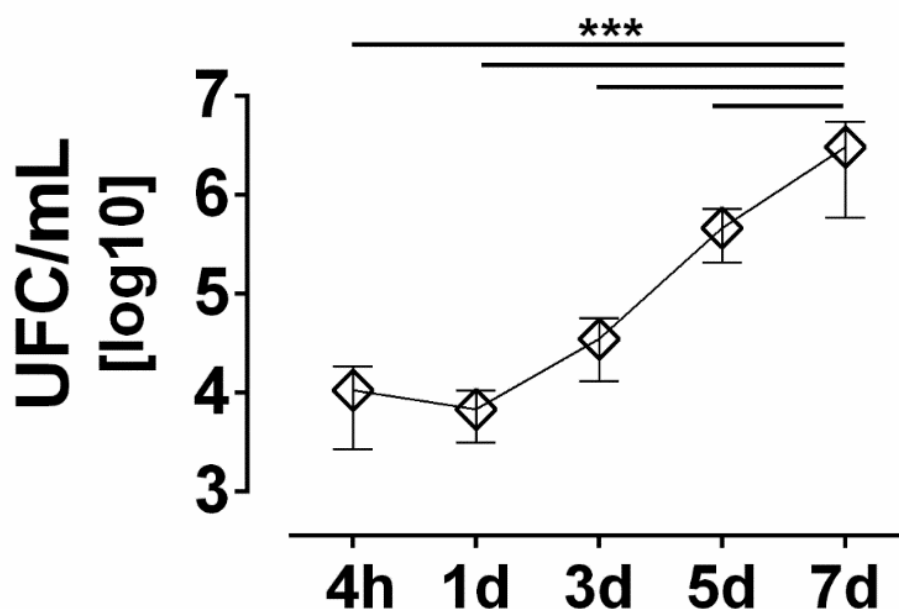


Figura 8 – *Mycobacterium tuberculosis* prolifera na cultura de HSPCs humanas. Contagem de UFC/mL em meio 7H10 após 28 dias de crescimento. Resultado representativo de 6 experimentos independentes, n:5. Análise estatística: Anova de uma via seguido do pós-teste de Tukey. *** $p \leq 0,001$.

Paralelo ao experimento de crescimento em meio 7H10, células CD34⁺ expostas a Mtb nos tempos de 1, 5 e 10 dias foram coletadas, aderidas à lamínula e submetidas a coloração de *Kinyoun* (Métodos 3.7). Essa

coloração permite a visualização do bacilo álcool-ácido resistente, corado com carbol-fuscina, e das células eucarióticas coradas com azul de metileno, sem a necessidade do emprego de calor o qual pode comprometer a morfologia das células. Corroborando os dados apresentados na figura 8, observou-se o expressivo aumento na densidade de bacilos nos tempos de 10 e 5 dias, quando comparados ao tempo de 4h (Figura 9).

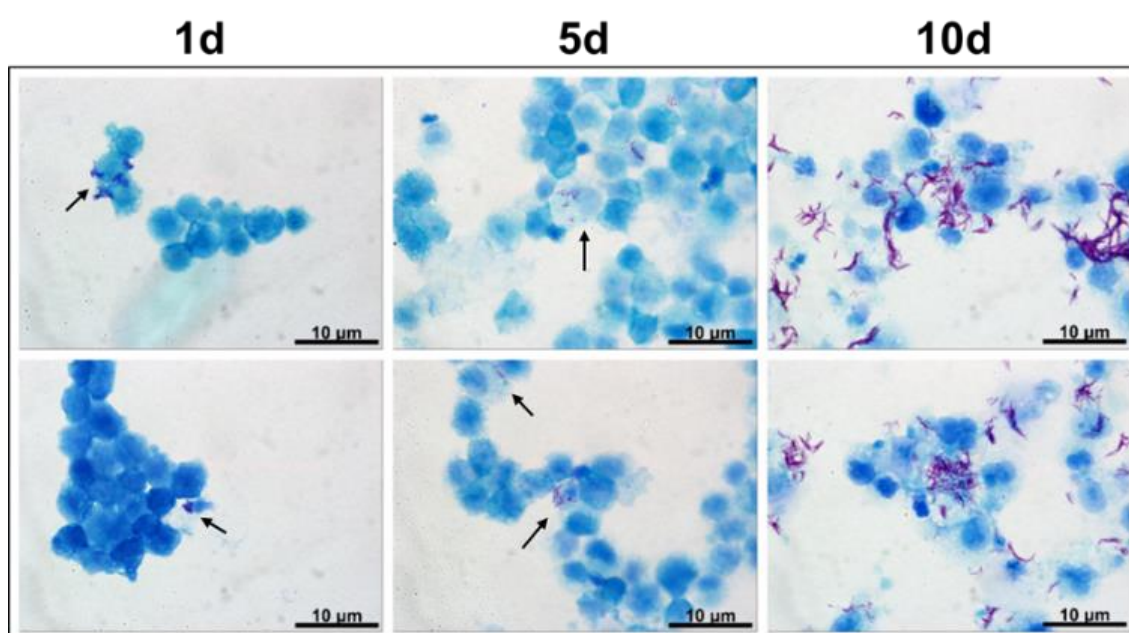


Figura 9 – Proliferação de *Mycobacterium tuberculosis* observada por coloração de *Kinyoun* em HSPCs humanas. Lâminas de células CD34+ purificadas expostas a Mtb no MOI 3 pelos tempos de 1, 5 e 10 dias de infecção. Setas apontam bacilos associados às células. Dados representativos de 3 experimentos independentes, n:3. Escala: 10 µm.

Conclui-se, no conjunto de dados apresentados previamente, que HSPCs humanas são infectadas por Mtb e que esse sistema promove a proliferação da bactéria *in vitro*.

4.3 *Mycobacterium tuberculosis* induz aumento na expressão de marcadores mielóides em HSPCs do PBMC humano

Considerando o sucesso de Mtb em infectar e proliferar nas HSPCs humanas, investigou-se se estes eventos são capazes de influenciar a diferenciação dessa população. O potencial em gerar células da linhagem eritróide, mielóide e linfóide é uma das características fundamentais das HSPCs. Mudanças no equilíbrio de produção dessas populações estão diretamente relacionadas à eficiente resposta do sistema imune do hospedeiro [71]. Pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentam alterações em toda série hematopoiética, sendo encontrado na medula óssea em maior frequência hiperplasia, diminuição da função eritróide, linfopenia e aumento na atividade mielóide [72]. Além das alterações na medula óssea, o sangue periférico de pacientes com tuberculose apresenta níveis elevados de monócitos e redução de linfócitos, apenas na fase ativa da doença [75]. Dessa forma, hipotetizou-se que as alterações na série hematopoiética são resultado da ativação de HSPCs por Mtb, direcionando seu respectivo comprometimento para a linhagem mielóide.

A fim de responder se a infecção influencia a diferenciação de HSPCs, PBMC de doadores saudáveis foram expostos a Mtb no MOI 3 pelos períodos de 24, 72 e 144h. Em cada tempo, células foram lavadas e marcadas com anticorpo anti-Lin1 e anti-CD34, para identificação de HSPCs humanas conforme ilustrado na **figura 6b**. Foi observado, nesse sistema, que a frequência de células CD34⁺ diminuiu de forma semelhante na cultura entre os grupos controle e expostos a Mtb (**Figura 10b**), sugerindo que a infecção não promove a expansão de HSPCs do sangue periférico humano. Além da frequência de HSPCs, avaliou-se nessa população, por citometria de fluxo, a expressão de CD38 (ADP ribosil ciclase), molécula que tem sua expressão aumentada ao longo do processo de diferenciação para as diferentes linhagens [85]. Além de células não-infectadas, utilizou-se como controle PBMCs expostos à bactéria inativada pelo calor (*Heat-killed* - HK Mtb), a fim de se avaliar se apenas o reconhecimento de PAMPs da micobactéria, presentes na preparação de Mtb mortas pelo calor, são suficientes para ativar as HSPCs. Observou-se que a exposição a Mtb viva, mas não a

inativada pelo calor, induziu o aumento na expressão de CD38 nos tempos de 72 e 144h (**Figura 10c**).

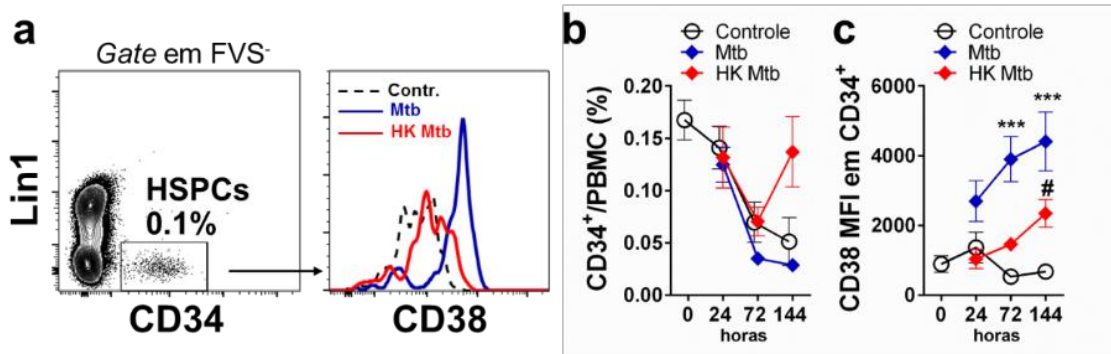


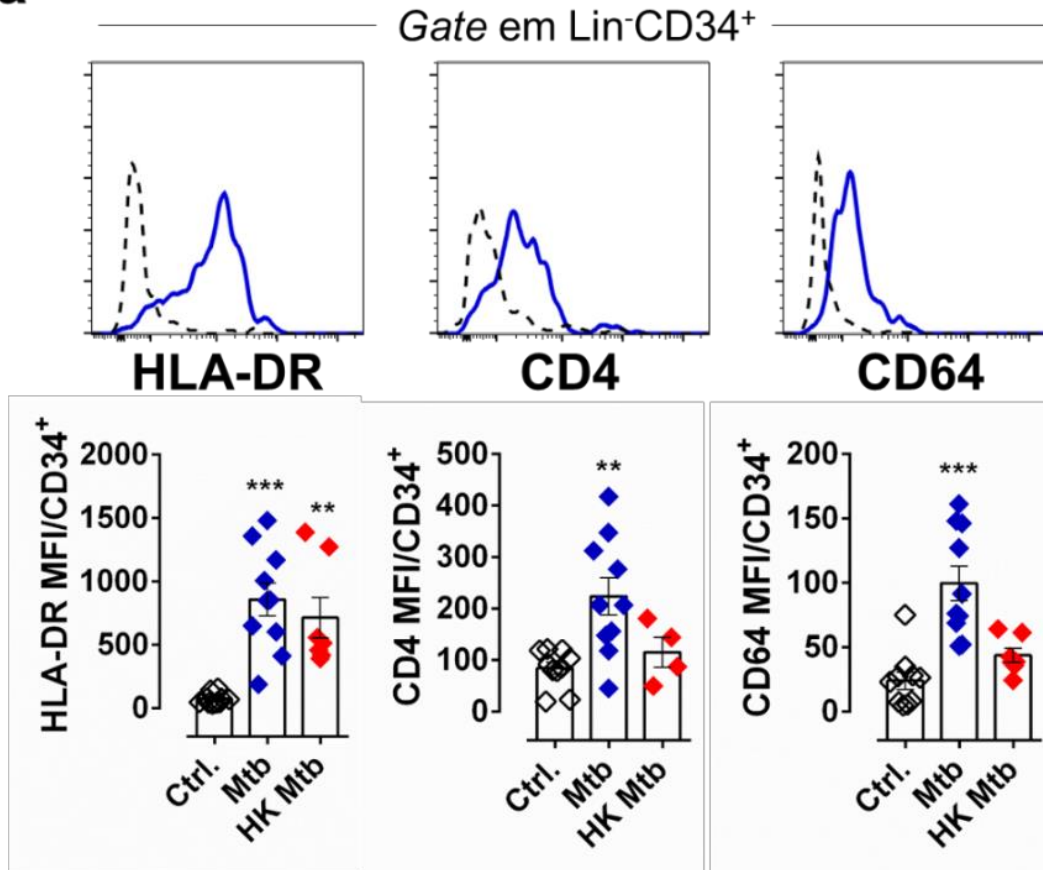
Figura 10 – *Mycobacterium tuberculosis* induz o aumento da expressão de CD38 em HSPCs humanas. (a) Histograma representativo de um doador mostra a expressão de CD38 em HSPCs expostas a Mtb, HK Mtb ou grupo controle, no tempo de 72h. Linha tracejada: Controle não infectado; Linha vermelho: Expostos a HK Mtb MOI 3; Linha azul: Expostos a Mtb MOI 3. (b) Gráficos em linha representam a frequência de células CD34⁺ por PBMC e (c) o MFI para CD38 nas células Lin⁻CD34⁺. Dado representativo de 5 experimentos independentes, n: 10 por experimento. Símbolos representam média e erro representa EPM. Estatística: Anova de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. ***p≤0,001 em relação ao controle não infectado no respectivo tempo. #p≤0,05 em relação ao controle não infectado no respectivo tempo.

Considerando o aumento na expressão de CD38 em Lin⁻CD34⁺ após infecção, sugeriu-se que a exposição a micobactéria viva promove a diferenciação das HSPCs. Enquanto esse resultado suporta a hipótese que Mtb promove o comprometimento de HSPCs, a identidade dos progenitores gerados após infecção permanece desconhecida. A fim de responder se a infecção direciona o comprometimento para linhagem mielóide, analisou-se nas HSPCs, por citometria de fluxo, a expressão dos

antígenos HLA-DR, CD4 e CD64, os quais estão mais expressos em progenitores de origem mielóide [86 – 88]. Como controle, foi analisada a expressão de CD10, antígeno presente em progenitores da linhagem linfóide [89]. Dessa forma, PBMC de doadores saudáveis foram expostos a Mtb no MOI 3 pelo período de 72h, tempo no qual foi observado aumento significativo na expressão de CD38 nas células CD34⁺ (**Figura 10b**). Foi observado que a infecção promoveu o aumento na expressão de HLA-DR, CD4 e CD64 em células Lin⁻CD34⁺ após 72h de infecção (**Figura 11a**). Quando comparado ao grupo exposto a HK Mtb, apenas a expressão de HLA-DR foi induzida, comparado-se ao controle não estimulado (**Figura 11a**). Além dos valores de expressão individuais (MFI), notou-se o aumento em eventos CD4⁺CD64⁺ dentro da população que expressa altos níveis de CD38 e HLA-DR. Esse fenótipo foi observado nos grupos expostos a Mtb ou HK Mtb, em maior magnitude no infectado com a bactéria viva (**Figura 11b**). Não foi observada diferença na expressão de CD10 entre o grupo controle e o exposto a micobactéria (**Figura 30**).

Esse conjunto de resultados sugere que a infecção por Mtb promove a ativação de HSPCs e seu respectivo comprometimento para progenitores da linhagem

mielóide. Esse fenótipo depende parcialmente da atividade da bactéria viva, sendo possível então o envolvimento de PAMPs de Mtb na ativação de HSPCs.

a

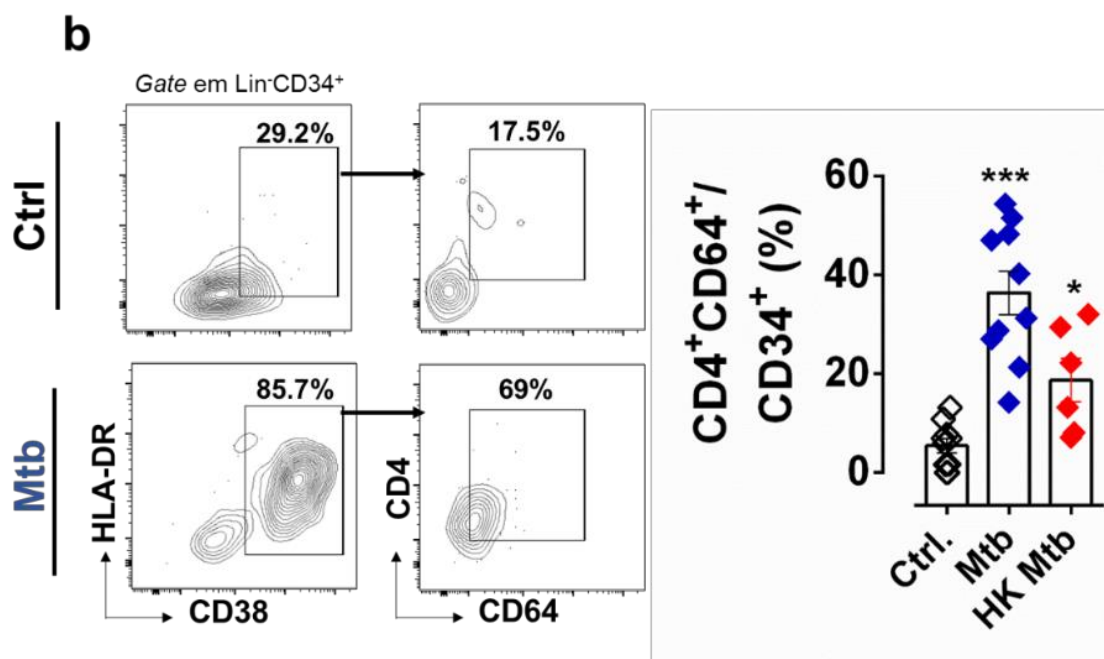


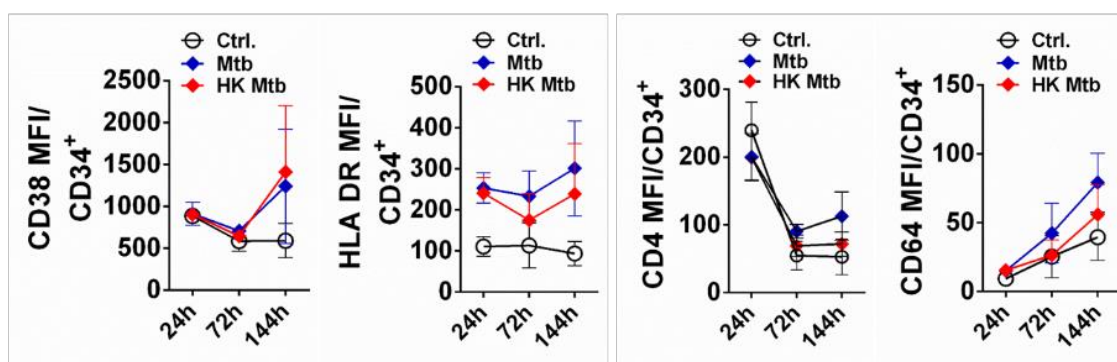
Figura 11 – Infecção por *Mycobacterium tuberculosis* resulta em aumento na expressão de marcadores mielóides em HSPCs do PBMC humano *in vitro* (a) Histograma representativo de um doador mostra a expressão de HLA-DR, CD4 e CD64 em HSPCs expostas a Mtb e grupo controle, no tempo de 72h. Linha tracejada: Controle não infectado; Linha azul: Expostos a Mtb MOI 3. Gráfico de barras com símbolos representam o MFI para HLA-DR, CD4 e CD64 nas células CD34⁺. (b) *Countour* plot representativo ilustra a estratégia de gating para avaliar eventos CD4⁺CD64⁺ dentro da população CD34⁺CD38^{high}HLA-DR^{high}. Ctrl representa o grupo controle não infectado e Mtb representa o grupo exposto a Mtb MOI 3. Gráfico ilustra a frequência de células CD4⁺CD64⁺ em relação a população CD34⁺. Resultado expresso como *pool* de 3 experimentos independentes, n: 5-9. Cada símbolo representa um doador. Losângo aberto: Controle não infectado; Losângo azul: Infectado com Mtb MOI 3. Losângo vermelho: Exposto a HK Mtb MOI 3. Barras representam média e erro representa EPM. Estatística: Anova de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. *** p≤0,001, **p≤0,01 e *p≤0,05 em relação ao grupo controle não infectado.

4.4 *Mycobacterium tuberculosis* induz a expressão de marcadores mielóides em HSPCs da medula óssea humana

Células tronco/progenitoras hematopoiéticas são encontradas na circulação de seres humanos, porém em frequência muito menor (~10 vezes) quando comparado ao tecido da medula óssea. Além da frequência, HSPCs da medula óssea são enriquecidas em progenitores linfóides e células tronco quiescentes, quando comparadas às populações presentes no sangue periférico [90]. Considerando os dados que apontam a presença de Mtb na medula óssea [25] e a maior diversidade e frequência de HSPCs nesse tecido [90], perguntou-se se a infecção por Mtb promoveria semelhante resposta a encontrada nas Lin⁻CD34⁺ do sangue periférico humano na respectiva população da medula óssea. As amostras foram imediatamente processadas em gradiente de Ficoll e a fração mononuclear (BMMC) foi semeada e exposta a Mtb no MOI 3 ou HK Mtb pelos tempos de 24, 72 e 144h. Em cada tempo, o sobrenadante foi armazenado e células foram marcadas com anticorpos contra os antígenos CD34, CD38, HLA-DR, CD4, CD64. A análise por

citometria de fluxo demonstrou que a infecção por Mtb aumentou a expressão dos respectivos marcadores mielóides na população CD34⁺ (**Figura 12a**). Aplicando-se a mesma estratégia de *gating* da **figura 11b**, observou-se aumento na frequência de células positivas para CD4 e CD64 na população CD34⁺CD38⁺HLA-DR⁺ no grupo exposto a Mtb (**Figura 12b**). Semelhante aos resultados encontrados com PBMC, HK Mtb induziu, porém em menor magnitude, a expressão de marcadores mielóides nas células CD34⁺ (**Figura 12b**). Frente aos dados, sugere-se que HSPCs da medula óssea humana são ativadas e expressam moléculas de progenitores mielóides após infecção por Mtb.

a



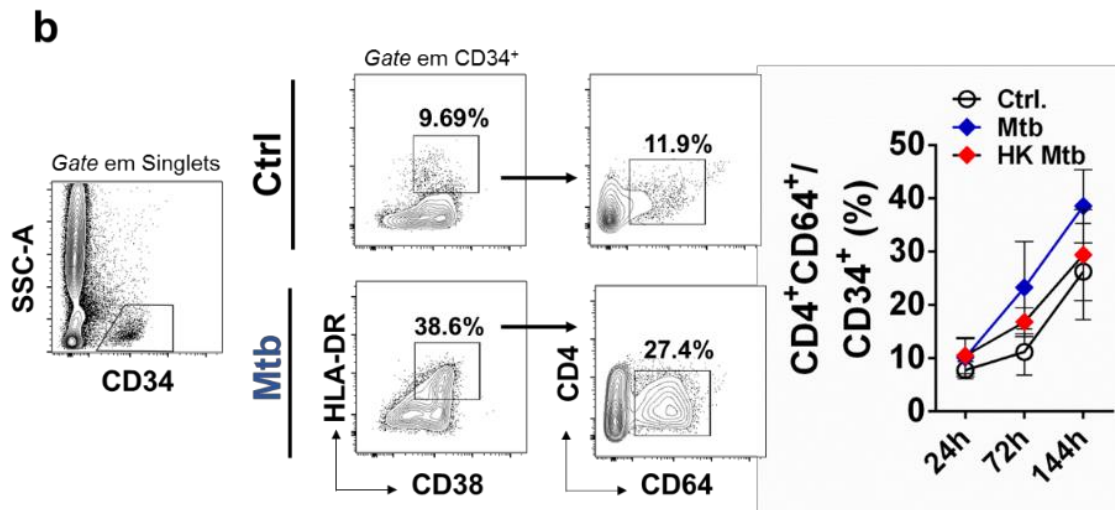


Figura 12 – Infecção por *Mycobacterium tuberculosis* induz a expressão de marcadores mielóides em HSPCs derivadas da medula óssea humana *in vitro*. (a) Expressão de CD38, HLA-DR, CD4 e CD64 em células CD34⁺ derivadas da medula óssea humana nos tempos de 24, 72 e 144h. Círculo aberto: controle não infectado; Losângulo azul: Infectado com Mtb MOI 3; Losângulo vermelho: HK Mtb MOI 3. (b) *Countour* plot representativo ilustra a estratégia de gating para avaliar eventos CD4⁺CD64⁺ dentro da população CD34⁺CD38⁺HLA-DR⁺. Ctrl representa o grupo controle não infectado e Mtb representa o grupo exposto a Mtb MOI 3. Gráfico ilustra a frequência de células CD4⁺CD64⁺ em relação a população CD34⁺. Símbolos representam média e erro representa EPM. Resultado de 3 experimentos independentes, n:3.

4.5 Infecção por *Mycobacterium tuberculosis* não promove a morte de HSPCs *in vitro*.

A utilização do sangue periférico e medula óssea humana permitiu-nos avaliar a resposta de HSPCs, identificadas pela expressão de CD34⁺, frente a infecção por Mtb. Ambos os sistemas, no entanto, contêm populações de células adultas do sistema imune (linfócitos, monócitos, células NK, células dendríticas),

que respondem de diferentes formas a infecção por Mtb. Por isso, não podemos excluir nesse sistema heterogêneo a participação de outras populações celulares na ativação de HSPCs. A fim de abordar a hipótese que HSPCs respondem diretamente à infecção por Mtb, utilizamos células CD34⁺ purificadas do cordão umbilical humano para os próximos experimentos. Considerando os dados das **figuras 6, 7 e 8**, os quais demonstram que HSPCs purificadas são infectadas por Mtb e que a bactéria prolifera nesse sistema, perguntamo-nos se a infecção induz a morte dessa população. Nesse contexto, Yi e colaboradores demonstraram que o antígeno de Mtb ESAT-6 induz apoptose de células CD34⁺ humanas, de forma dose dependente. Dessa forma, e diferentes tempos de infecção avaliamos a viabilidade de células CD34⁺ por meio de dois parâmetros independentes: a frequência de células positivas para o corante FVS (células+: não-viáveis) e a quantificação de LDH, enzima presente no interior de células viáveis e liberada por células com comprometimento na membrana. Observamos, pelo emprego das duas técnicas, que a infecção por Mtb no MOI 3 não compromete a viabilidade de HSPCs (**Figura 13a e b**).

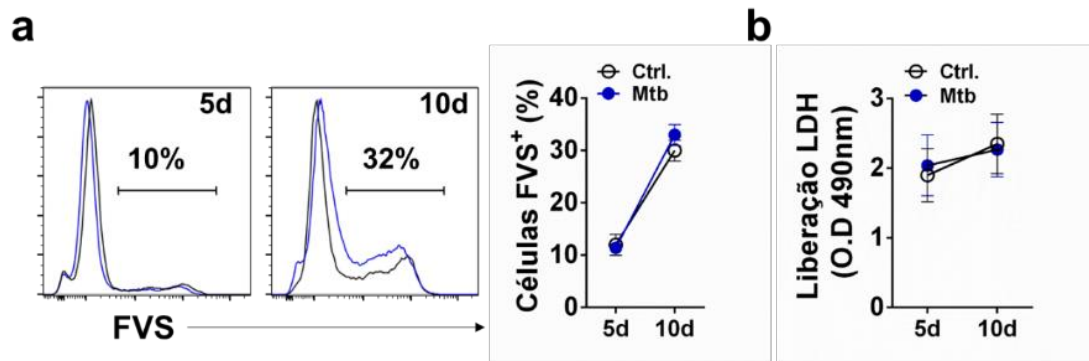


Figura 13 – Infecção por *Mycobacterium tuberculosis* não altera a viabilidade de HSPCs. (a) Histograma representativo mostra a frequência de células não viáveis (FVS+) na cultura de HSPCs. Linha preta: Controle não infectado. Linha azul: Infectado com Mtb MOI 3. Gráfico de linhas ilustra a frequência de células não viáveis nos tempos de 5 e 10 dias de cultura. Círculo aberto: Controle não infectado; Círculo azul: Infectado com Mtb MOI 3. **(b)** Gráfico de linhas mostra a quantificação de LDH no sobrenadante da cultura de CD34⁺, através de leitura da absorbância em 490 nm. Círculo aberto: controle não infectado; Círculo azul: Infectado com Mtb MOI 3. Símbolos representam média e erro representa EPM. Dados representados como *pool* de 3-5 experimentos independentes em duplicatas, n: 4.

4.6 *Mycobacterium tuberculosis* induz a expansão de progenitores mielóides *in vitro*

Dados obtidos utilizando PBMCs e BMMCs humanos sugerem que a exposição de células CD34⁺ a Mtb promove o comprometimento dessa população para linhagem mielóide. Após estabelecermos um sistema *in vitro* para expansão de HSPCs humanas e avaliarmos a viabilidade dessa população frente a infecção com o patógeno Mtb, perguntamo-nos se a infecção promoveria a diferenciação de HSPCs purificadas para progenitores

mielóides. Dessa forma, HSPCs foram submetidas ao protocolo de expansão e infectadas com Mtb no MOI 3. Utilizando dados da literatura, os quais abordaram experimentalmente a diferenciação de HSPCs frente a agentes infecciosos, PAMPs e citocinas produzidas durante a resposta inflamatória [63, 92 - 95], estabelecemos os tempos de 5 e 10 dias de infecção como suficientes para responder a pergunta inicial. Em cada tempo, células foram marcadas com anticorpo anti-CD34, anti-CD38, anti-CD4 e anti-CD64 e a frequência da população CD4+CD64+ foi avaliada por citometria de fluxo. Observamos inicialmente que a frequência das HSPCs, caracterizadas pela expressão de CD34+, diminui ao longo do tempo, de forma semelhante no grupo controle, em células expostas a Mtb e no grupo HK Mtb (**Figura 14a**). No entanto, ao analisarmos a frequência de progenitores mielóides, observamos que Mtb induz o aumento dessa população após 5 dias de infecção e, em menor grau após 10 dias. Essa resposta depende da atividade da bactéria viva. Culturas expostas a HK Mtb mostraram aumento não significativo após 5 dias de infecção (**Figura 14b, c e d**). Empregamos, nesse experimento, a o isolado clínico de Mtb CS267, a fim de incluir a variabilidade genética da micobactéria no

fenótipo observado com as HSPCs. Semelhante aos resultados obtidos com a cepa laboratorial H37Rv, CS267 induziu aumento em progenitores mielóides após 5 d de infecção (**Figura 14e**). Concluímos, dessa forma, que a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* promove a expansão de progenitores mielóides em cultura de células CD34⁺ purificadas.

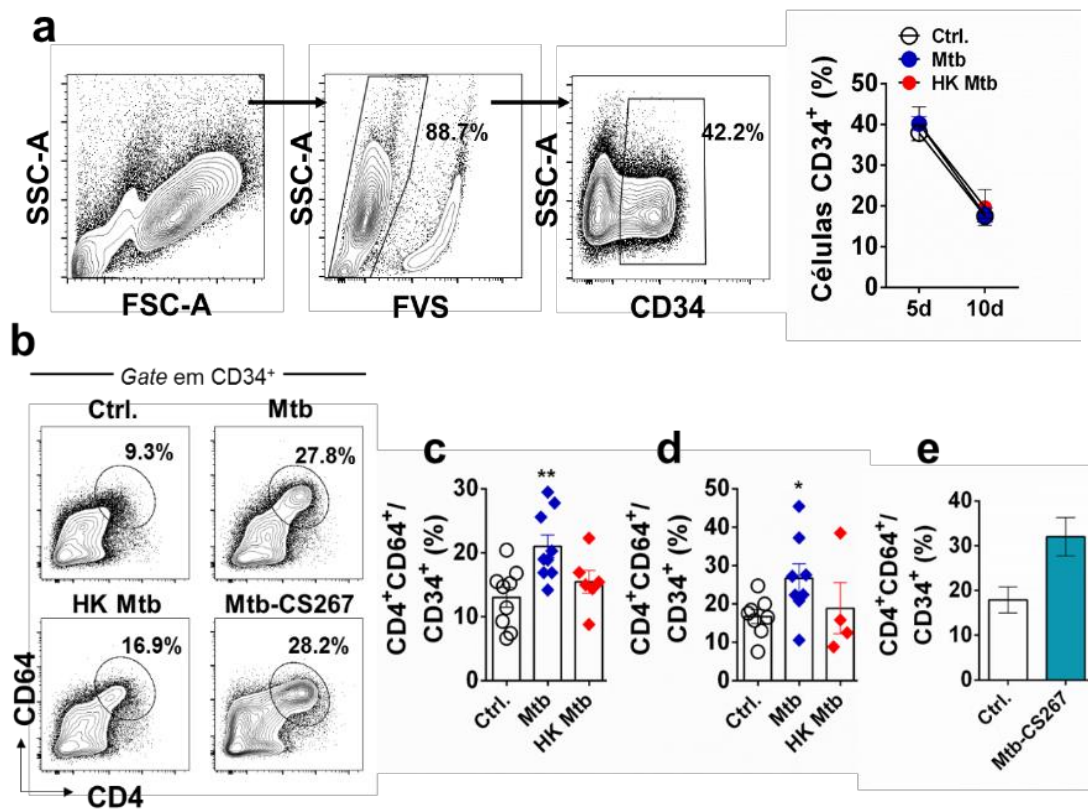


Figura 14 – *Mycobacterium tuberculosis* induz a expansão de progenitores mielóides CD4⁺CD64⁺ em cultura de HSPCs purificadas. (a) Estratégia de *gating* demonstrando a análise de HSPCs (CD34⁺). Após exclusão de células não viáveis, a frequência de eventos CD34⁺ foi quantificada por citometria de fluxo. Gráfico de linhas retrata a frequência de HSPCs após 5 e 10 dias de cultura. Círculo aberto: controle não infectado; Círculo azul: Infectado com Mtb MOI 3. Círculo vermelho: exposto a Mtb HK. Símbolos representam média e erro representa EPM. Dados expressos como *pool* de 9 experimentos independentes, n:5. (b) Estratégia de *gating*

para avaliar progenitores mielóides. Após a seleção de células CD34⁺, a frequência de eventos CD4⁺ e CD64⁺ foi detectada por citometria de fluxo. **(c)** Frequência de células CD4⁺CD64⁺ na população CD34⁺ após 5 dias e **(d)** 10 dias de cultivo. Círculo aberto: Controle não infectado; Losângos azul e vermelho: Infectado com Mtb MOI 3; Losângos verde e amarelo: exposto a HK Mtb. Barras representam média, erro representa EPM e símbolos representam experimentos independentes. Dados expressos como *pool* de 9 experimentos independentes, n:5. Estatística: Anova de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$. **(e)** Gráfico ilustra a frequência de progenitores mielóides na cultura de HSPCs expostas a cepa clínica de Mtb CS267 após 5 dias de infecção. Barra aberta: Controle não infectado. Barra azul: Infectado com Mtb-CS267 MOI 3. Barras representam média e erro representa EPM. Dado expresso como *pool* de 2 experimentos independentes, n:2.

4.7 *Mycobacterium tuberculosis* promove aumento na produção de monócitos em cultura de HSPCs humana.

Os resultados obtidos com PBMC, BMMC e células CD34⁺ purificadas de cordão umbilical sugerem que Mtb infecta, prolifera e induz o comprometimento de HSPCs humanas para a linhagem mielóide. A hematopoiese humana é caracterizada pela expansão de progenitores com potencial restrito para linhagem mielóide, megacarióide/eritróide e linfóide. Esses, a partir de um processo contínuo de diferenciação, geram por final as populações de células adultas do sistema imune. Três populações celulares podem ser geradas a partir do

comprometimento mielóide: monócitos, granulócitos e células dendríticas mielóides [88, 96, 97]. A fim de investigar se a expansão de progenitores mielóides induzida por Mtb é traduzida no aumento de células adultas mielóides, e se esse aumento é direcionado para alguma das 3 populações mencionadas, células CD34⁺ derivadas do cordão umbilical foram expostas a Mtb por 10 dias e moléculas de superfície que identificam essas populações foram avaliadas por citometria de fluxo. Observamos que a infecção por Mtb viva aumentou a frequência de células que expressam CD14, sugerindo aumento na produção de monócitos *in vitro* (**Figura 15a**). Novamente, observamos que esse fenótipo depende da atividade da bactéria viva. Além disso, observamos o aumento de neutrófilos (CD16⁺CD66b⁺) na maior parte das amostras testadas, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo (**Figura 15b**). Não foi observada diferença na frequência de neutrófilos após 5 dias de infecção, enquanto o aumento de monócitos foi observado na maioria dos doadores, porém com menor expressão quando comparado ao tempo de 10 dias (**Figura 31**). Ao avaliarmos a frequência de células CD41a⁺ (megacariócitos/plaquetas) (**Figura 15c**), células BDCA1⁺CD14^{low} (células dendríticas mielóides do

tipo I) (**Figura 15d**) e células CD235a⁺ (linhagem eritróide) (**Figura 32**), não foi observada diferença entre os grupos controle e expostas a Mtb MOI 3. Em conjunto, esses resultados sugerem que Mtb seletivamente favorece a geração de monócitos e em menor magnitude a geração de neutrófilos, a partir da cultura de células CD34⁺.

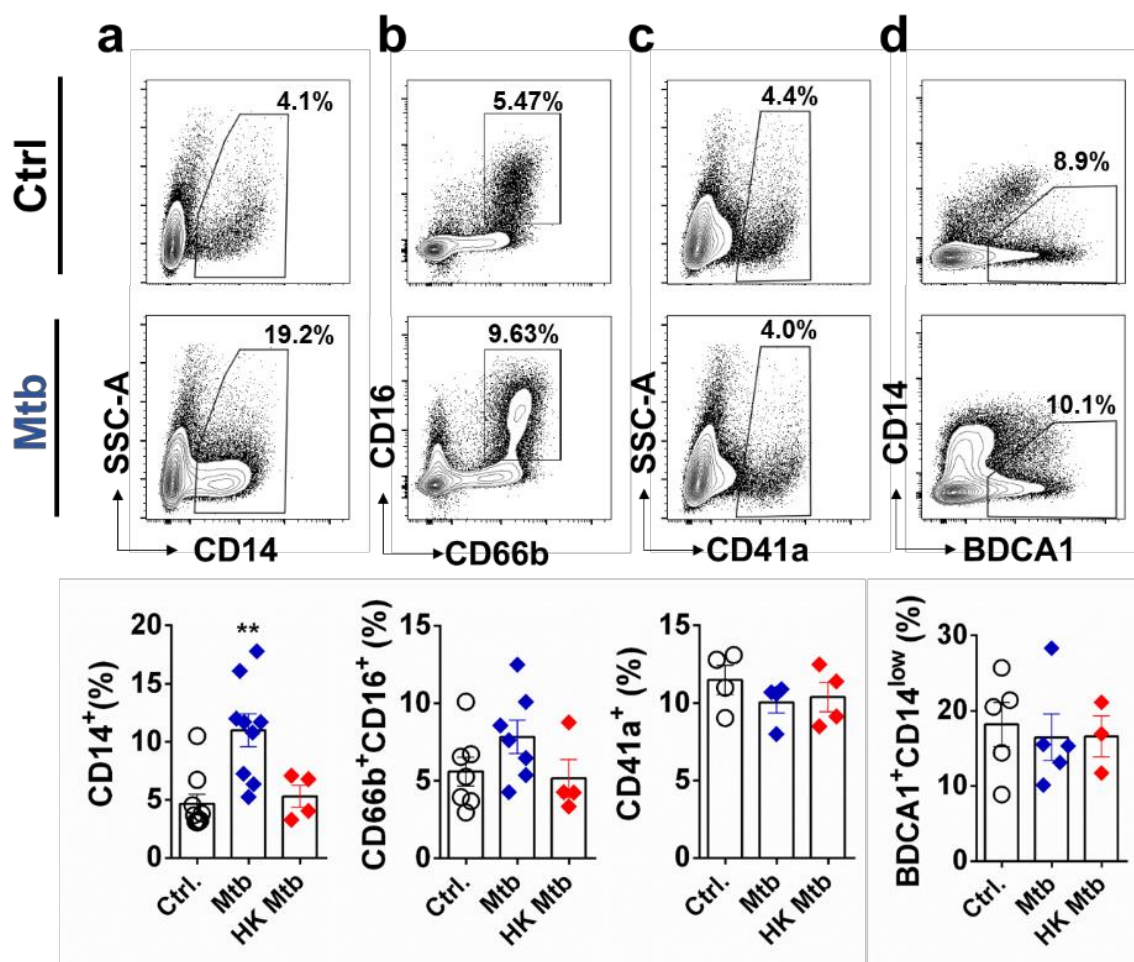


Figura 15 – *Mycobacterium tuberculosis* promove aumento na produção de monócitos em cultura de HSPCs humanas. Estratégia de *gating* para avaliar Monócitos (CD14⁺), Neutrófilos, megacariócitos/plaquetas (CD41a⁺) e células dendríticas clássicas do tipo I (BDCA1⁺CD14^{low}) foram analisadas por citometria de fluxo em culturas de HSPCs humanas após 10 dias. **(a)** Gráfico de barras

ilustra a frequência de monócitos **(a)**, neutrófilos **(b)**, megacariócitos/plaquetas **(c)** e DCs mielóides tipo I **(d)**. Círculo aberto: Controle não infectado; Losângo azul: Infectado por Mtb MOI 3; Losângo vermelho: HK Mtb MOI 3. Barras representam média e erro representam EPM. Dados expressos como *pool* de 3 a 9 experimentos independentes, n:3-5. Estatística: Anova de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, ** $p \leq 0,01$.

Considerando os resultados onde Mtb prolifera na cultura de HSPCs e promove o aumento de monócitos em 10 dias de infecção, decidimos investigar qual o fenótipo dos monócitos gerados nesse sistema. As populações de monócitos humana podem ser divididas em clássica ($CD14^{+++}CD16^{+}$), intermediária ($CD14^{+}CD16^{low}$) e não-clássica ($CD14^{low}CD16^{++}$). Essas populações apresentam importantes diferenças em relação a capacidade de eliminar patógenos intracelulares, induzir resposta inflamatória e reparo tecidual. Foi observado por que a população de monócitos não-clássica está expandida no sangue periférico de pacientes com TB ativa, e essa expansão depende do eixo IL-10 – STAT3 [98-99]. Dessa forma, perguntamo-nos se os monócitos gerados por HSPCs após infecção por Mtb apresentariam o mesmo fenótipo, sendo este associado a disseminação do patógeno em seres humanos na tuberculose ativa. Primeiramente, avaliamos a expressão de CD11b, HLA-

DR e CD64, as quais são presentes em monócitos do sangue periférico humano [100]. Análise de citometria de fluxo demonstrou que os monócitos gerados em nosso sistema apresentam alta expressão de CD11b, e expressão intermediária de HLA-DR e CD64 (**Figura 16a**). Não foram observadas diferenças na expressão dessas moléculas entre o grupo infectado com Mtb e o controle não infectado. No entanto, quando analisamos a frequência de monócitos intermediários/não clássica ($CD14^+CD16^{low/+}$), constatamos que HSPCs expostas a Mtb apresentam elevada frequência dessa população em relação ao controle. Esse resultado foi evidente em metade dos doadores, não sendo estatisticamente significativo (**Figura 16b**). Além disso, Patel e colaboradores demonstraram que monócitos $CD16^+$ constituem em seres humanos, *in vivo*, populações de monócitos mais diferenciadas. Essas foram encontradas majoritariamente no sangue periférico de seres humanos. Esses dados sugerem que a principal população de monócitos clássicos ($CD14^+CD16^-$) compõem a principal população de monócitos após infecção por Mtb e que a presença de monócitos $CD16^{low/+}$ pode ser uma consequência do aumento inicial da produção de monócitos *in vitro*.

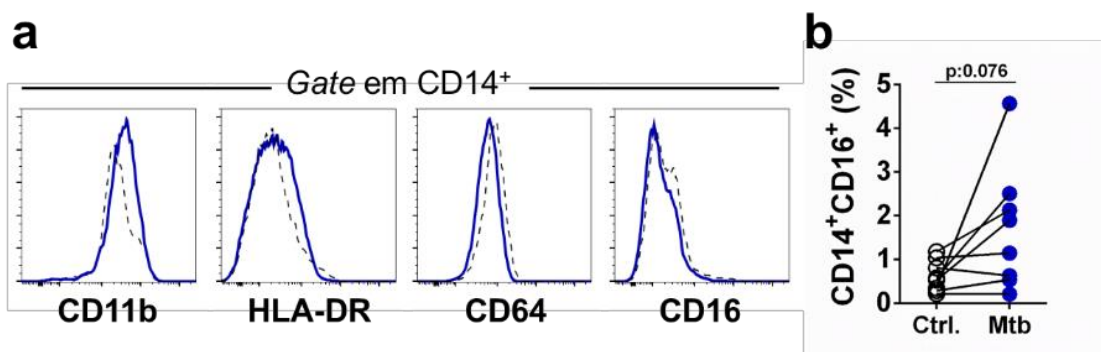


Figura 16 – Monócitos produzidos por HSPCs após infecção por Mtb apresentam semelhante fenótipo aos gerados na ausência de infecção. (a) Histograma representativo ilustra a expressão de CD11b, HLA-DR, CD64 e CD16 em células CD14⁺ após 10 dias de cultura. Linha tracejada: Controle não infectado. Linha azul: Infectado por Mtb MOI 3. Dados representativos de 5 experimentos independentes. **(b)** Gráfico de linha mostra a frequência de células CD14⁺CD16⁺ após 10 dias de cultura. Círculo aberto: controle não infectado. Círculo azul: Infectado por Mtb MOI 3. Dados representados como *pool* de 8 experimentos independentes, n:4. Estatística: Teste T pareado, p: 0,076.

4.8 Análise do transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb confirma diferenciação monocítica.

Frente aos dados obtidos após a infecção de células CD34⁺ por *Mycobacterium tuberculosis*, onde progenitores mielóides e em sequência monócitos são induzidos, perguntamo-nos quais são os mecanismos desencadeados nas HSPCs responsáveis pelo fenótipo observado. Dessa forma, escolhemos analisar o *transcriptoma* de células CD34⁺ após diferentes tempos de infecção, como forma imparcial e exploratória de responder a nossa pergunta. Para tal, HSPCs foram

expostas a Mtb no MOI 3 e o RNA total foi coletado após 1, 3 e 5 dias de infecção. Primeiramente, aplicamos uma plataforma computacional baseada em redes biológicas [103], a qual se utiliza do transcriptoma de diferentes populações celulares purificadas e avalia em que nível uma determinada amostra heterogênea se assemelha a células adultas. Através dessa análise, observamos que mRNA de HSPCs expostas a Mtb apresentaram enriquecimento para o perfil de monócitos/macrófagos, mas não para outras linhagens como linfócitos e células dendríticas. Esses dados corroboram o resultado obtido a nível protéico, demonstrando que Mtb induz a diferenciação de HSPCs para população monocítica (Figura 17).

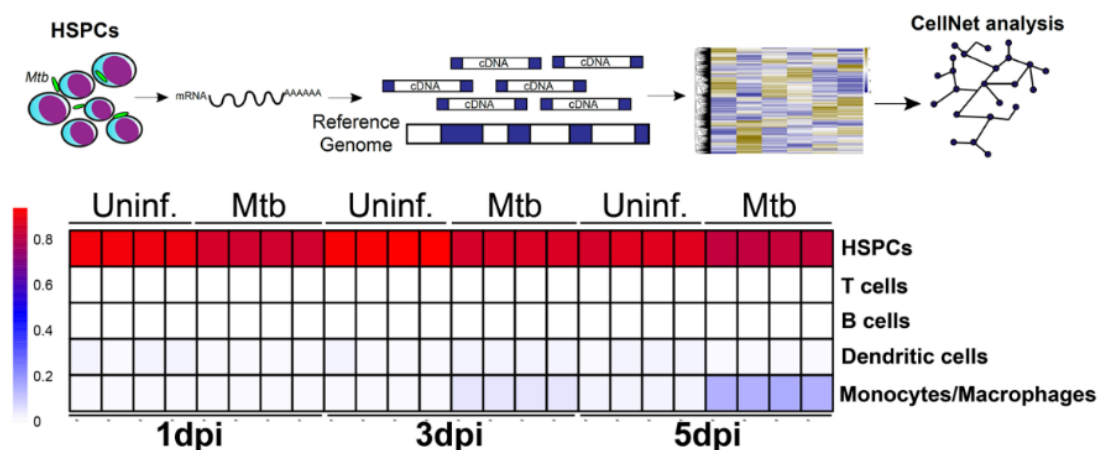


Figura 17 – Análise do transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb pela plataforma *Cellnet* confirma diferenciação monocítica. RNA total de HSPCs foi extraído e enriquecido para mRNA através de seleção por cauda poli-A. Transcritos foram analisados pela plataforma *Cellnet* e expressos como porcentagem representando as população de HSPCs, linfócitos T e B, células dendríticas e monócitos/macrófagos. Ctrl. Representa o grupo controle não

infectado e Mtb representa HSPCs expostas a Mtb MOI 3 nos respectivos tempos de 1dpi, 3dpi e 5dpi. Em cada tempo, cada quadrado representa uma replicata técnica do experimento. n: 1.

A fim de investigar quais processos biológicos estão presentes em HSPCs expostas a Mtb, lista de genes regulados positivamente (com valor de expressão superior a 1.5 na escala log₂) após 1, 3 e 5 dias de infecção foi submetida ao *software* online *Panther – Gene ontology* (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>) [104]. Processos foram organizados de acordo com o valor de $-\log P$, o qual representa a probabilidade dos genes observados em cada categoria terem ocorrido de forma aleatória. Além de transcritos associados a diferenciação monocítica (*Cd4*, *Jun*, *Cd74*), observamos que genes relacionados a resposta a interferons do tipo I (*Mx1*, *Oasl*, *Oas3*, *Ifit1*, *Xaf1*, *Hla-a*), à produção/resposta a mediadores pró-inflamatórios (*Hrh1*, *Ccl4l1*, *Tnfaip3*, *Apol3*, *Ccr1*, *Ccl22*, *Ffar2*, *Orm1*, *Vnn1*) e a quimiotaxia de leucócitos (*Lgals3*, *Fdr1*, *Ffar2*, *Lilrb1*, *Cd1d*, *Tnfsf14*) também foram encontrados mais expressos em HSPCs expostas a Mtb (**Figura 18**).

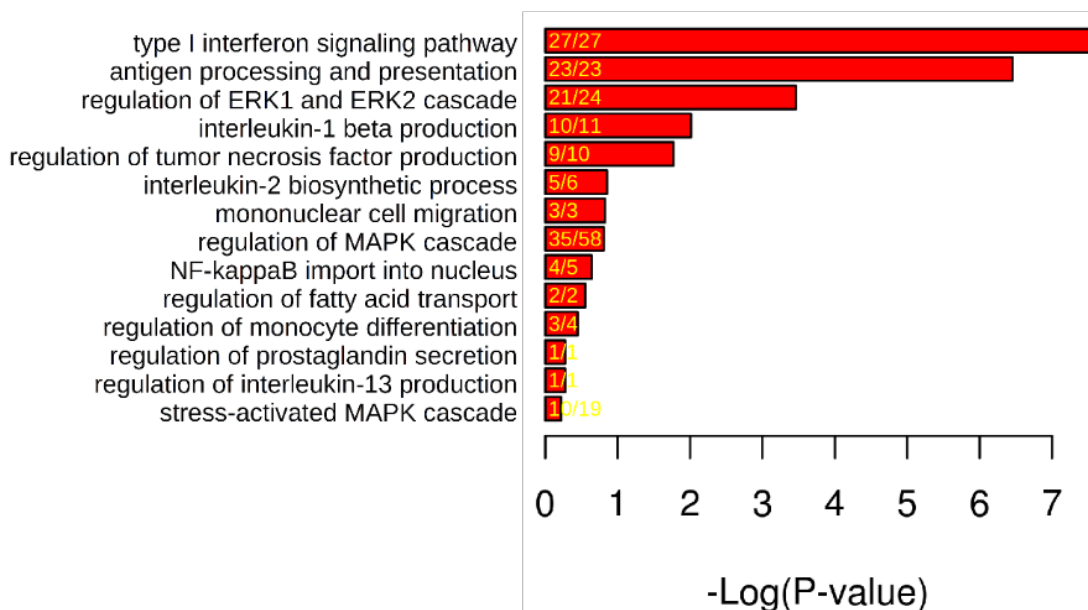


Figura 18 – Processos biológicos enriquecidos no transcriptoma de HSPCs expostas a Mtb após 5 dias de cultura. Conjunto de genes mais expressos em HSPCs expostas a Mtb foi analisado e categorizado em processos biológicos através da ferramenta *Gene ontology*. Processos biológicos estão organizados conforme valor de $-\log P$, indicando a propabilidade do processo biológico ser encontrado de forma aleatória na amostra. n:1.

4.9 A via de sinalização do IFN α/β /Stat1 está ativada em HSPCs expostas a Mtb.

A análise do transcriptoma com a ferramenta *Gene ontology* demonstrou que genes regulados pela ativação da via de sinalização IFN α/β /Stat1 (ISGs) está presente em HSPCs expostas a Mtb. A fim de visualizar a cinética de ativação de ISGs em HSPCs expostas a Mtb e também após incluir os valores de expressão desses genes no grupo controle ao longo do tempo, listas de ISGs foram obtidas através das plataformas *Interferome*

(<http://www.interferome.org/>) [105] e *TRRUST* (<http://www.grnpedia.org/trrust/>) [106] e os valores de RPKM (*Read per Kiobase Million*) foram plotados em *z-score*, de acordo com a seção de **Métodos 3.15**. Foi possível observar que um conjunto de ISGs estão diferencialmente expressos logo após um dia de exposição a *Mtb*, sendo que após 3 e 5 dias de exposição a maior parte dos ISGs analisados estão mais expressos nas HSPCs expostas a *Mtb* em relação ao controle não infectado (**Figura 19a**). Com exceção de alguns genes como *Ifitm2* e *Fadd*, não foi observado diferença no perfil de expressão dos ISGs no controle não infectado ao longo do tempo. A fim de confirmar os resultados do transcriptoma, analisamos a expressão dos ISGs *Mx1*, *Isg15* e *Ifif16* no RNA de HSPCs expostas a *Mtb* através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Corroborando os dados do transcriptoma, *Mx1*, *Isg15* e em menor extensão *Ifif16* foram encontrados em maior nível de expressão no RNA de HSPCs expostas a *Mtb* quando comparados ao controle não infectado (**Figura 19b**). A ativação dos receptores da via do IFN do tipo I (IFNAR1 e IFNAR2) leva a fosforilação do fator de transcrição STAT1 na tirosina posição 701 (Y 701) [107]. Observamos no extrato de proteínas totais após 5 dias

maiores níveis de pSTAT1 Y701 na cultura exposta a Mtb, quando comparado ao controle não infectado (**Figura 19c**). Dessa forma, concluímos com os dados apresentados de que a via de sinalização do IFN α/β /Stat1 está ativada em HSPCs após exposição a Mtb.

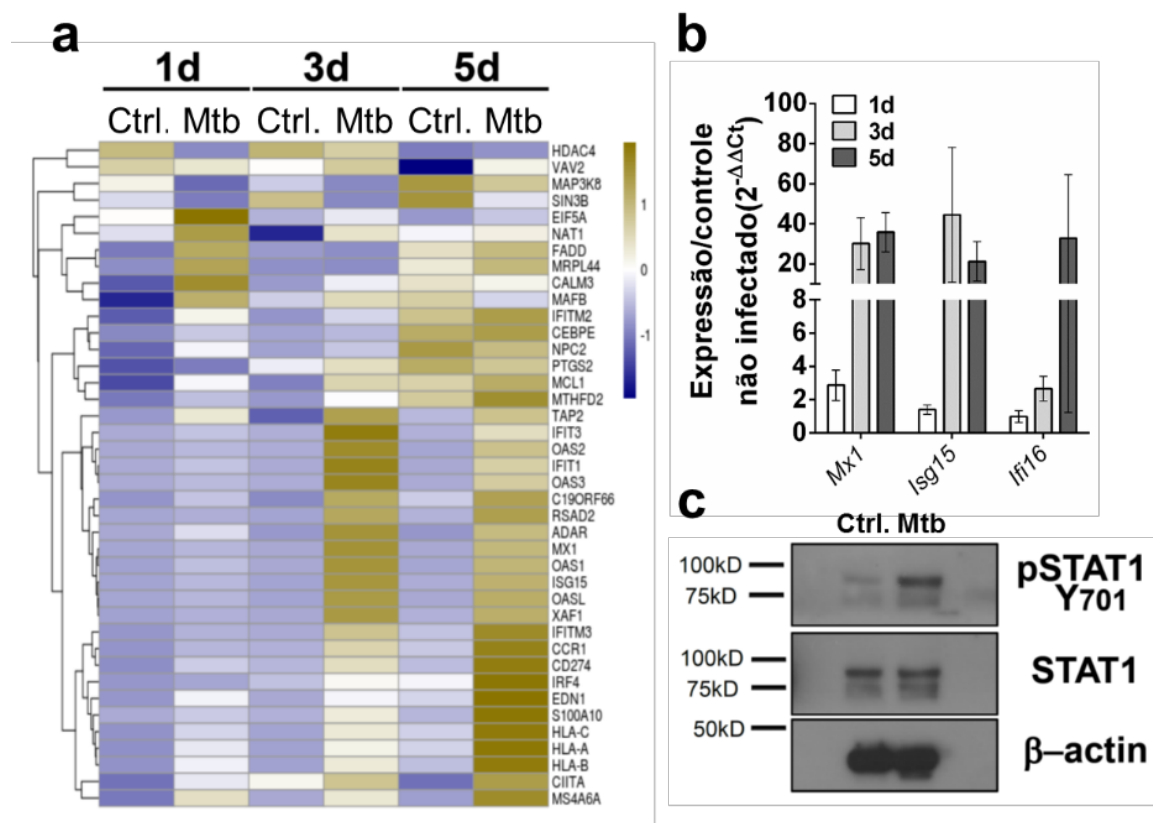


Figura 19 – A via de sinalização do IFN tipo I está ativada em HSPCs expostas a Mtb. (a) Heatmap com os valores de expressão em z-score da lista de genes (50 genes) regulados por IFN α/β . Linhas representam os dias, Ctrl. Representa o controle não infectado e Mtb representa HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Escala com os valores de expressão: Cor azul representa negativamente regulado e Cor dourada representa positivamente regulado. n: 1. **(b)** Valores de expressão dos ISGs *Mx1*, *Isg15* e *Ifi16* no RNA de HSPCs expostas a Mtb. Dados representados como aumento na expressão em relação ao controle não infectado ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os genes 18s e HRPT humanos foram utilizados como controle endógeno. Barras representam média e erro representa EPM. Barras brancas, cinza claro e cinza escuro representam 1, 3 e 5 dias respectivamente n:5. **(c)** Detecção de pSTAT1 Y701 no extrato proteico de HSPCs

expostas a Mtb pela técnica de *Immunoblotting*. A detecção de STAT1 total e β -Actina foram utilizados como controle do experimento. n:2.

4.10 A via de sinalização do IFNAR2 não é necessária para o comprometimento mielóide e produção de monócitos por HSPCs frente a infecção por Mtb.

Analisando o perfil transcricional e expressão proteica de HSPCs, concluímos com os resultados anteriores que a via de sinalização IFN α / β /Stat1 está ativada em HSPCs após exposição a Mtb. É de conhecimento que, células mielóides, em especial a população de neutrófilos e monócitos dos pacientes com tuberculose ativa, apresentam a assinatura gênica da via do IFN do tipo I [108]. Além disso, Buechler e colaboradores demonstraram que IFN do tipo I ativam populações quiescentes de HSCs e promovem comprometimento mielóide na resposta de progenitores mielóides a agonistas do receptor TLR7. Nesse contexto, investigamos se a via de IFN do tipo I está envolvida na indução de progenitores mielóides e aumento na produção de monócitos nas culturas de HSPCs expostas a Mtb. HSPCs foram pré-incubadas com anticorpo neutralizante anti-IFNAR2, o qual bloqueia a sinalização

canônica de IFN α/β . Como controle do bloqueio, analisamos a frequência de PBMCs pSTAT1 Y701⁺ após tratamento com IFN α 2a na presença ou ausência do anticorpo neutralizante (**Figura 27**). Após 5 dias, analisamos a frequência de progenitores mielóides, de acordo com a estratégia de *gating* da **figura 14b** em HSPCs expostas ao anticorpo neutralizante na presença e ausência de Mtb. Observamos que Mtb promoveu o aumento na frequência de progenitores mielóides, de forma independente a sinalização de IFNAR2 (**Figura 20a**). Da mesma forma, nos tempos de 10d avaliamos a produção de monócitos através da estratégia de *gating* da **figura 15a**, sendo que o bloqueio do receptor IFNAR2 não comprometeu a produção de monócitos por HSPCs expostas a Mtb (**Figura 20b e c**). Em paralelo, também foi analisada a produção de neutrófilos, células dendríticas mielóides do tipo 1 e megacariócitos/plaquetas, conforme **figura 15b-d**. Não foi observada diferença na produção dessas populações frente a infecção ou tratamento com anticorpo neutralizante anti-IFNAR2 (**Figura 33**). Por último, exploramos também se essa via de sinalização está envolvida com a proliferação de Mtb na cultura de HSPCs. Semelhante aos resultados anteriores, o perfil de

proliferação de Mtb não foi alterado em HSPCs pré-expostas ao anticorpo neutralizante anti-IFNAR2 (**Figura 20d**). Concluimos que a via IFN α/β /Stat1(ISGs) está ativada em HSPCs expostas a Mtb, no entanto não é necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação da micobactéria observados em nosso sistema.

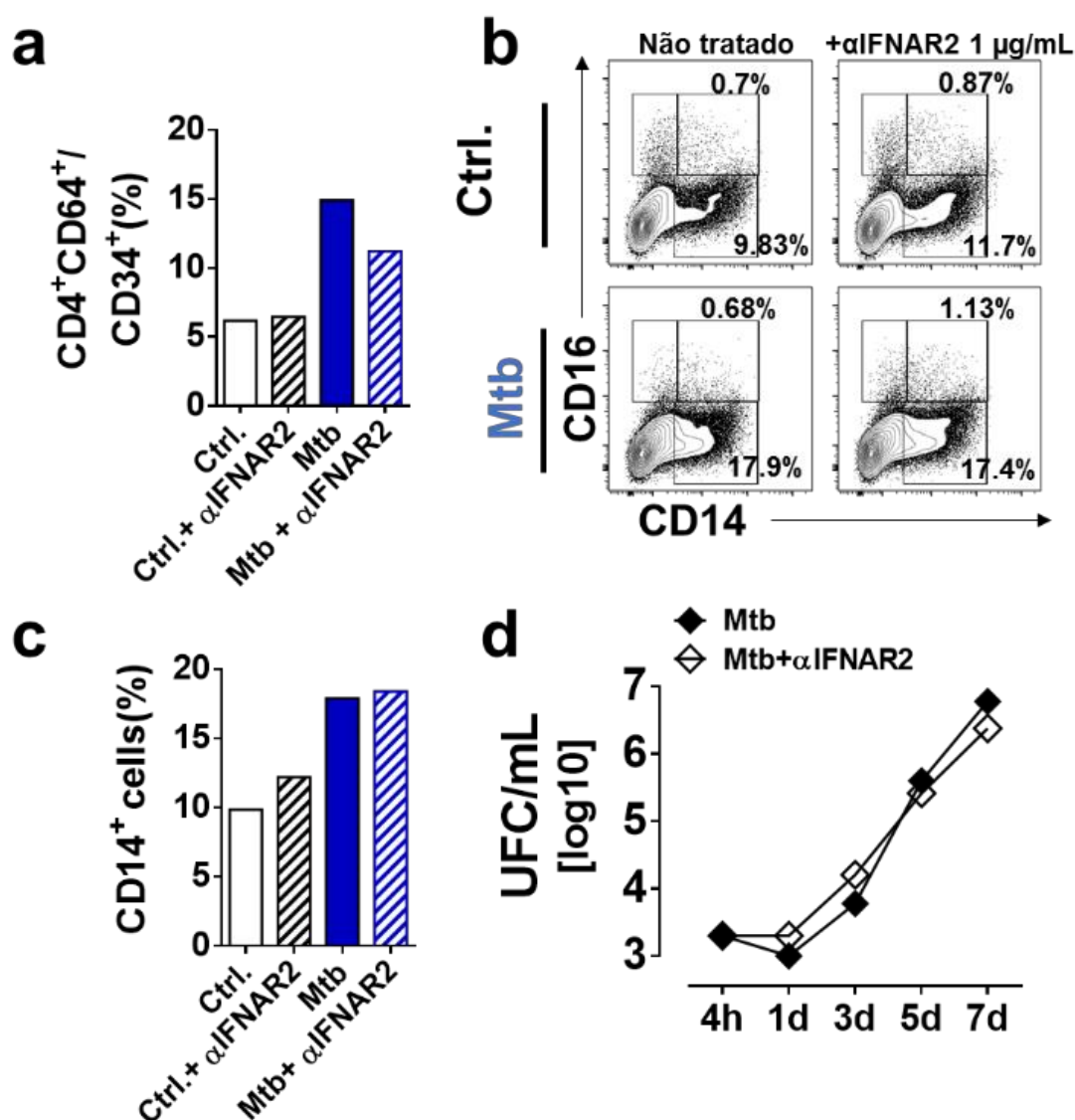


Figura 20 – A via de sinalização do IFNAR2 não é necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação de Mtb em HSPCs. (a) Frequência de células

CD4+CD64+ na população CD34+ após 5 dias de infecção. **(b)** Estratégia de *gating* na análise da produção de monócitos por HSPCs após 10 dias de infecção. Linhas representam grupo controle (Ctrl.) e infectado com Mtb MOI 3 (Mtb em azul). Colunas representam grupo não-tratado ou pré-tratado com anti-IFNAR2. **(c)** Frequência de monócitos produzidos por HSPCs após 10 dias de cultivo. Barras abertas representam grupo controle não infectado e barras azuis representam HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Barras rachuradas representam os grupos onde HSPCs foram pré-tratadas com 1 µg/mL de anti-IFNAR2. **(d)** Gráfico de linhas com a enumeração de UFCs de Mtb nos tempos de 4h a 7 dias de infecção. Losângos fechados representam HSPCs expostas a Mtb e losângos abertos representam HSPCs pré-expostas a anti-IFNAR2 e expostas a Mtb. Dados representativos de 1 experimento, n:1.

Além de IFN α/β , outras citocinas utilizam o fator de transcrição STAT1 em sua via de sinalização [65]. Como observamos que genes regulados por STAT1 estão presentes em HSPCs expostas a Mtb e no entanto, a via de IFNAR2 não está envolvida no fenótipo observado após infecção, resolvemos investigar o papel de outra citocina que sinaliza através de STAT1. Nesse contexto, IFN- γ destacou-se por ser uma citocina induzida durante a infecção por Mtb em humanos e pelo seu papel na mielopoiese de emergência e ativação de HSCs quiescentes nos modelos de infecção viral e infecção crônica por *Mycobacterium avium* respectivamente [110, 38, 70]. Dessa forma, empregamos o anticorpo neutralizante anti-IFN- γ em HSPCs previamente a infecção. Semelhante a abordagem com a citocina

IFN α/β , analisamos a frequência de progenitores mielóides em 5 dias (**Figura 21a**), a produção de monócitos em 10 dias (**Figura 21b**) e a proliferação da bactéria em HSPCs na presença de anti-IFN γ (**Figura 21c**). Ao compararmos os parâmetros descritos acima na presença ou ausência de anti-IFN- γ , concluímos que essa citocina não está envolvida na diferenciação mielóide e proliferação de Mtb em HSPCs humanas *in vitro*. Da mesma forma, demais populações mielóides listadas na **figura 15b-d** não foram alteradas na infecção ou no tratamento com anticorpo neutralizante anti-IFN γ (**Figura 34**).

Concluimos que a via de sinalização de STAT1 está ativada em HSPCs expostas a Mtb, no entanto a sinalização por IFNAR2 ou IFN γ não está envolvida com o comprometimento mielóide e proliferação da micobactéria em HSPCs.

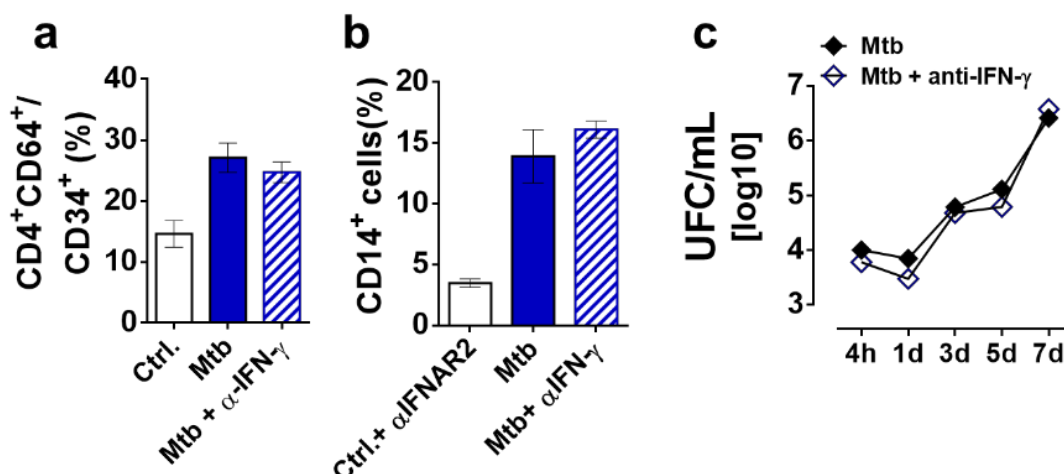


Figura 21 – A via de sinalização do IFN γ não é necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação de Mtb em HSPCs. (a) Frequência de células CD4⁺CD64⁺ na população CD34⁺ após 5 dias de infecção. **(b)** Frequência de monócitos produzidos por HSPCs após 10 dias de cultivo. Barras abertas representam grupo controle não infectado e barras azuis representam HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Barras rachuradas representam os grupos onde HSPCs foram pré-tratadas com 10 μ g/mL de anti-IFN γ . **(c)** Gráfico de linhas com a enumeração de UFCs de Mtb nos tempos de 4h a 7 dias de infecção. Losângo fechado representa HSPCs expostas a Mtb e losângo aberto azul representa HSPCs pré-expostas a anti-IFN γ e expostas a Mtb. Dados representativos de 2 experimentos independentes, n:2.

4.11 Infecção por Mtb em HSPCs resulta na produção de IL-6

Citocinas regulam o sistema hematopoiético através da seleção e expansão de progenitores restritos às linhagens linfóide, megacarióide/eritróide e mielóide. A produção de citocinas é regulada de forma a manter em equilíbrio a produção dos diferentes progenitores na homeostase. No entanto, desafios a esse sistema, como

infecções, culminam na produção de citocinas envolvidas no processo inflamatório e eliminação do patógeno. Zhao e colaboradores demonstraram que DAMPs são capazes de estimular mielopoiese através da indução de IL-6 por progenitores multipotentes e Schürch e colaboradores demonstraram que durante infecção por LCMV, células CD8 ativadas migram para a medula óssea e induzem a produção de IL-6 por macrófagos residentes, levando a expansão mielóide. IL-6 está presente no coquetel de citocinas necessário para expansão e sobrevivência de HSPCs, juntamente com SCF, TPO, IL-3 e Flt3L. No soro, escarro e em macrófagos de pacientes com tuberculose ativa foram encontrados níveis elevados de IL-6, juntamente com as citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β nos 3 sistemas [111 – 113]. Na sequência, investigamos se a infecção por Mtb em HSPCs induz a produção de IL-6. Utilizando do RNA e sobrenadante da cultura de HSPCs expostas a Mtb, observamos que a infecção promove aumento dos transcritos de IL-6 em 1, 3 e 5 dias de infecção (**Figura 22a**). No entanto, ao observamos as concentrações da proteína no sobrenadante, detectamos níveis aumentados de IL-6 apenas após 1 dia de infecção, enquanto esses decrescem em 5 e 10 dias de maneira semelhante ao

controle não-infectado (**Figura 22b**). Frentes aos resultados, concluímos que HSPCs produzem IL-6 após exposição a Mtb.

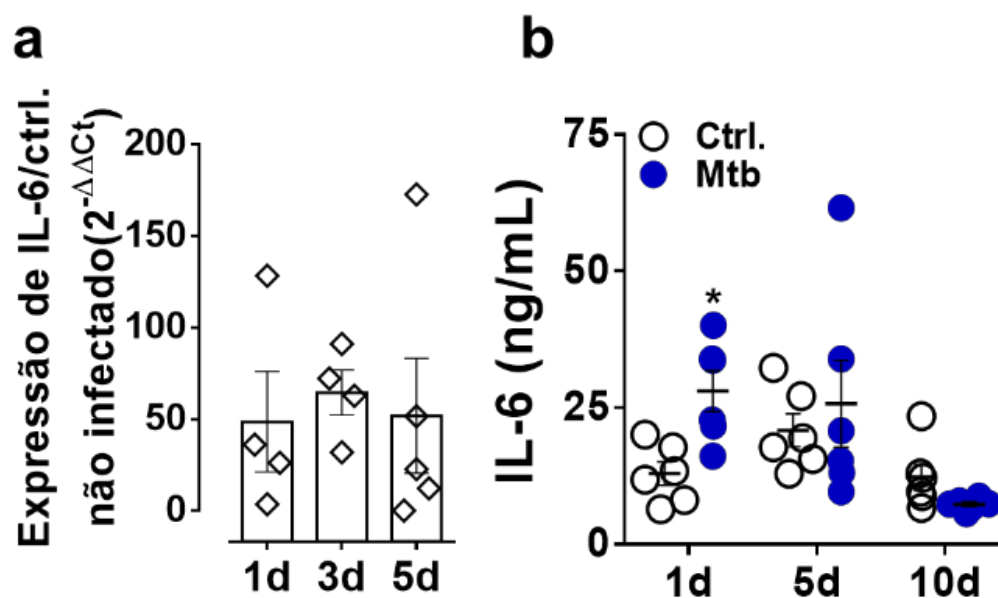


Figura 22 – Aumento no transcrito e proteína de IL-6 em HSPCs expostas a Mtb. (a) Valor de expressão de *Il6* no RNA de HSPCs expostas a Mtb. Dados representados como aumento na expressão em relação ao controle não infectado ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os genes 18s e HRPT humanos foram utilizados como controle endógeno. Barras representam média e erro representa EPM. Barra branca, cinza claro e cinza escuro representam 1, 3 e 5 dias respectivamente n:5. **(b)** Gráfico de linhas representa a quantificação de IL-6 no sobrenadante de HSPCs expostas a Mtb ou grupo controle (meio Stemspan). Sobrenadante foi utilizado na diluição 1:200. Círculo aberto: Controle não infectado. Círculo azul: HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Símbolos representam média e erro representa EPM. Estatística: Anova de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. * $\leq 0,05$. Dados representativos do *pool* de 8 replicatas experimentais, n:5.

Diferentes fatores de transcrição participam da produção de IL-6, de forma dependente ao receptor intra/extracelular e de moléculas adaptadoras ativadas na

via. Nesse contexto, o fator de transcrição STAT3 se destaca por ser fosforilado na tirosina 705 (Y705) e promover a transcrição de genes após a ativação do receptor de IL-6 [114]. Além de STAT3, o fator de transcrição C/EBP β , quando ativado, promove a produção de IL-6 [66]. C/EBP β está diretamente relacionado a mielopoiese, onde mostrou-se não relevante na mielopoiese basal, mas necessário para a mielopoiese de emergência induzida após infecção com *Candida albicans* [67]. Em relação ao patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, C/EBP β foi detectado em maior concentração e promovendo a transcrição de IL-6 em macrófagos humanos estimulados com Ara-LAM, um componente da parede de Mtb capaz de promover a ativação dos receptores TLR2 [115]. Também foi observado que a via de sinalização de C/EBP β está ativada em macrófagos que diferenciam para o perfil M2 frente a infecção por Mtb [116]. Portanto, investigamos os níveis de ativação de STAT3 através da fosforilação de pSTAT3 Y705 e a produção de C/EBP β no extrato proteico de HSPCs infectadas com Mtb no tempo de 5 dias. Não foi observada diferença nos níveis de PSTAT3 Y705 após infecção (**Figura 23a**). No entanto, de forma não esperada, níveis de STAT3 total encontraram-se

diminuídos em HSPCs expostas a Mtb, sugerindo que a infecção regula negativamente a produção de STAT3 não fosforilada (**Figura 23a**). Em contraste, níveis de C/EBP β encontraram-se aumentados após infecção (**Figura 23b**). A fim de responder se a via de ativação de IL-6 está presente em HSPCs expostas a micobactéria, analisamos a expressão de genes *downstream* ao IL-6R através da ferramenta *TRRUST* e de dados obtidos por Chip-Seq em células humanas tratadas com IL-6. Desse modo, confirmamos que HSPCs apresentam uma assinatura gênica correspondente a ativação de IL-6R (**Figura 23c**).

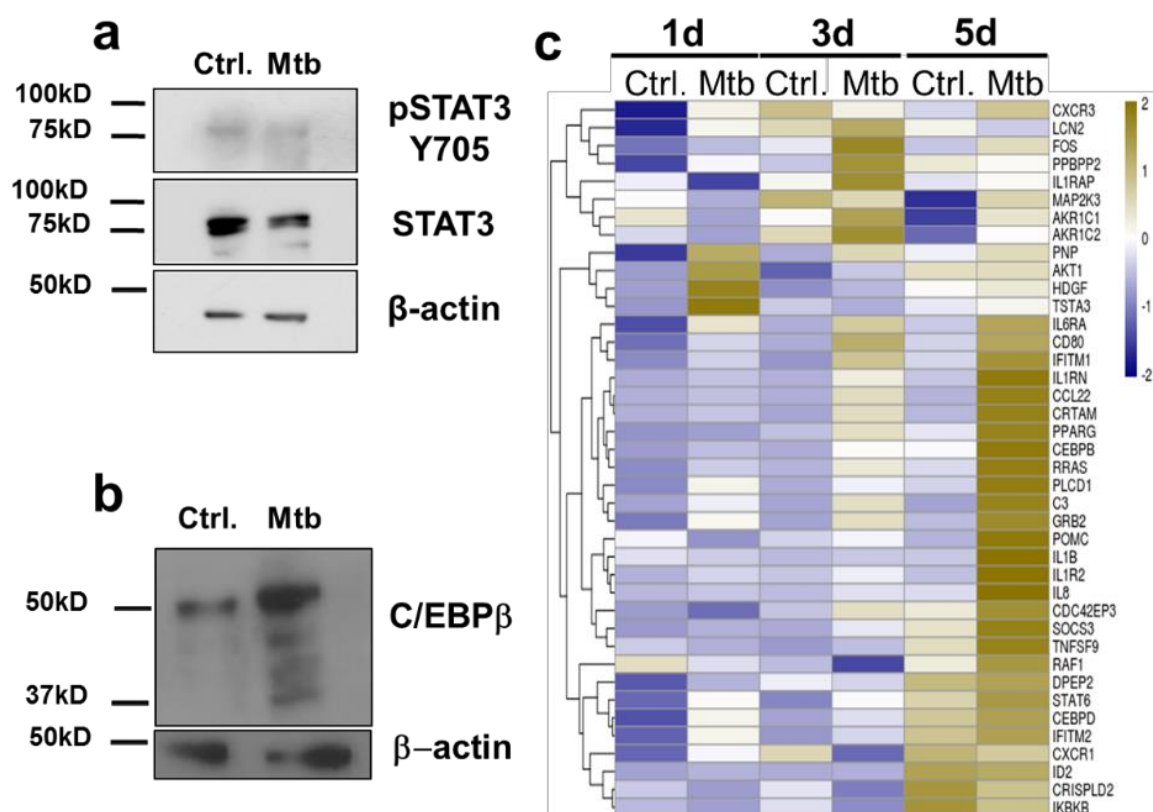


Figura 23 – Ativação da via do receptor de IL-6 em HSPCs infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*. (a) Detecção de pSTAT3 Y705 no extrato proteico de HSPCs expostas a Mtb pela técnica de *Immunoblotting*. A detecção de STAT3 total e β-Actina foram utilizados como controle do experimento. n:1. (b) Detecção de C/EBPβ no extrato proteico de HSPCs expostas a Mtb. A detecção de β-Actina foi utilizada como controle do experimento. n:3. (c) *Heatmap* com os valores de expressão em *z-score* da lista de genes (50 genes) regulados por IL-6R. Linhas representam os dias, Ctrl. representa o controle não infectado e Mtb representa HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Escala com os valores de expressão: Cor azul representa negativamente regulado e Cor dourada representa positivamente regulado. n: 1.

4.12 A via de sinalização do IL-6R é necessária para o comprometimento mielóide e produção de monócitos por HSPCs frente a infecção por Mtb.

Após a infecção de HSPCs por Mtb, observamos dois principais grupos de citocinas ativadas nessa população: A via de IFN α/β e a via do IL-6R. Enquanto através do emprego de anticorpo neutralizante anti-IFNAR2, excluimos a participação da via dos IFNs do tipo I na mielopoiese induzida pela infecção (**Figura 20**), o papel da via do IL-6R não foi investigado. Utilizando-se do fármaco Tocilizumab, o qual bloqueia seletivamente a cadeia alfa do receptor de IL-6 (α CD126) [117], perguntamos se a via do IL-6R está envolvida no fenótipo induzido nas HSPCs pela micobactéria. HSPCs foram expandidas conforme **figura 12** e então pré-tratadas com tocilizumab na concentração de 10 μ g/mL. Após 5 dias, analisamos a frequência de progenitores mielóides, de acordo com a **figura 14b** em HSPCs expostas ao anticorpo neutralizante na presença ou ausência da bactéria. Conforme demais experimentos, observamos que Mtb promoveu o aumento na frequência de células CD34⁺CD4⁺CD64⁺. Ao analisarmos o fenótipo em células tratadas com tocilizumab, observamos que a indução de

progenitores mielóides foi dependente de IL-6R (**Figura 24a**). Na sequência avaliamos a produção de monócitos após 10d de cultura, conforme a **figura 15a**. Foi observado que a inibição do receptor de IL-6R impediu o aumento de monócitos induzido pela infecção. Também observamos uma redução na produção basal de monócitos nas culturas não-infectadas (**Figura 24b e c**). Em paralelo, analisamos a produção de neutrófilos, mDCs tipo 1 e MK/plaquetas conforme **figura 15b-d**. Embora não estatisticamente significativa, observamos uma redução na produção de neutrófilos em HSPCs pré-tratadas com tocilizumab. Foi observado uma tendência ao aumento de mDCs do tipo 1, enquanto MK/plaquetas permaneceram inalteradas frente ao tratamento ou infecção (**Figura 35**). Frente a esses dados, perguntamos se a via de sinalização do IL-6R está envolvida com a proliferação de Mtb na cultura de HSPCs. Enquanto nos tempos de 1, 3 e 5 dias não foi observado diferença, em 7 dias observamos uma redução de aproximadamente 1log de UFC/mL em HSPCs pré-tratadas com tocilizumab (**Figura 24d**). Concluimos que a via do receptor de IL-6 é necessária para a indução e progenitores mielóides e a respectiva produção de monócitos por HSPCs expostas a Mtb. Além da mielopoiese induzida pela infecção, a via

de IL-6R está envolvida com a proliferação tardia de Mtb em HSPCs. Supomos haver uma relação direta entre a via de sinalização do receptor de IL-6, mielopoiese e proliferação de Mtb em HSPCs perante os resultados obtidos.

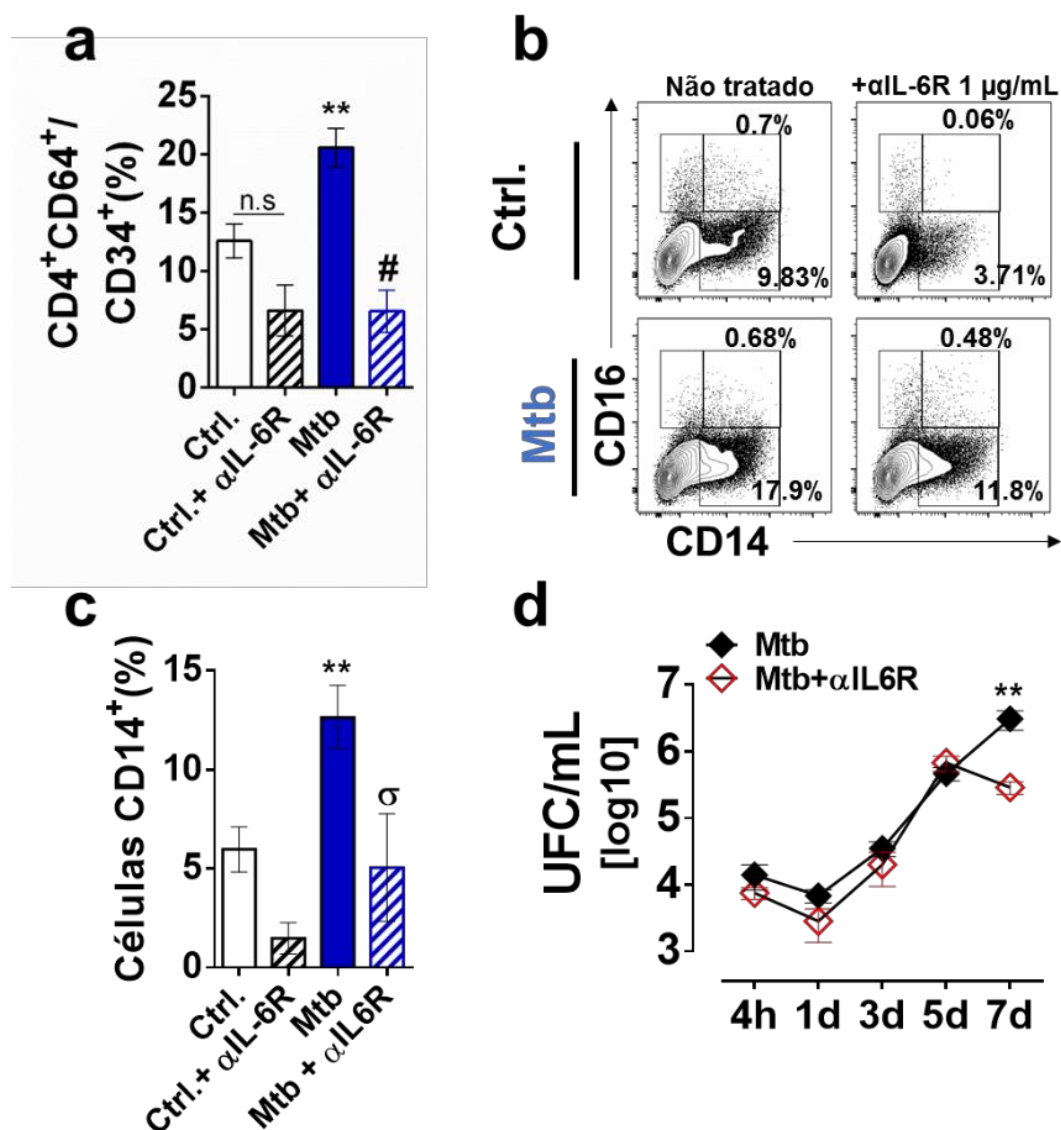


Figura 24 – A via de sinalização do IL-6R é necessária para o comprometimento mielóide, produção de monócitos e proliferação de Mtb em HSPCs. (a) Frequência de células CD4+CD64+ na população CD34+ após 5 dias de infecção. **(b)** Estratégia de *gating* na análise da produção de monócitos por HSPCs após 10 dias de infecção. Linhas representam grupo controle (Ctrl.) e infectado com Mtb MOI 3 (Mtb em azul). Colunas

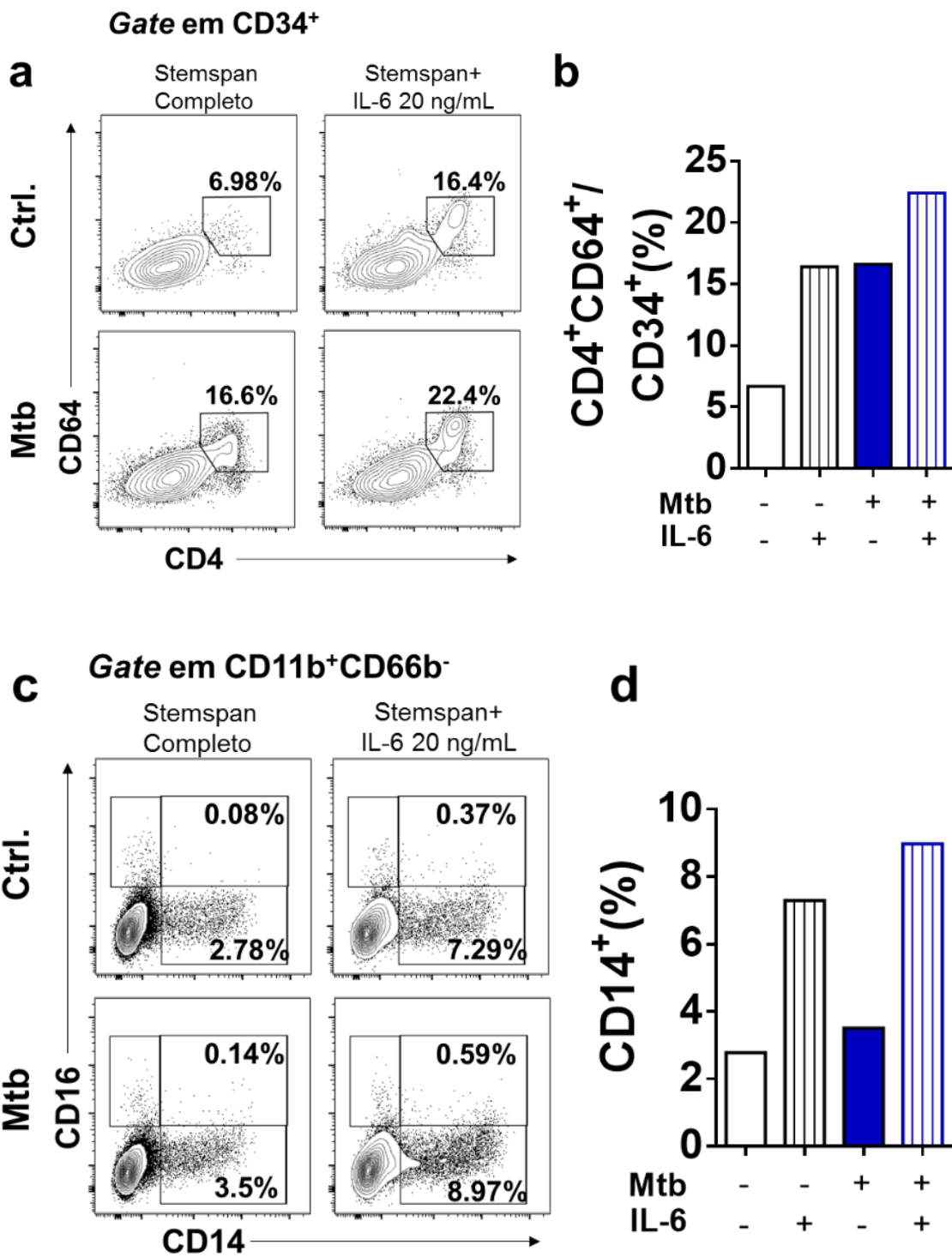
representam grupo não-tratado ou pré-tratado com anti-IL-6R. **(c)** Frequência de monócitos produzidos por HSPCs após 10 dias de cultivo. Barras abertas representam grupo controle não infectado e barras azuis representam HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Barras rachuradas representam os grupos onde HSPCs foram pré-tratadas com 1 µg/mL de anti-IL-6R. Estatística: Anova de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,001$ e $\sigma \leq 0,05$ na comparação Mtb contra Mtb+ α IL-6R. **(d)** Gráfico de linhas com a enumeração de UFCs de Mtb nos tempos de 4h a 7 dias de infecção. Losângo fechado representa HSPCs expostas a Mtb e losângo aberto vermelho representa HSPCs pré-expostas a anti-IL-6R e infectadas com Mtb MOI 3. Dados representativos do *pool* de 4 experimentos independentes, n:3.

4.13 IL-6 é suficiente para aumento em progenitores mielóides e expansão de monócitos em HSPCs frente infecção por Mtb.

HSPCs humanas se encontram preferencialmente na medula óssea, onde sua replicação e diferenciação é finamente controlada pelo somatório de fatores produzido pelo ambiente. Dessa forma, torna-se necessário a utilização desses fatores quando é necessário investigar a biologia de HSPCs fora de seu nicho [118 – 120]. Considerando a presença da citocina IL-6 no coquetel de expansão, e a inibição na mielopoiese induzida por Mtb em HSPCs frente o uso do inibidor da cadeia alfa do receptor de IL-6 (CD126) (**Figura 24**), perguntamo-nos se IL-6 é suficiente para a produção de monócitos derivados

de células CD34+ *in vitro*. Após o protocolo de expansão, células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em meio Stemspan com o coquetel de citocinas (SCF, TPO, Flt3l, IL-6 e IL-3) ou ressuspensas com o mesmo meio, porém na presença de apenas IL-6 20 ng/mL. Tendo em vista que a ausência do coquetel de citocinas pode reduzir a viabilidade das HSPCs em longos tempos de cultivo, utilizamos o tempo de 5 dias para avaliar a produção de progenitores mielóides e monócitos adultos após infecção com Mtb. Observamos que CD34+ expostas apenas a IL-6 apresentaram níveis elevados de progenitores mielóides (CD34⁺CD4⁺CD64⁺) quando comparados ao meio controle. O mesmo perfil de resposta foi observado quando HSPCs foram expostas a Mtb MOI 3 nos dois meios: níveis mais altos de progenitores mielóides foram encontrados no grupo tratado apenas com IL-6 quando comparado ao meio com o coquetel de citocinas (**Figura 25a e b**). Ao analisarmos a frequência de células CD14⁺ após 5 dias de infecção, observamos que IL-6 é suficiente na indução de monócitos por HSPCs. Novamente, culturas expostas a micobactéria na presença de IL-6 mas não das demais citocinas apresentaram níveis superiores de eventos CD14⁺ quando comparados ao meio completo (**Figura**

25c e d). No entanto, o perfil de proliferação da micobactéria não foi aumentado nas culturas expostas apenas IL-6 (**Figura 25e**). Quando observamos as populações de megacariócitos/plaquetas e progenitores eritróides, notamos a expansão dessas células no meio com IL-6 quando comparado ao meio completo (**Figura 36**). Não foi observada diferença na frequência de células dendríticas mielóides do tipo 1, enquanto frequência de granulócito foi encontrada diminuída na células cultivadas com IL-6, na ausência das demais citocinas. Esse conjunto de resultados sugere que a via do IL-6 é necessária e suficiente para a mielopoiese induzida por Mtb em HSPCs. Concluimos dessa forma que IL-6 é necessária para a expansão de progenitores mielóides e a respectiva população de monócitos adultos após infecção de HSPCs por Mtb. No entanto, hipotetizamos que outros fatores além de IL-6, produzidos durante a infecção, induzem a produção seletiva de monócitos por Mtb.



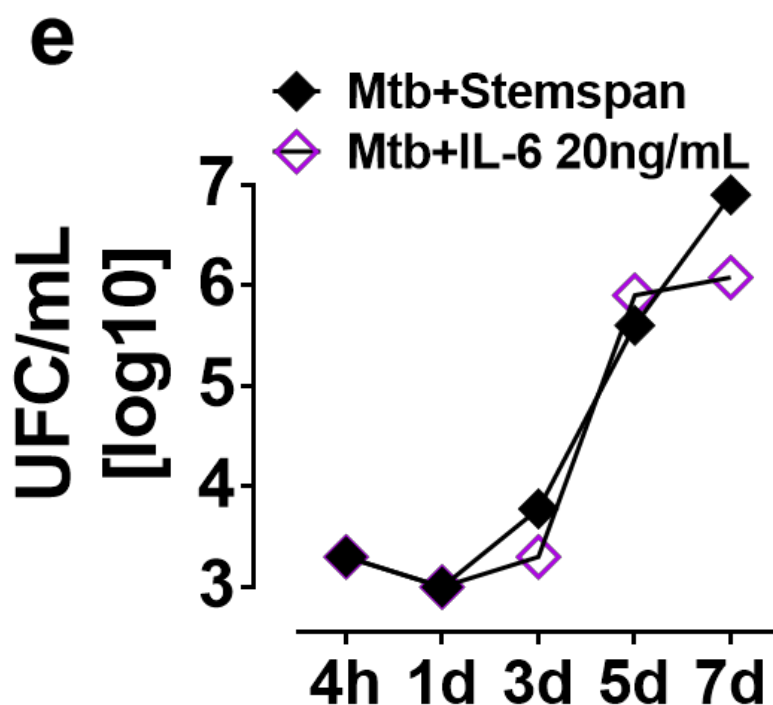


Figura 25 – A via de sinalização do IL-6R é suficiente para o comprometimento mielóide e produção de monócitos induzidos pela infecção de Mtb em HSPCs (a) Estratégia de *gating* para análise de progenitores mielóides derivados de HSPCs. Eventos CD34+ foram selecionados conforme **fig 11a** e a frequência de eventos CD4+CD64+ dentro dessa população foi enumerada. A linha Ctrl. e Mtb representam o grupo não infectado e exposto a H37Rv MOI 3 respectivamente. As colunas representam células cultivadas em meio Stemspan completo ou na presença de IL-6 apenas. **(b)** Representam gráfica dos resultados obtidos na figura **21a**. **(c)** Estratégia de *gating* para análise de monócitos produzidos por HSPCs. Eventos CD11b+CD66b- foram selecionados conforme a frequência de eventos CD14+ foi enumerada. Linhas e colunas foram organizadas da mesma forma que a figura **21a**. **(d)** Representam gráfica dos resultados demonstrados na figura **21c**. Gráfico de linhas com a enumeração de UFCs de Mtb nos tempos de 4h a 7 dias de infecção. Losângo fechado representa HSPCs expostas a Mtb no meio Stemspan completo e losângo aberto roxo representa HSPCs expostas a Mtb no meio Stemspan com adição apenas de IL-6. Dados representativos de um experimento, n:1.

5 - DISCUSSÃO

Mycobacterium tuberculosis tornou-se um patógeno altamente bem sucedido em infectar seres humanos utilizando estratégias de escape e subversão do sistema imune do hospedeiro, desenvolvidas ao longo da co-evolução dos dois organismos [3]. Após infecção inicial, alguns indivíduos progridem rapidamente para a forma ativa da doença, caracterizada por extensa proliferação bacteriana, enquanto a maior parte desenvolve o estado latente da infecção, quando 5 a 10% dos indivíduos apresentam a forma ativa anos após contato inicial [1]. Durante a fase latente, Mtb permanece em nichos que a protegem da resposta imune do hospedeiro, como em lesões granulomatosas. Recentemente, Das e colaboradores apontaram a medula de seres humanos como um nicho favorável a persistência de Mtb, infectando células tronco mesenquimais (MSCs). Nesse novo contexto, a medula e suas diversas populações celulares estariam expostas a micobactéria e seus produtos de infecção. Notavelmente, pacientes com tuberculose ativa apresentam alterações em toda a série hematopoiética, incluindo quadros de anemia, pancitopenia, hiperplasia medular,

aumento da atividade mieloide e linfopenia na medula óssea [72, 121 – 125]. Esses dados sugerem que a infecção por Mtb em seres humanos pode alterar a resposta imune em nível central, comprometendo a função de células tronco/progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) as quais são necessárias para produção das linhagens eritróide, mielóide e linfóide.

Para investigarmos como ocorre a interação de Mtb com HSPCs humanas, utilizamos dois modelos de infecção *in vitro*, sendo um proveniente de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis e outro utilizando células CD34⁺ purificadas do cordão umbilical humano. Ao avaliarmos ambos os modelos, observamos que HSPCs humanas são susceptíveis a infecção por Mtb *in vitro*. Em contraste, foi observado que HSPCs são resistentes a infecção por diversos patógenos, incluindo bactérias do gênero *Yersinia*, *Listeria* e *E. coli*, enquanto patógenos como Citomegalovírus (CMV) e vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) infectam efetivamente células CD34⁺ humanas [126 – 128]. Notavelmente, a infecção de HSPCs por esses vírus está associada a longa prevalência do patógeno no hospedeiro e respectiva reativação durante o processo de diferenciação. Dessa

forma, sugerimos que a infecção de HSPCs pode ser vantajosa ao patógeno, sendo esse fenótipo possivelmente selecionado ao longo da co-evolução do hospedeiro e agente invasor. Frente ao conceito que a infecção de HSPCs é vantajosa ao patógeno e que o processo de diferenciação celular está atrelado a reativação/disseminação do microrganismo, investigamos a dinâmica de replicação de Mtb na cultura de células CD34⁺ humanas. Observamos que as UFC/mL de Mtb permaneceram estáveis entre 4h e 3 dias de infecção. No entanto, após 5 a 7 dias de infecção os títulos de Mtb na cultura de HSPCs encontraram-se em média 1000 vezes aumentados, quando comparado ao inóculo inicial enumerado 4 horas após infecção. Para ilustrarmos esse crescimento, *cyto-spin* de HSPCs após 1, 5 e 10 dias de infecção foram preparadas e coradas pela técnica de Kynioun. Foi possível observar a expansão de Mtb nesse sistema, sendo raramente encontrada bactéria após 1 dia de infecção, enquanto esta foi progressivamente encontrada nos tempos de 5 e 10 dias de infecção. Corroborando nossos resultados, *Tornack* e colaboradores demonstraram que HSPCs humanas, preferencialmente a população CD38-CD90⁺ (HSCs quiescentes e progenitores multipotentes) circulantes de

pacientes com tuberculose latente contém Mtb em estado dormente. Quando isoladas dos pacientes, essas células são capazes de reativar a doença em camundongos imunocomprometidos Rag^{-/-}. Hipotetizamos, dessa forma, que HSPCs conferem um nicho favorável ao crescimento e disseminação do bacilo na fase ativa da doença. Em um cenário onde o hospedeiro controla a infecção, Mtb permanece no nicho da medula óssea durante a fase latente da doença. Embora demonstrado em modelo animal que HSPCs humanas podem promover a reativação da doença [129], não foi formalmente demonstrado que essa população é capaz de desempenhar a mesma função em seres humanos. A partir desse ponto, colocamos nossos esforços em compreender qual é o impacto da infecção para a biologia das HSPCs, com foco no processo de comprometimento para as diferentes linhagens.

Em virtude de sua habilidade única de promover auto-renovação e/ou diferenciação, células tronco hematopoiéticas geram progenitores multipotentes com alta capacidade proliferativa, os quais eventualmente se diferenciam nas linhagens celulares presentes no sangue e tecidos humanos [45]. Esse mecanismo é responsável por garantir que as diversas populações sejam

produzidas em equilíbrio na homeostase. No entanto, estresses como a súbita depleção de leucócitos adultos do sangue causadas por infecção, hemorragias e a produção de mediadores como IFNs, IL-1 β e IL-6 são rapidamente percebidas por HSPCs, as quais aumentam a produção de células adultas para atingir a demanda exigida [130]. Contudo, esse mecanismo compensatório também promove alterações no equilíbrio entre as linhagens mielóide, linfóide e eritróide, sendo observado o favorecimento de uma linhagem e diminuição na produção das demais. Ao observarmos que HSPCs humanas são infectadas por Mtb e que o bacilo prolifera nesse sistema, nos perguntamos se a infecção seria capaz de direcionar o comprometimento das células tronco hematopoiéticas, como a produção das respectivas células adultas *in vitro*. Usando PBMC de doadores saudáveis como modelo de infecção, analisamos a expressão de moléculas associadas ao comprometimento e estado de diferenciação. A maturação de células tronco hematopoiéticas para progenitores multipotentes é acompanhada pelo aumento da expressão de CD38 [85, 86]. Observamos que Mtb induziu um aumento em média de 10 vezes na expressão dessa molécula em eventos Lin⁻CD34⁺ após 72h,

sugerindo que a infecção está promovendo e/ou acelerando a diferenciação de HSPCs. Interessantemente, culturas tratadas com o mesmo MOI de Mtb inativada pelo calor (HK Mtb) não apresentaram o mesmo resultado. Enquanto é possível observar que a preparação HK também induz a expressão de CD38 nas HSPCs, sugerimos que o principal efeito é proveniente da atividade da bactéria viva.

Dados de Terstappen e colaboradores demonstraram que HSPCs podem ser divididas em quatro diferentes populações, baseado na expressão de CD34 e CD38. Em seu trabalho, foi constatado que durante a linfopoiese, eritropoiese e mielopoiese há um progressivo aumento na expressão de CD38 conforme as linhagens tornam-se maduras. Em diversos modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*, observou-se que infecções bacterianas e ativação de receptores do tipo TLR 2, 4 e 7 estavam associados a comprometimento mielóide ao custo da linfopoiese [92, 107, 131]. Com a hipótese dirigida de que a infecção de HSPCs por Mtb promove comprometimento mielóide, analisamos a expressão das moléculas HLA-DR, mais expressa em progenitores diferenciados, como também os receptores CD4 e CD64, ambos mais expressos em progenitores de

granulócito/monócito, enquanto negativos na linhagem megacariocítica. Em última análise, HSPCs expostas a Mtb encontram-se em um estado mais avançado de diferenciação e apresentam um fenótipo que sugere a diferenciação para linhagem de granulócito/monócito. É possível concluir que células CD34⁺ que expressam CD4 e CD64 após infecção encontram-se dentro da população que co-expressa CD38 e HLA-DR, sugerindo que Mtb promove a expansão desses progenitores *in vitro*. Neste sistema, não detectamos a expressão de CD10 em células Lin⁻CD34⁺, o que sugere a ausência de progenitores linfóides. A fim de incluir a presença de progenitores linfóides, como também ter números mais expressivos de HSPCs em nosso sistema, utilizamos a fração mononuclear da medula óssea de pacientes em acompanhamento de sua patologia de fundo, porém sem sinais de malignidade no tecido. Nas três amostras obtidas do HU – UFSC, observamos preferencialmente no tempo de 144h o aumento na expressão as moléculas analisadas nos PBMCs de doadores saudáveis, enquanto a frequência de células CD34⁺CD10⁺ encontraram-se reduzidas ao longo da cultura de forma semelhante nos três grupos. Embora não sejam estatisticamente significativos, esses resultados trazem o indício que

HSPCs humanas, presentes na medula óssea, são passíveis de ativação por Mtb *in vitro*.

O emprego de PBMCs e BMMCs humanos no modelo de infecção por Mtb *in vitro* colocam o contexto de ativação das HSPCs na presença de demais células do sistema imune como monócitos, linfócitos T, células NK e células dendríticas, um cenário mais próximo ao qual HSPCs humanas seriam ativadas *in vivo* pela micobactéria. Notavelmente, HSPCs no sangue periférico representam de 0,01 a 0,05% das células mononucleares, enquanto esses números podem chegar de 1 a 3% na medula óssea [132]. Em ambos os tecidos, populações adultas de leucócitos são predominantes em relação às células tronco e podem participar da ativação de HSPCs mediada por Mtb.

Enquanto esses resultados indicam que a infecção por Mtb direciona o comprometimento das células tronco hematopoiéticas, ele não permite a abordagem do último estágio de diferenciação das HSPCs, a geração de células adultas. A fim de acompanhar a diferenciação de HSPCs para células adultas na infecção por Mtb e explorar a hipótese que células CD34⁺ humanas são diretamente ativadas pela micobactéria, empregamos uma cultura de células CD34⁺

purificadas do cordão umbilical humano, a qual é capaz de recapitular a geração de células de todas as células da linhagem mielóide, eritróide e megacarióide *in vitro* [137]. Primeiramente, padronizamos a expansão dessas células *in vitro* na presença de um coquetel de citocinas, necessárias para sua sobrevivência e expansão. Considerando a pureza inicial das células recebidas, concluímos que a expansão por quatro dias não alterou a frequência de HSPCs.

Embora sejam populações relativamente resistentes à morte celular induzida por diversos estímulos como dano ao DNA e estresse causado pela via de sinalização TNF/Fas, infecções crônicas causadas por Herpes vírus, Epstein-Barr vírus (EBV) e CMV s estão associadas a anemia aplásicas e desordens linfoproliferativas [138 – 140]. Além de agentes virais, Matatall e colaboradores demonstraram que a infecção crônica por *Mycobacterium avium* em modelo animal leva primeiramente a expansão de progenitores mielóides, seguido pela exaustão de HSPCs em um mecanismo dependente da via de sinalização do IFN- γ . Nesse contexto, Yi e colaboradores demonstraram recentemente que o antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* presente no *locus* RD1, ESAT-6, é capaz de

induzir apoptose de células CD34⁺ humanas de forma concentração dependente. Considerando a proliferação de Mtb observada em nosso sistema como os dados previamente mencionados, investigamos primeiramente se a infecção por Mtb estaria promovendo a morte de HSPCs *in vitro*. Através da sonda de viabilidade celular fixável, FVS, observamos que a frequência de células não-viáveis aumenta ao longo da cultura, porém de forma semelhante nos grupos não infectado e controle. Além desse parâmetro, quantificamos a enzima LDH no sobrenadante de ambas as culturas. Da mesma forma, não observamos diferença nos valores quando comparado ao grupo controle. Concluímos que a infecção por Mtb no modelo *in vitro* não induz a morte de HSPCs.

Com o intuito de investigar por completo a hematopoiese na infecção por Mtb, utilizamos duas abordagens: (1) Analisar as modificações nas HSPCs na infecção por Mtb; (2) Quantificar a produção das populações de células adultas. Considerando a cinética de resposta das HSPCs a agentes infecciosos e citocinas produzidas durante a infecção, determinamos os tempos de 5 e 10 dias para avaliar as abordagens 1 e 2 respectivamente. A cinética do processo de diferenciação ocorre de forma independente da infecção, como medido

pela frequência de células CD34⁺ ao longo do tempo de cultura. No entanto, ao avaliarmos a expressão dos marcadores mielóides CD4 e CD64 nas células CD34⁺ [142], observamos após 5 dias de infecção um aumento de duas vezes na frequência de eventos CD34⁺CD4⁺CD64⁺, comparado-se ao controle. Semelhante aos dados encontrados nos modelos anteriores, esse fenótipo é parcialmente dependente da atividade da bactéria viva. Ao analisarmos eventos CD10⁺, não foi observada diferença na expressão e frequência de células positivas ao longo da infecção, sugerindo que Mtb não induz comprometimento linfóide nas HSPCs (**Figura 37**). Dessa forma, sugerimos que nos três modelos empregados, PBMC, BMMCs e CB CD34⁺, Mtb ativa diretamente células tronco/progenitores hematopoiéticas humanas, promovendo a expansão de progenitores mielóides. Considerando que células CD34⁺ representam uma população heterogênea composta por células tronco, progenitores multipotentes e progenitores já comprometidos [143], levantamos duas possíveis explicações, não excludentes, para como a infecção por Mtb leva ao aumento de progenitores mielóides *in vitro*:

- 1) Células tronco/progenitores multipotentes recebem o sinal da infecção e modificam seu programa

transcricional, restringindo o potencial das HSPCs para linhagem mielóide e 2) Mtb induz seletivamente a sobrevivência e proliferação de progenitores mielóides já presentes no sistema.

Com o objetivo de incluir em nossa análise a variabilidade biológica da bactéria, empregamos paralelamente ao experimento o isolado clínico de Mtb, denominado CS267. Cepas clínicas possuem grande diversidade quanto infectividade e também a qualidade da resposta imune induzida no hospedeiro [144]. Evidências recentes sugerem que *Mycobacterium tuberculosis*, como uma espécie, apresenta pouquíssima diversidade no genoma. No entanto, dados de sequenciamento de cepas clínicas contra a cepa laboratorial CDC1551 mostram que grandes sequências e SNPs estão presentes em genes que codificam fosfolipase C, adenilato ciclase e membros da família PE/PPE [145]. Contudo, observamos que a cepa clínica, na mesma multiplicidade de infecção, foi capaz de promover o aumento de progenitores mielóides na cultura de HSPCs de forma semelhante à cepa laboratorial H37Rv. Embora não tenhamos feito o sequenciamento do genoma do islado clínico CS267, especulamos que produtos de genes conservados na espécie

Mycobacterium tuberculosis estão envolvidos na ativação das células CD34⁺.

Progenitores mielóides têm o potencial de gerar células da linhagem granulocítica, monocítica e células dendríticas mielóides. A fim de responder quais populações de células adultas são produzidas após infecção, empregamos um painel com anticorpos contra os antígenos que foram extensivamente estudados e que identificam as respectivas populações mielóides adultas: CD66b e CD16 para neutrófilos, CD14 e CD11b para monócitos, BDCA1 associado a CD14 para células dendríticas clássicas do tipo 1 e CD41a para megacariócitos/plaquetas [88, 96, 142, 146].

Após 10 dias de infecção, a população de monócitos encontrou-se 4 vezes aumentada quando comparada ao controle não infectado, enquanto a frequência de neutrófilos foi encontrada em média 1.5 vezes aumentada, porém sem diferença estatisticamente significativa. As populações de células dendríticas e megacariócitos/plaquetas permaneceram iguais em ambos os grupos. Também avaliamos a produção de células dendríticas do tipo 2 e plasmocitóides, como a produção de células NK. Ambas populações representaram menos de 1% da amostra e estavam

semelhantes em ambos os grupos (**Figura 38**). Buscando melhor compreender a geração de monócitos por HSPCs expostas a Mtb, analisamos a expressão das moléculas CD11b, HLA-DR, CD64 e CD16. CD11b faz parte do complexo do receptor do complemento 3 (C3R) e medeia a fagocitose da micobactéria em monócitos humanos [147]. HLA-DR corresponde à molécula de MHC II em seres humanos, responsável pela apresentação de antígenos à células T CD4+. Foi demonstrado que Mtb prejudica esse processo pela diminuição da expressão de HLA-DR em monócitos humanos [133]. Esses dados foram confirmados em nossos experimentos, utilizando o modelo de infecção em PBMCs humanos (**Figura 39**). CD64 está presente em progenitores mielóides e sua expressão é mantida em monócitos após diferenciação. No trabalho de La Manna e colaboradores, foi observado que apenas pacientes com tuberculose ativa apresentam expressão aumentada de CD64 na população monocítica [75]. Em contraste, Gehring e colaboradores demonstraram que Mtb regula negativamente a resposta de células THP1 a IFN- γ , levando a prejuízo na indução de CD64 após tratamento com a citocina [148]. Por fim, a expressão de CD16, juntamente com CD64, foi encontrado aumentado em monócitos de pacientes com

tuberculose ativa. No trabalho de Lastrucci e colaboradores, observou-se a expansão de monócitos CD16⁺ durante Tuberculose, os quais adquirem propriedades imunomodulatórias através do eixo IL-10/STAT3. Notavelmente, em monócitos derivados de HSPCs expostas a Mtb, não observamos diferença no MFI das respectivas proteínas de superfícies descritas anteriormente. Contudo, ao avaliarmos a frequência de células CD14⁺CD16⁺, notamos que culturas infectadas pela micobactéria apresentaram números superiores dessa população em alguns experimentos. Experimentos conduzidos em seres humanos com glucose radiotiva descreveram que populações de monócitos CD16⁺ são, como um todo, ausentes na medula óssea humana. Três dias após a geração de monócitos, células CD14⁺CD16⁺ aparecem no sangue periférico e seguem dois possíveis destinos; migração para tecidos ou apoptose [101]. Dessa forma, sugere-se que monócitos CD16⁺ correspondem a um estado mais avançado de diferenciação em relação à população CD14⁺CD16⁻.

Frente aos dados apresentados, estabelecemos um modelo para estudar a hematopoiese humana na infecção pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis*.

Apresentamos evidências que HSPCs são infectadas por Mtb e representam um nicho favorável ao crescimento da bactéria. Como resultado, HSPCs iniciam rapidamente um programa de diferenciação o qual resulta no aumento da produção de monócitos. No entanto, a pergunta “Como *Mycobacterium tuberculosis* regula a produção de monócitos por HSPCs?” permanecia não respondida. Buscando acumular evidências que indiquem a resposta, optamos inicialmente por extrair RNA de HSPCs expostas a Mtb nos tempos de 1, 3 e 5 dias após infecção e analisar o perfil transcricional por sequenciamento do mRNA na plataforma Illumina. Primeiramente, com o objetivo de confirmar que Mtb induz a diferenciação de HSPCs para Monócitos, empregamos o software Cellnet na análise do transcriptoma de células CD34⁺ expostas a micobactéria. Através do transcriptoma de diferentes tipos celulares purificados depositados em plataformas de livre acesso, incluindo HSPCs, monócitos, linfócitos T, hepatócitos, células musculares, o software estima, a partir de uma população de células tronco, qual a eficiência da conversão para uma linhagem adulta. Também é possível deduzir que as células adultas geradas nesse processo mantêm um perfil transcricional semelhante a respectiva população isolada *in vivo* [103].

Utilizando da vantagem do *Cellnet* em estimar a conversão de células tronco para uma determinada população de células adulta a partir do transcriptoma, analisamos a distribuição dos transcritos em nosso experimento. Notavelmente, observamos após 5 dias de infecção o aumento em transcritos que identificam monócitos/macrófagos humanos apenas nas amostras expostas a Mtb. Também é possível observar que a densidade de transcritos de HSPCs encontram-se reduzidos no grupo infectado, sugerindo processo de diferenciação induzido pela infecção. De forma importante, não foram detectados transcritos de células dendríticas e nem de linfócitos B e T em ambos os grupos. Ao todo, apresentamos evidências a nível transcricional e protéico que HSPCs diferenciam-se para monócitos após infecção por Mtb.

Além da aplicação *Cellnet*, empregamos a análise de *Gene Ontology*, a qual permite enumerar os processos biológicos enriquecidos em um determinado conjunto de dados. Analisando os genes positivamente regulados em HSPCs expostas a Mtb (*Threshold* 1,5 \log_2) encontramos os processo relacionados a sinalização de interferons do tipo 1, apresentação de antígenos, regulação da cascata de ERK1 e ERK2 e ativação de citocinas inflamatórias,

representado por IL-1 β , TNF e importação de NF κ B para o núcleo. Dentre esses, a via de sinalização de IFN α/β destacou-se por ter o maior número de genes enriquecidos e conseqüente menor *false discovery rate*.

O papel de IFNs do tipo I foi extensivamente estudado em infecções virais [149, 150], enquanto que seus aspectos nas infecções causadas por Mtb permanecem não totalmente elucidados. Enquanto dados apontam que a resposta desencadeada por IFNs do tipo I é importante para o controle de infecções virais e infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes*, na infecção por Mtb IFNs do tipo I estão associados a prejuízo no controle da infecção [151]. Nesse contexto, Dorhoi e colaboradores demonstraram que camundongos IFNAR^{-/-} controlam melhor a infecção por Mtb quando comparados aos animais *wild type*. Zhang e colaboradores demonstraram em humanos que a deleção da prolina 335 do receptor IFNAR1 prejudica a sinalização do IFN β e promove resistência a tuberculose e em contraste, maior susceptibilidade a hepatite viral. Nesse mesmo cenário, Feng e colaboradores demonstraram que IFNs do tipo I, produzidos após infecção por Mtb, suprimem a produção de IL-1 β em macrófagos humanos e dos Santos e colaboradores

demonstraram que o gene induzido por IFNs do tipo I, *Isg15*, é capaz de promover resposta imunomodulatória através da indução de IL-10 em monócitos humanos, sendo o eixo ISG15 – IL-10 rompido em pacientes com Tuberculose latente, no qual a expressão de *Isg15* correlaciona positivamente com fatores relacionados a severidade da doença. Foi também observado que apenas as populações granulocíticas e monocítica de seres humanos com tuberculose ativa apresentam uma assinatura gênica do tipo IFN α / β /STAT1 [108]. IFNs do tipo I apresentam diferentes funções no sistema hematopoiético, onde normalmente foi observada a supressão da hematopoiese em seres humanos. Contudo, dados recentes apontam que IFN α é capaz de promover a ativação de HSCs quiescentes enquanto inibe a proliferação de progenitores comprometidos [37]. Buechler e colaboradores demonstraram que IFNs do tipo I participam da mielopoiese induzida pelo agonista do receptor TLR7, R848 [109]. Dessa forma, levantamos a hipótese que a sinalização por IFNs do tipo I participa do processo de monocitopoiese induzida por Mtb em HSPCs.

Para abordarmos essa hipótese, observamos os valores de expressão, em z-score, de genes regulados

por IFN (ISGs – lista obtida conforme seção materiais e métodos) no transcriptoma das HSPCs. A utilização do z-score possibilita a observação dos valores de expressão nos grupos não-infectados, como a respectiva cinética de expressão nos tempos de 1, 3 e 5 dias. Concluímos que, ao longo do tempo, ocorre um aumento na expressão de ISGs no grupo exposto a Mtb. Esses resultados foram confirmados por qPCR, analisando a expressão dos genes Mx1 e ISG15, classicamente induzidos por IFNs do tipo I [150]. Analisamos a expressão do gene IFI16, classicamente induzido por IFN do tipo II, sendo este regulado positivamente em apenas um dos doadores pós-infecção [156]. Por fim, western blot do conteúdo total de proteínas de HSPCs expostas a Mtb por 5 dias mostra aumento nos níveis de pSTAT1 Y701, fator de transcrição que quando fosforilado se liga à pSTAT2 e IRF9, formando o complexo ISGF3 na sinalização de IFNAR1/2 [157]. pSTAT1 também forma homodímeros e liga-se a elementos cGAS no genoma das células ativadas via IFNGR [158]. Frente ao conjunto de resultados, sugerimos que a via de sinalização IFN α / β /STAT1 está ativada em HSPCs expostas a Mtb.

A fim de investigar o papel da via IFN α / β /STAT1 na mielopoiese induzida por Mtb, empregamos em nosso

sistema *in vitro* um anticorpo neutralizante anti-IFNAR2, o qual bloqueia a sinalização canônica dos interferons α e β [159]. HSPCs pré-tratadas com o anticorpo foram infectadas com Mtb MOI 3 e nos tempos de 5 e 10 dias a produção de progenitores mielóides e células adultas foram avaliadas respectivamente. Observamos que o bloqueio do receptor não modificou a indução de progenitores mielóides e como consequência, o aumento na produção de monócitos foi observado na cultura de HSPCs infectadas, na presença ou ausência do anti-IFNAR2. Embora não tenhamos observado diferença na produção de células mielóides, consideramos que a sinalização via IFNAR2 poderia estar envolvida com a proliferação do patógeno nas HSPCs. Camundongos knockout para o receptor IFNAR1 apresentam números reduzidos de carga bacilar e a hiperindução de IFNs em modelo animal está associada ao crescimento bacteriano e exacerbação da doença [160]. Para investigarmos o papel da via do receptor IFNAR2 no crescimento de Mtb em HSPCs, células foram pré-tratadas com anticorpo neutralizante e cinética de crescimento foi enumerada através de UFC/mL. Oposto a hipótese levantada, não foram detectadas diferenças no perfil de crescimento de Mtb em HSPCs pré-tratadas com anticorpo, quando

comparadas às células sem tratamento. Esses dados sugerem que a via de sinalização IFN α / β /STAT1 está presente em HSPCs expostas a Mtb, porém a sinalização de IFNAR2, necessário para a ativação canônica da via dos interferons do tipo I, não está envolvida com a mielopoiese e crescimento de Mtb na cultura de células CD34⁺.

Apesar de STAT1 ser um fator de transcrição comumente associado a sinalização dos IFNs do tipo I, demais citocinas utilizam essa molécula para promover a transcrição de genes, como IFN- γ , IL-6, IL-21 and IL-27 [65]. Considerando que a mielopoiese induzida pelo patógeno *Ehrlichia muris* em modelo animal demonstrou-se criticamente dependente de IFN- γ [161], que o tratamento com IFN- γ promove a expansão de monócitos e inibição de neutrófilos durante inflamação [162] e que camundongos deficientes no gene Lrg-47 (Gene estimulado por IFN- γ) apresentam prejuízo na expansão de leucócitos após ablação química ou estímulo infeccioso via *Mycobacterium avium* [163], hipotetizamos que IFN- γ está envolvido na mielopoiese induzida por Mtb em HSPCs humanas *in vitro*. Como ferramenta para abordar essa hipótese, utilizamos o anticorpo neutralizante anti-IFN- γ previamente à infecção, o qual

impede a atividade biológica da citocina. Quantificando progenitores mielóides e monócitos nos tempos de 5 e 10 dias de infecção, concluímos que IFN- γ é dispensável para a ativação de HSPCs por Mtb. Demonstramos, da mesma forma para o receptor IFNAR2, que IFN- γ não está envolvido com o crescimento da micobactéria nesse sistema. Levando em conta a ausência de células da linhagem linfóide, como células T e células NK as quais produzem IFN- γ pós estímulo infeccioso [164], consideramos que esta citocina não seria produzida no modelo *in vitro* com HSPCs. Esses dados foram confirmados utilizando a metodologia de ELISA, onde não foi detectada a citocina em nenhum dos grupos e tempos avaliados (**Figura 40**). Em conjunto, afirmamos que a via de sinalização dos IFNs do tipo I e II não estão envolvidas no fenótipo observado após infecção das HSPCs por Mtb.

Buscando encontrar o mecanismo responsável pela mielopoiese induzida em células CD34⁺ humanas após infecção por Mtb, focamos em investigar demais citocinas que desempenham esse papel e são induzidas em seres humanos na fase ativa da doença. Dentre o conjunto de citocinas que satisfazem ambas as condições, destacou-se IL-6 por apresentar STAT1 em sua via de sinalização [65], por regular a mielopoiese na

resposta de HSPCs a DAMPs através de progenitores multipotentes [63] e por se encontrar aumentada no soro, escarro e em macrófagos de pacientes com tuberculose ativa [111 – 113]. Embora tenha sido demonstrado que camundongos KO para IL-6R desenvolvem Tuberculose letal [165], Nagabhushanam e colaboradores demonstraram que IL-6 pode também prejudicar o controle da infecção, através do bloqueio de autofagia mediada por IFN- γ . Macrófagos humanos são capazes de produzir IL-6 frente à infecção por Mtb de diferentes formas, sendo demonstrado que o ligante de TLR2 de Mtb Ara-LAM induz a produção de IL-6 via C/EBP β e NF κ B p50 [115], enquanto o antígeno ESAT-6 promove a secreção da citocina através do fator de transcrição STAT3 [113]. A produção de IL-6 também é observada na cultura de células *Max Plack Institute*, as quais têm alta semelhança com macrófagos alveolares humanos, sugerindo que essa citocina é rapidamente produzida após o reconhecimento do patógeno e seus antígenos pelo sistema imune [167]. Sabendo-se que progenitores multipotentes são capazes de produzir IL-6 após estímulo com DAMP [63], perguntamo-nos se a citocina está presente nas HSPCs após infecção nos níveis de transcritos e proteína. Observamos que em nível

transcricional, a cultura de HSPCs apresentam níveis elevados de mRNA para IL-6 nos tempos de 1, 3 e 5 dias de infecção. Contudo, concentração proteica detectada por ELISA mostra diferença apenas nos tempos iniciais de cultura, onde as concentrações de IL-6 normalizam em 5 e 10 dias em relação ao controle. Notamos que IL-6 também foi detectada no grupo controle, pois essa citocina faz parte do coquetel inicial necessário para manutenção e sobrevivência das HSPCs humanas *in vitro*.

Buscando compreender a via de sinalização de IL-6 nas HSPCs, analisamos por western blot o fator de transcrição STAT3. STAT3 está presente na sinalização canônica de IL-6R, onde após ativação do receptor ocorre a fosforilação dos resíduos de tirosina na posição 705, permitindo a migração de homodímeros de STAT3 para o núcleo da célula [114]. Oposto aos resultados de qPCR e ELISA para IL-6, foram detectados níveis baixos e semelhantes de pSTAT3 fosforilado após 5 dias de infecção. Supreendentemente, níveis da proteína total não fosforilada também encontraram-se reduzidos nos extratos de HSPCs expostas a Mtb, sugerindo que Mtb pode regular negativamente essa via. No entanto, ao avaliarmos o fator de transcrição C/EBP β , observamos

notável aumento nos níveis da isoforma LAP, responsável por promover a produção de IL-6 em macrófagos estimulados com Ara-LAM. Além disso, C/EBP β apresenta uma ligação direta com a mielopoiese em humanos, onde o silenciamento desse gene em células CD34⁺ provocou redução na produção de células mielóides CD11b⁺, mas não alterou a geração de células CD235a⁺ da linhagem eritróide [49]. Com maior relevância para nosso trabalho, Hirai e colaboradores demonstraram que C/EBP β é necessário para a mielopoiese de emergência na infecção por *Candida albicans* em modelo animal. Embora num contexto onde não foi observada ativação de STAT3 após infecção, notamos que genes regulados positivamente por IL-6 foram encontrados aumentados no transcriptoma de HSPCs infectadas por Mtb, especialmente nos períodos de 3 e 5 dias após infecção. Em suma, esses dados sugerem que a via de sinalização de IL-6 está ativa nas HSPCs infectadas por Mtb. Utilizando do mesmo *rationale* para as citocinas IFN α/β e IFN- γ , analisamos a contribuição da via de sinalização do receptor de IL-6 na mielopoiese e crescimento de Mtb em HSPCs.

Tomando vantagem do anticorpo anti-IL-6R (anti-CD126), o qual bloqueia seletivamente a via de

sinalização do IL-6 mas não das demais citocinas pertencentes à mesma família como IL-11, Osteopontin, CNTF, LIF e IL-27, empregamos a inibição de IL-6R nas culturas de HSPCs prévio a infecção por Mtb [117]. Notavelmente, observamos que a indução de progenitores mielóides, analisadas através da frequência de células CD4⁺CD64⁺/CD34⁺ foi completamente inibida quando culturas receberam o anticorpo neutralizante na presença de Mtb. Observamos também, que em culturas não infectadas, onde há a geração basal desses progenitores, a inibição de IL-6R resultou na redução nos níveis dessa população, porém de forma não estatisticamente significativa. A fim de responder se a inibição do receptor de IL-6 também afetava a produção de monócitos por HSPCs, quantificamos a frequência de células CD14⁺ após 10 dias de infecção, na presença e ausência de anti-IL-6R. Corroborando dados encontrados com os progenitores mielóides, a indução de monócitos por Mtb foi totalmente inibida em culturas expostas a bactéria na presença do anticorpo neutralizante. Da mesma forma, níveis basais de monócitos também foram encontrados reduzidos nos grupos tratados com tocilizumab. Notavelmente, ao longo do defeito na produção de progenitores mielóides e monócitos,

observamos também a redução no crescimento de Mtb após 7 dias nas culturas tratadas com anticorpo neutralizante. Ao todo, sugerimos que a mielopoiese induzida por Mtb é dependente da sinalização de IL-6R, assim como seu crescimento na cultura de HSPCs em tempos tardios. Hipotetizamos que a micobactéria “sequestra” essa via, onde a geração de monócitos por HSPCs através da sinalização de IL-6 favorece seu crescimento e possível disseminação.

Por fim, perguntamo-nos se IL-6 é suficiente para o fenótipo que observamos durante a infecção de HSPCs por Mtb. Após protocolo de expansão, células foram lavadas e resuspendidas em Stemspan completo na presença do coquetel de citocinas, ou em Stemspan na presença apenas de IL-6 20 ng/mL, concentração próxima da citocina encontrada no coquetel. Não empregamos o controle Stemspan na ausência de citocinas, pois observamos valores elevados de morte celular nos tempos de 3 e 5 dias, na ausência de infecção. Enquanto os níveis de progenitores mielóides encontraram-se próximos a 7% no grupo controle, notamos que ambas a adição de IL-6 exógena como a infecção por Mtb em células cultivadas com meio completo levaram em média ao dobro na quantificação de

progenitores mielóides. Da mesma forma, observamos um discreto efeito aditivo em células CD34⁺ infectadas com Mtb e cultivadas em meio contendo apenas IL-6. Considerando que não tínhamos informação sobre a sobrevivência de HSPCs na presença de apenas IL-6, avaliamos a produção de monócitos no tempo de 5 dias, junto aos progenitores mielóides. Nesse intervalo, não foi observada indução significativa de monócitos pela infecção. No entanto, observamos que a adição exôgena de IL-6, na ausência de demais citocinas, foi suficiente para promover aumento na produção de células CD14⁺, quando comparado ao meio completo. Por último, perguntamo-nos se células incubadas com IL-6 na ausência das demais citocinas promoveriam o crescimento de Mtb de forma semelhante ao meio completo. Notamos que até o tempo de 5 dias, o perfil de crescimento foi igual, onde no tempo de 7d observamos uma redução próxima a 1 log no crescimento da bactéria em meio com IL-6. Sugerimos que IL-6 é tanto necessária quanto suficiente para a indução de progenitores mielóides e produção de monócitos por HSPCs, na infecção pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Observamos que a proliferação da bactéria em tempos tardios dependente da sinalização de IL-6R.

Curiosamente, observamos que culturas que continham apenas IL-6 como citocina apresentaram densidades menores de células quando comparadas ao meio controle. Especulamos que a proliferação celular, possivelmente desencadeada pelas citocinas do coquetel, têm um papel na proliferação de Mtb na cultura de HSPCs *in vitro*.

Hipotetizamos que durante a fase ativa da Tuberculose, Mtb livre atinge a medula óssea humana através da circulação ou pela infecção de células com potencial migratório para esse tecido. Uma vez na medula óssea, Mtb infecta células tronco/progenitoras hematopoiéticas, promovendo o comprometimento dessa população para a linhagem mielóide. Como resultado, há um aumento na produção de monócitos, em que sugerimos que o fenótipo ocorre de forma dependente à sinalização do receptor de IL-6. Assim como o aumento em progenitores mielóides e monócitos adultos, a proliferação de Mtb é diretamente ou indiretamente dependente da via de IL-6R. Além dessa via, notamos que a sinalização por IFNs do tipo I/STAT1 também está presente em HSPCs expostas a Mtb. Especulamos que a assinatura de IFNs do tipo I em neutrófilos e monócitos humanos dos pacientes com TB ativa é resultado da

ativação dessa via em progenitores mielóides na medula óssea humana. Enquanto que a pré-exposição a BCG promove “imunidade treinada” em macrófagos, através de modificações epigenéticas em progenitores mielóides [168], discutimos que a exposição de HSPCs a Mtb pode resultar na produção de células mielóides que são mais susceptíveis ao patógeno, estando essas relacionadas à proliferação e disseminação da bactéria. Ao todo, o presente trabalho chama atenção das HSPCs humanas como uma população de células relevante na resposta a *Mycobacterium tuberculosis*, acrescentando uma camada a mais de complexidade nas estratégias adotadas pela micobactéria na subversão da resposta imune do hospedeiro e propagação em seres humanos.

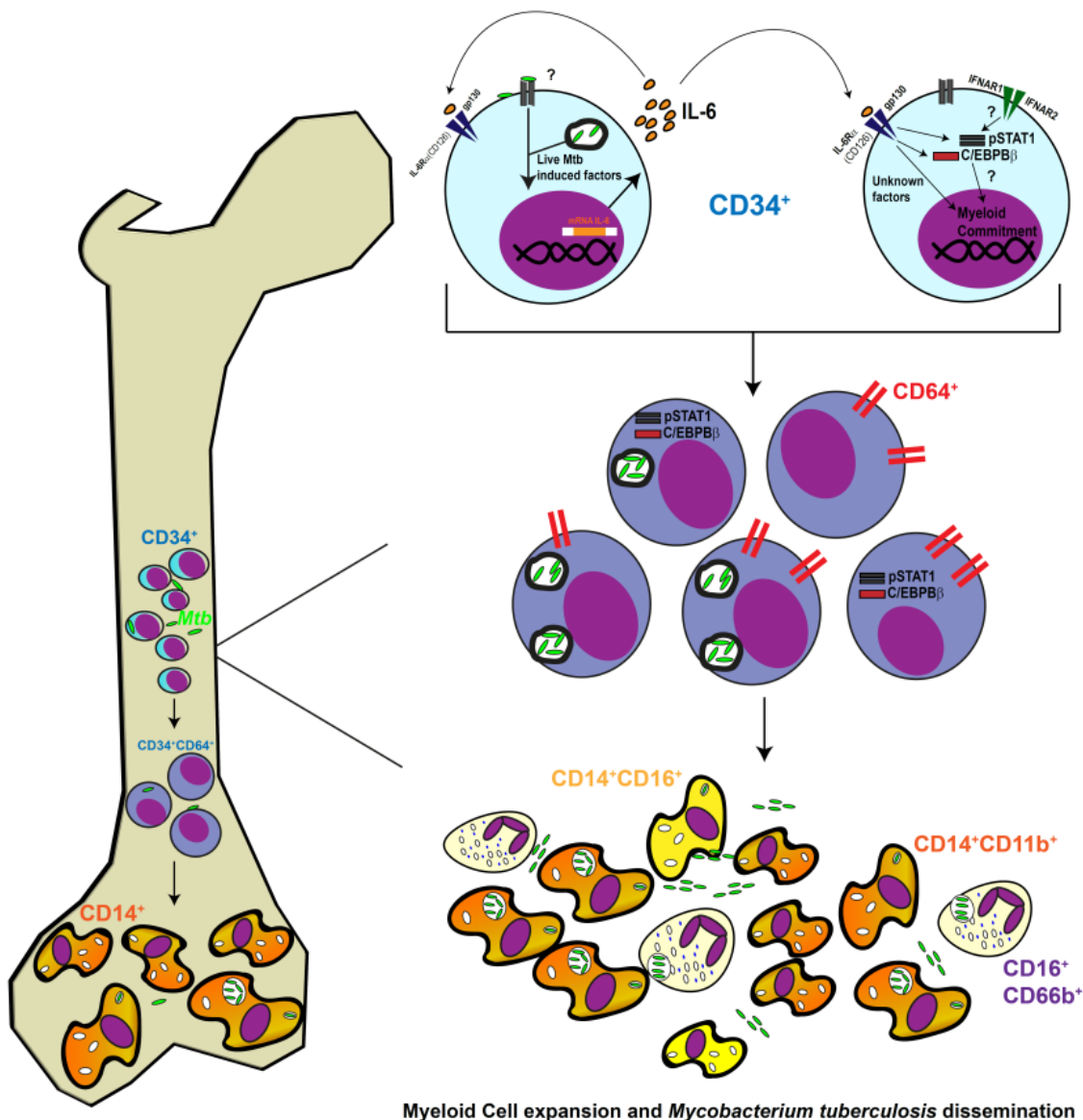


Figura 26 – Hipótese para disseminação de Mtb através do mecanismo de Mielopoiese humana. HSPCs respondem rapidamente a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* através da produção da citocina IL-6. Sugerimos que IL-6 atua de forma autócrina e parácrina em HSPCs, levando a aumento nos níveis de C/EBPβ e pSTAT1. *Mycobacterium tuberculosis* promove o aumento em progenitores mielóides CD34⁺CD4⁺CD64⁺ em um mecanismo dependente de IL-6, levando a maior produção de monócitos (CD14⁺) e em menor número, neutrófilos (CD16⁺CD66b⁺) após infecção. A produção de ambas populações *in vitro* frente a infecção pela micobactéria também demonstrou-se dependente da sinalização de IL-6. Em paralelo ao comprometimento mielóide, observa-se a proliferação de Mtb, sugerindo que a disseminação da micobactéria

pode estar relacionada a expansão de células mielóides humanas a partir de Células tronco/progenitoras hematopoiéticas.

6 - CONCLUSÕES

Concluimos com os dados apresentados que células tronco hematopoiéticas humanas são susceptíveis à infecção pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Concluimos que a cultura de HSPCs não promove o controle da infecção, observado pela contínua proliferação da bactéria nesse sistema. Paralelo a proliferação de Mtb, HSPCs diferenciam-se preferencialmente para linhagem mielóide. A diferenciação é acompanhada pelo aumento de progenitores mielóides e subsequente maior produção de monócitos e em menor extensão, granulócitos. Duas principais vias de sinalização foram identificadas em HSPCs após infecção por Mtb: IFN tipo I/STAT1 e IL-6/C/EBP β . Observamos que a via de sinalização do IL-6 é necessária para o comprometimento mielóide e proliferação de Mtb em HSPCs, ao contrário da via do IFNAR2. Em suma, sugerimos que o patógeno *Mycobacterium tuberculosis* subverte a resposta imune do hospedeiro ao explorar a produção de células mielóides por HSPCs, preferencialmente monócitos, em um mecanismo dependente da sinalização de IL-6.

7 - ANEXO

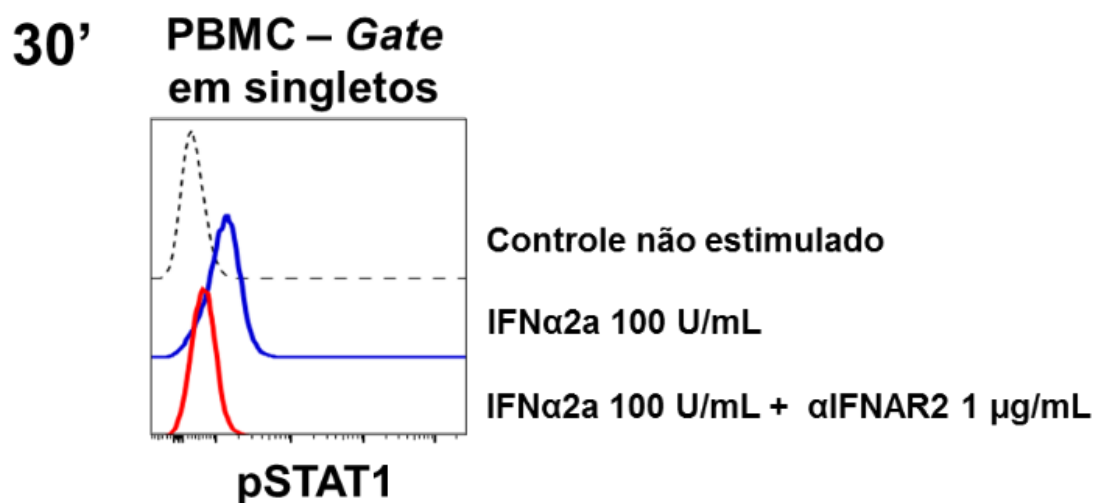


Figura 27. Controle da inibição dos receptores IFNAR2 em PBMC humano. Histograma representativo ilustra a fosforilação de STAT1 em Y701 no grupo controle não estimulado (linha pontilhada), em PBMC estimulado por 30' com IFN α 2a 100 U/mL (linha azul) e em células pré-tratadas por 1 hora com α IFNAR2a 1 μ g/mL e estimuladas com IFN α 2a 100U/mL por 30'. Dados de 3 experimentos independentes, n:3.

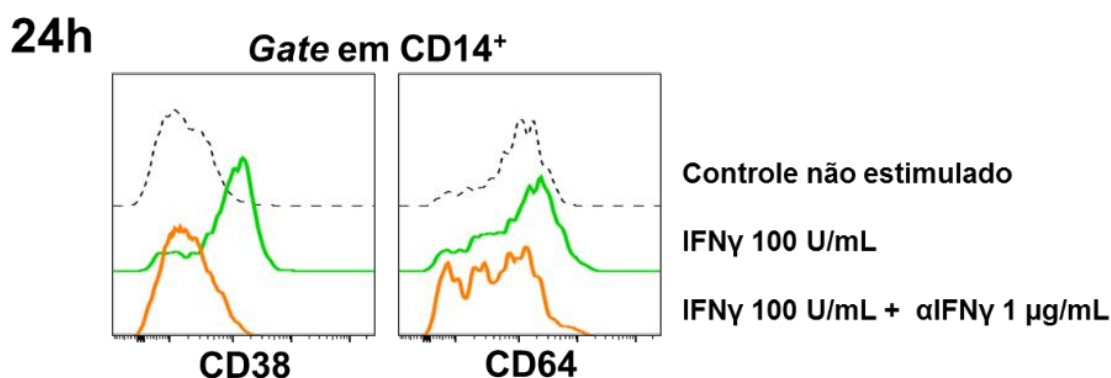


Figura 28. Controle da inibição de IFN γ em PBMC humano. Histograma representativo ilustra a expressão de CD38 e CD64 em células CD14⁺ do PBMC após 24h. Linha tracejada representa a expressão do grupo controle não estimulado, linha verde representa células tratadas com IFN γ 100U/mL por 24h e linha laranja representa PBMC pré-tratado por 1h com α IFN γ 1 μ g/mL e estimuladas com IFN γ 100U/mL por 24h. Dados de 3 experimentos independentes, n:3.

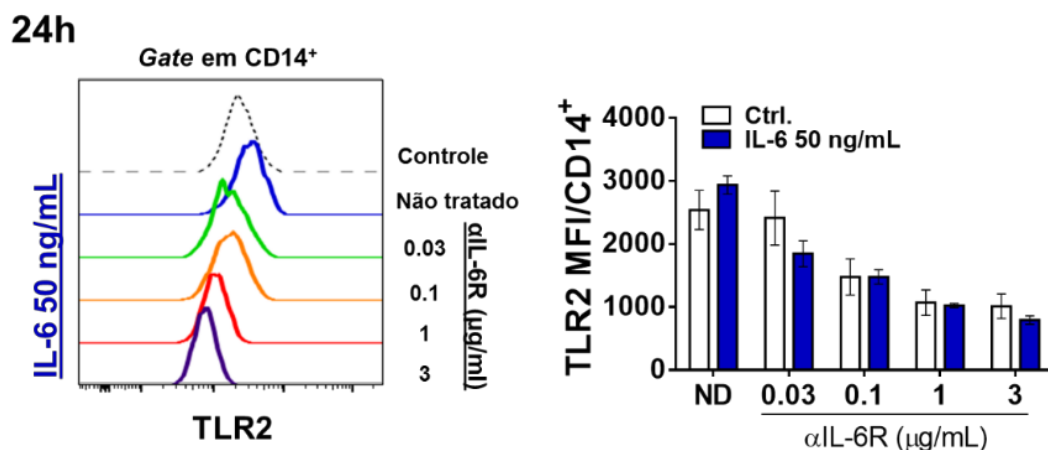


Figura 29 – Controle da inibição de IL-6R (CD126) em PBMC humano. Histograma representativo apresenta a expressão do receptor TLR2 em células CD14⁺ do PBMC após 24h. Linha tracejada representa a expressão no grupo controle não estimulado. Linha azul representa a expressão de TLR2 em PBMC estimulado com 50 ng/mL de IL-6 por 24h. Linhas verde, laranja, vermelho e roxo representam PBMCs pré-tratadas por 1h com concentrações crescentes de α IL-6R e estimuladas por 24h com IL-6 na concentração de 50 ng/mL. Gráfico de barras expressa os resultados da expressão de TLR2, em MFI, de doadores independentes. Barras abertas representam controle não-tratado e barra azul representa PBMC tratado com IL-6 50ng/mL. ND representa grupo não tratado com α IL-6R e números crescentes representam a concentração que o anticorpo neutralizante foi adicionado. Símbolos representam média e erro representam EPM. Dados de 2 experimentos independentes, n:3.

72h

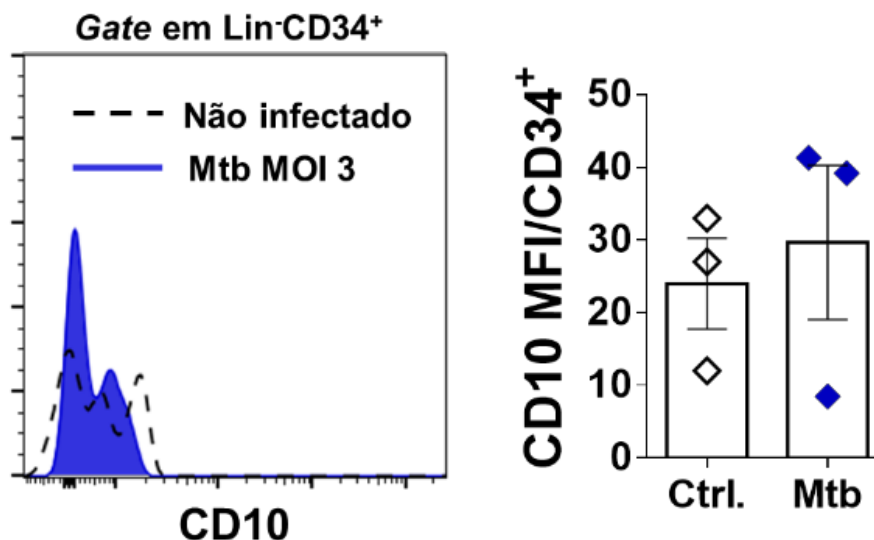


Figura 30. Expressão de CD10 em células Lin-CD34⁺ do PBMC humano. Eventos Lin-CD34⁺ foram analisados para a expressão de CD10 após 72h. Histograma apresenta o MFI para CD10 no grupo controle não infectado (linha tracejada) e no grupo infectado com Mtb MOI 3 (Linha azul preenchida). Gráfico de barras com símbolos demonstra os valores de expressão para CD10. Símbolos representam diferentes doadores, barras representam média e erro representa EPM. Dado representativo de 1 experimento, n:3.

5d

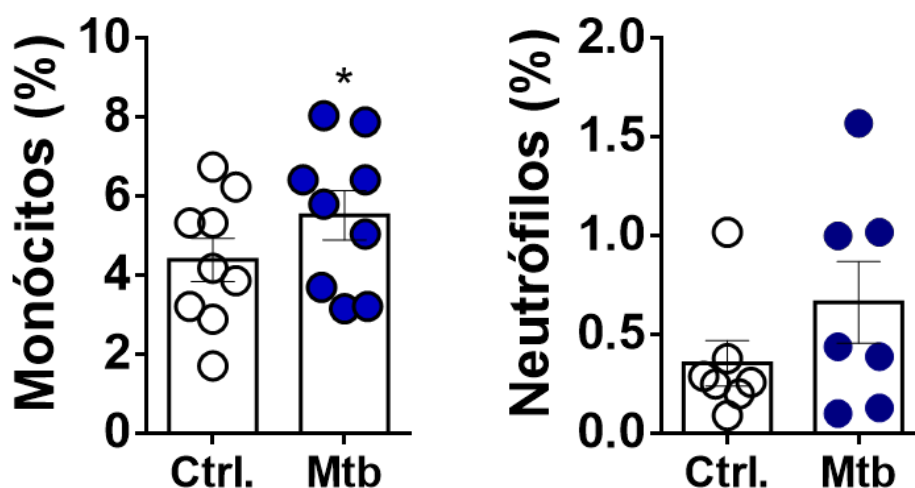


Figura 31. Frequência de monócitos e neutrófilos produzidos por HSPCs após 5 dias de infecção. Gráficos de barras com símbolos mostram a frequência de monócitos (CD14⁺CD11b⁺CD66b⁻) e neutrófilos (CD11b⁺CD16⁺CD66b⁺) em cultura de células CD34⁺ após 5 dias de infecção com Mtb. Símbolos

representam experimentos distintos, barras representam média e erro representa EPM. Círculo aberto: controle não infectado. Círculo azul: HSPCs infectado com Mtb MOI 3. Estatística: Teste T pareado. * $p \leq 0,05$. Dados representativos do pool de 7-8 experimentos independentes, n:5.

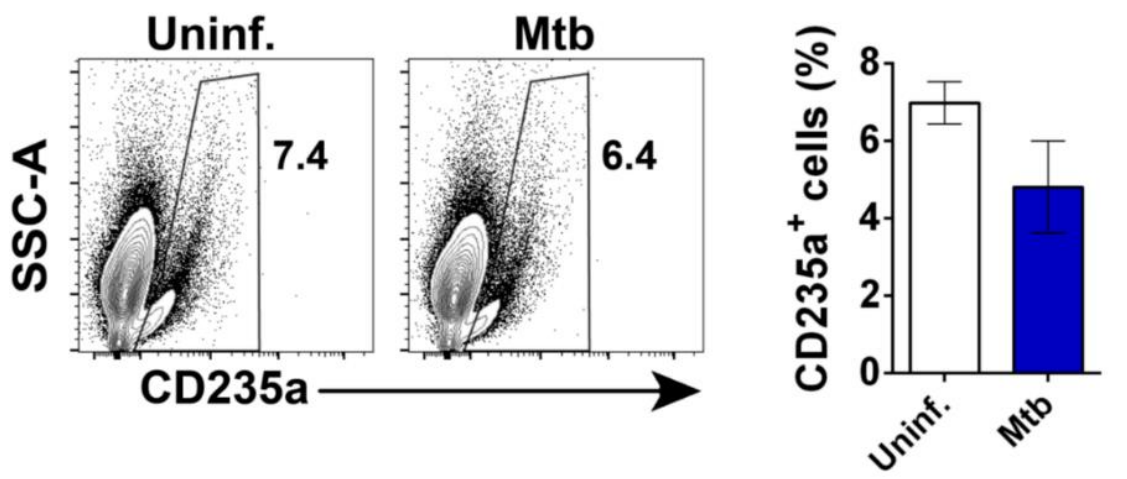


Figura 32. Frequência de células eritróide CD235a+ em HSPCs expostas a Mtb. Estratégia de *gating* para seleção de células eritróides. Eventos com valores baixos para SSC-A e positivos para CD235a+ foram selecionados na cultura de HSPCs após 10 dias. Barras abertas representam controle não infectado, barras azuis representam HSPCs expostas a Mtb MOI 3 e barras rachuradas representam HSPCs pré-tratadas com α IFNAR2 e expostas a Mtb. Eventos foram avaliados após 10 dias de cultura. Dado representativo de três experimento, n:3

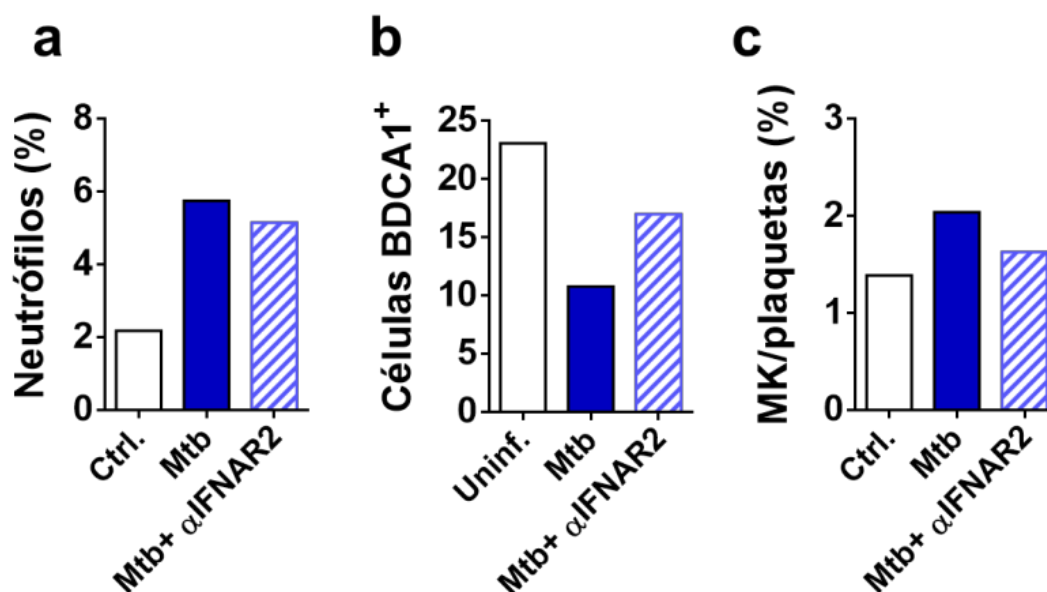


Figura 33. Frequ3ncia de neutr3filos, c3lulas dendr3ticas miel3ides tipo 1 e megacari3citos/plaquetas na cultura de HSPCs expostas a Mtb e α IFNAR2. Barras abertas representam controle n3o infectado, barras azuis representam HSPCs expostas a Mtb MOI 3 e barras rachuradas representam HSPCs pr3-tratadas com α IFNAR2 e expostas a Mtb. Eventos foram avaliados ap3s 10 dias de cultura. Dado representativo de um experimento, n:1.

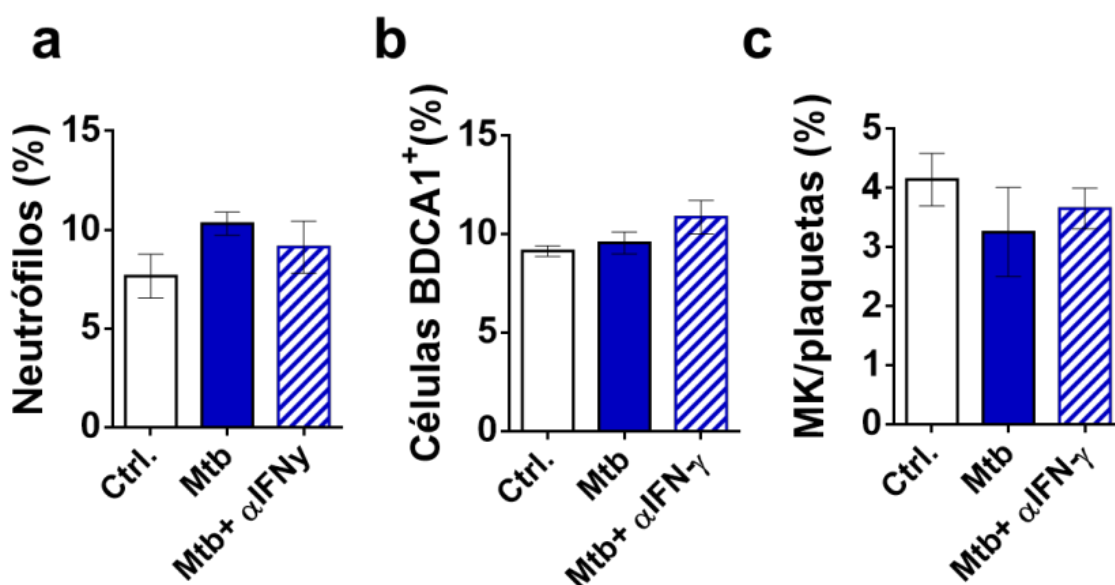


Figura 34. Frequ3ncia de neutr3filos, c3lulas dendr3ticas miel3ides tipo 1 e megacari3citos/plaquetas na cultura de HSPCs expostas a Mtb na presen3a de α IFN- γ . Barras abertas representem controle n3o infectado, barras azuis representam HSPCs expostas a Mtb MOI 3 e barras rachuradas representam

HSPCs pré-tratadas com α IFN- γ e exposta a Mtb . Eventos foram avaliados após 10 dias de cultura. Dados representativos de dois experimentos independentes, n:2.

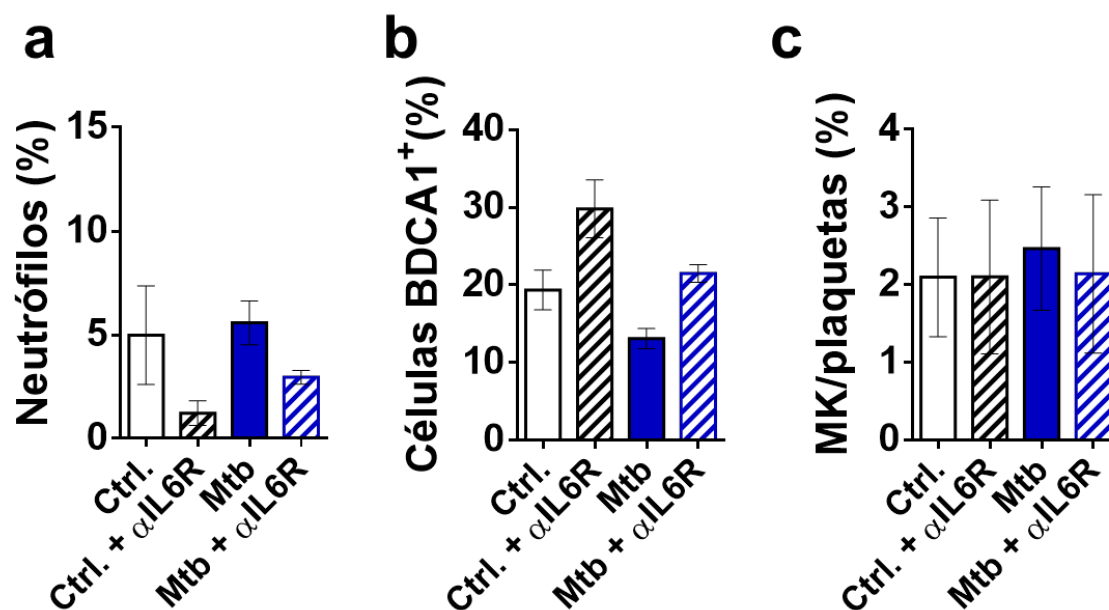


Figura 35. Frequência de neutrófilos, células dendríticas mielóides do tipo 1 e megacariócitos/plaquetas na cultura de HSPCs expostas a Mtb e α IL-6R. Após expansão, HSPCs do grupo controle (não infectado) ou do grupo infectado por Mtb MOI 3 foram pré-expostas ao anticorpo neutralizante α IL-6R na concentração de 1 μ g/mL. Após 10 dias, frequência de **(a)** neutrófilos, **(b)** cDCs e **(c)** MK/plaquetas foram mensuradas por citometria de fluxo. Barras representam média e erro representa EPM. Barras abertas: controle não infectado e não tratado. Barra branca rachurada: controle não infectado tratado com α IL-6R. Barra azul: HSPCs infectadas com Mtb MOI 3. Barra azul rachurada: HSPCs pré-expostas a α IL-6R e infectadas com Mtb MOI 3. Dados representativos de 2 experimentos independentes, n:3.

5d

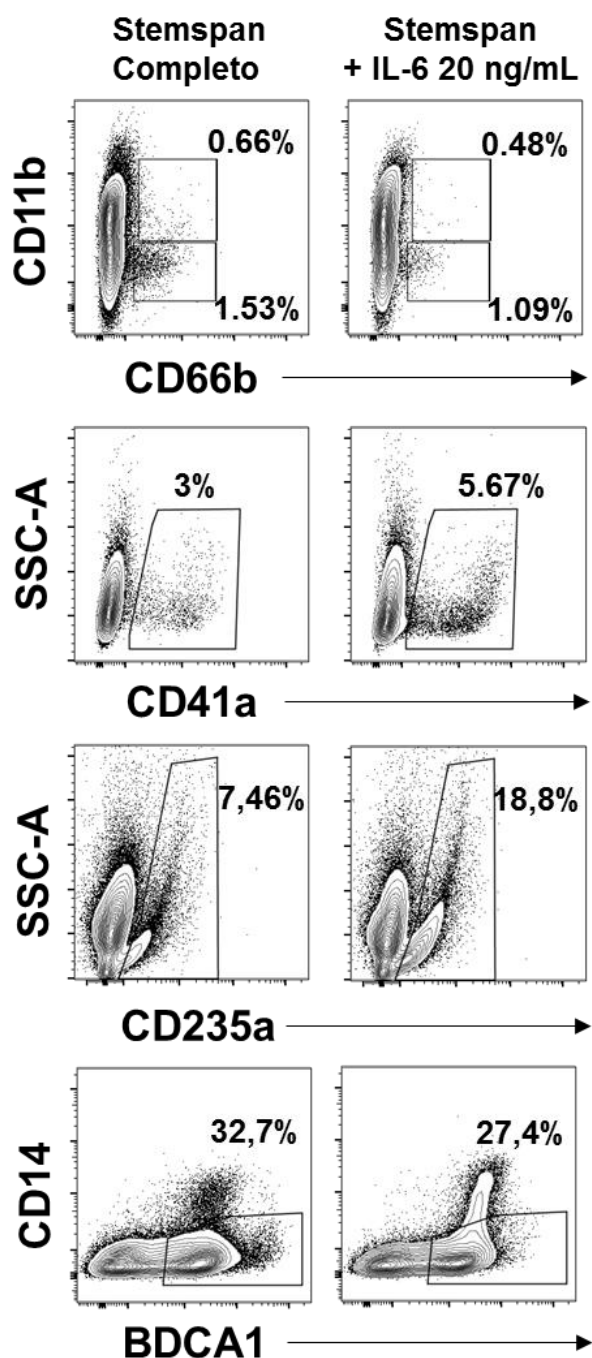


Figura 36. Frequência de granulócitos, megacariócitos/plaquetas, células eritróides e mDCs tipo 1 em meio Stemsplan completo ou apenas na presença da citocina IL-6 20 mg/mL por 5 dias. Countour plot mostra a frequência das respectivas populações mencionadas acima no meio Stemsplan com coquetel de citocinas (coluna da esquerda) ou na presença apenas de IL-6, na concentração de 20 ng/mL. Dados de 1 experimento, n:1.

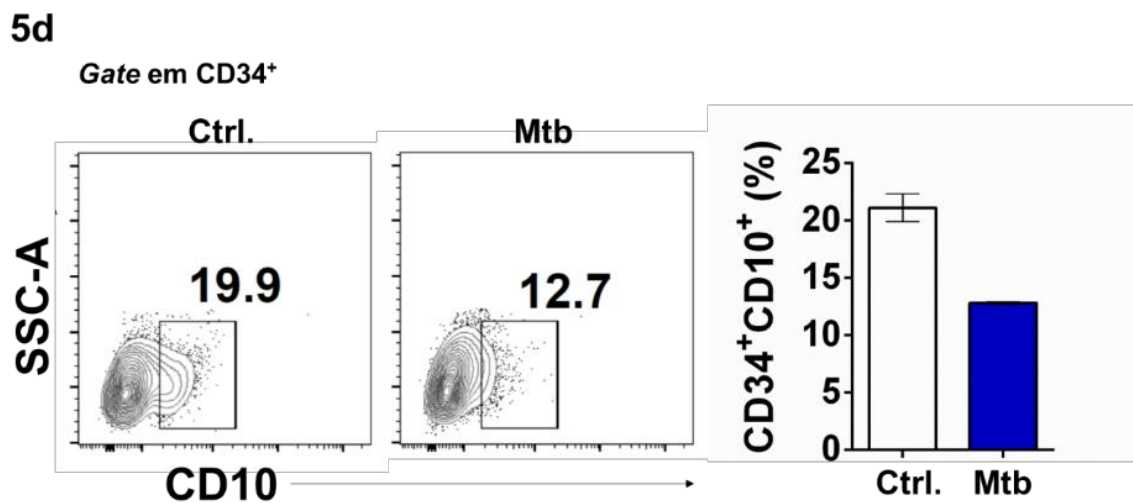


Figura 37. Frequência de células CD10⁺ em HSPCs de cordão umbilical humano expostos a Mtb por 5d. Eventos CD10⁺, correspondentes a progenitores linfóides, foram avaliados em células CD34⁺ após 5 dias de cultura em meio controle ou na presença de Mtb MOI 3. *Countour* plot representativo ilustra a estratégia de *gating*. Frequência de eventos CD34⁺CD10⁺ foram apresentadas em gráfico de barra. Barra aberta: controle não infectado. Barra Azul: HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Dado representativo de 2 experimentos independentes, n:2.

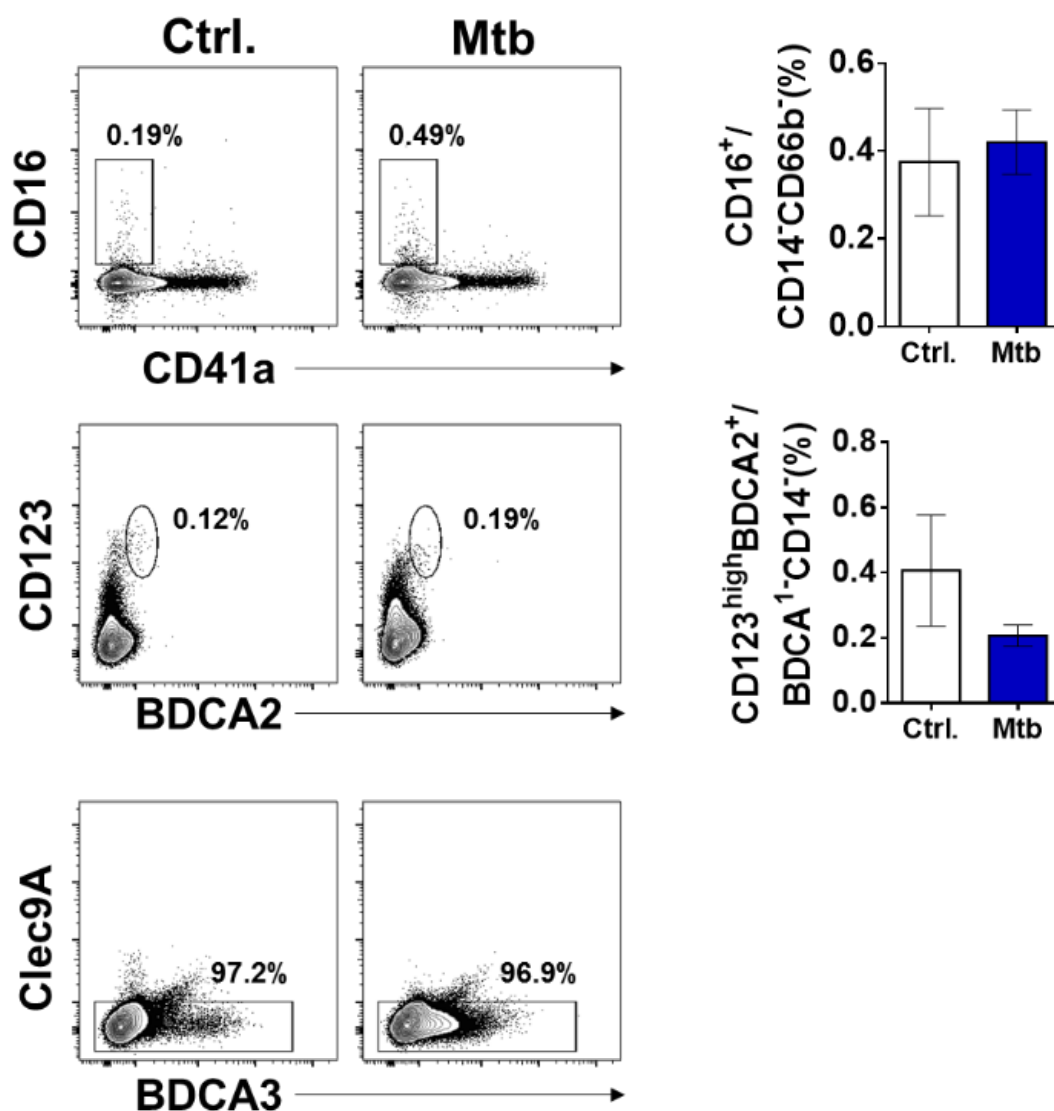


Figura 38 – Frequência de células NK, células dendríticas plasmocitóides e células dendríticas mieloides tipo 2 na cultura de HSPCs expostas a Mtb. *Contour* plot representativo ilustra a estratégia de gating para análise de células NK (CD16⁺CD14⁻CD66b⁻), Células dendríticas plasmocitóides (BDCA2⁺CD123^{high}BDCA1⁻CD14⁻) e células dendríticas mieloides do tipo 2 (BDCA3^{high}Clec9A⁺). Ao lado segue o gráfico representativo com a frequência das respectivas populações no tempo de 10 dias de cultura. Barra aberta representa HSPCs em meio controle e barra azul representa HSPCs expostas a Mtb MOI 3. Barras e erro representam média e EPM respectivamente. Dado representativo de 4 experimentos independentes, n:4. Não foram detectados nos 4 doadores a presença de células BDCA3^{high} Clec9A⁺.

72h

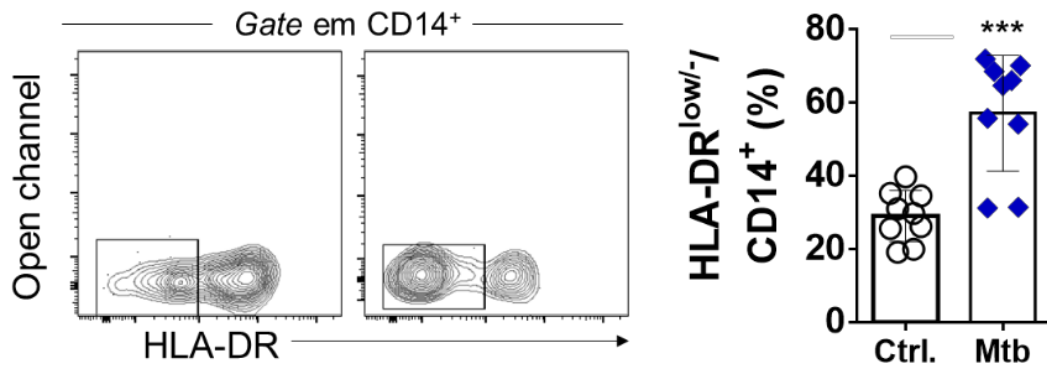


Figura 39 – Frequência de monócitos expressando baixos níveis de HLA-DR após infecção por Mtb. *Countour* plot representativo explica a estratégia de *gating* para avaliação de monócitos expressando níveis reduzidos de HLA-DR. Gráfico de barra com símbolos ilustra a frequência de células CD14⁺HLA-DR^{low} proveniente de PBMCs expostos a Mtb MOI 3 após 72h. Barras representam média, erro representa EPM e símbolos representam diferentes doadores. Estatística: Teste T pareado. ***p≤0.001. Dado do *pool* de 3 experimentos independentes, n:9.

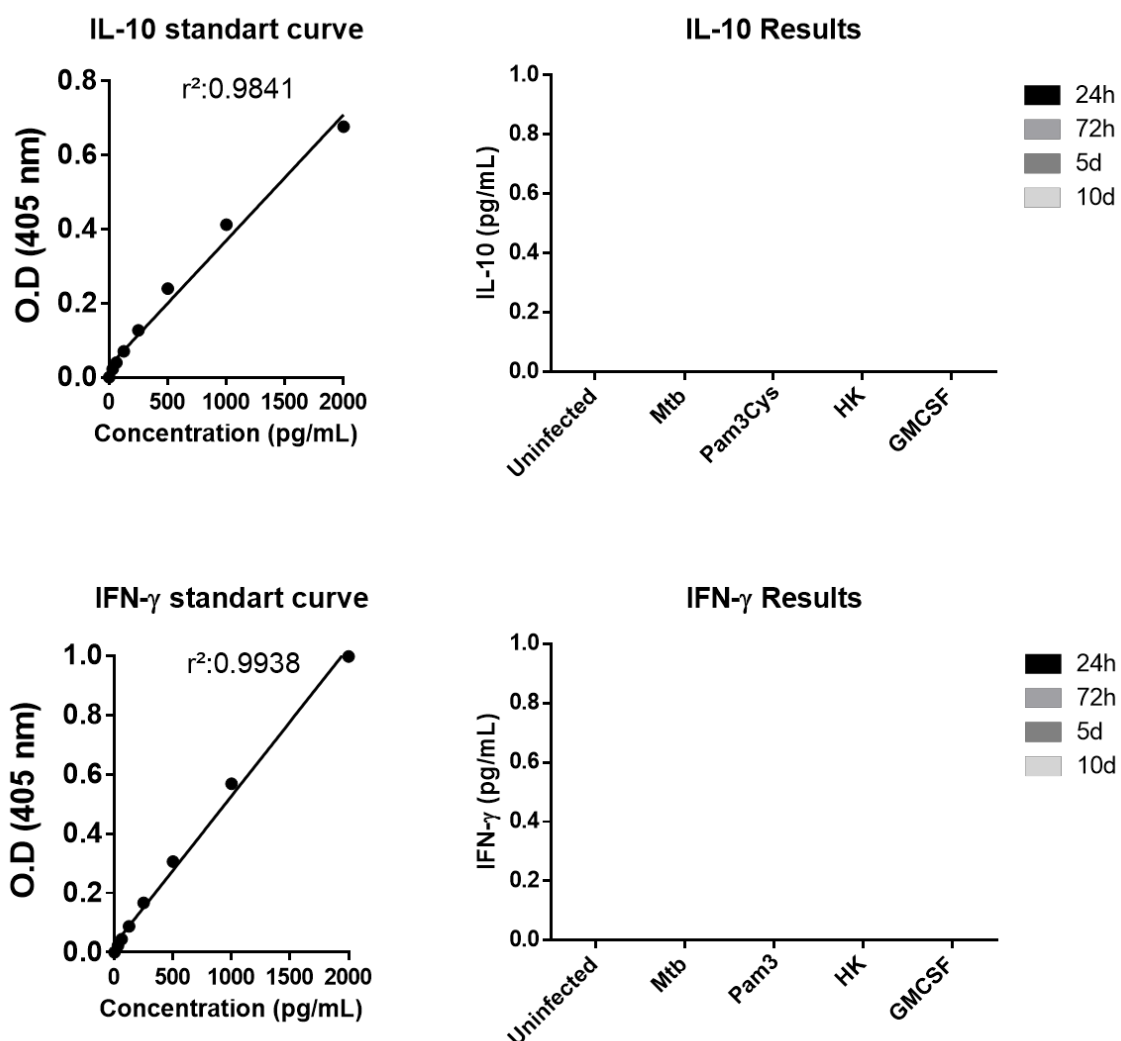


Figura 40. Curva padrão e quantificação das citocinas IL-10 e IFN- γ no sobrenadante de HSPCs expostas a Mtb. Quantificação foi realizada pela metodologia de ELISA seguindo recomendações do fabricante. Curva padrão demonstra que a reação de ELISA foi efetivamente completada no ensaio. Não foi detectada absorvância nas amostras de todos os grupos e tempos de estímulo testados. Dado representativo de 4 experimentos independentes, n:4.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - Pai, M., M. A. Behr, D. Dowdy, K. Dheda, M. Divangahi, C. C. Boehme, A. Ginsberg, S. Swaminathan, M. Spigelman, H. Getahun, D. Menzies, and M. Raviglione. 2016. Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2: 16076.

2 - Philips, J. A., and J. D. Ernst. 2012. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7: 353–384.

3 - Brites, D., and S. Gagneux. 2015. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological Reviews* 264: 6–24.

4 - Cambier, C. J., S. Falkow, and L. Ramakrishnan. 2014. Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 159: 1497–1509.

5 - Ramakrishnan, L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology* 12: 353-366.

6 - McElvania TeKippe, E., I. C. Allen, P. D. Hulseberg, J. T. Sullivan, J. R. McCann, M. Sandor, M. Braunstein, and J. P.-Y. Ting. 2010. Granuloma Formation and Host Defense in Chronic *Mycobacterium tuberculosis* Infection Requires PYCARD/ASC but Not NLRP3 or Caspase-1. *PLoS ONE* 5: e12320.

7 - Dutta, N. K., P. B. Illei, S. K. Jain, and P. C. Karakousis. 2014. Characterization of a Novel Necrotic Granuloma Model of Latent Tuberculosis Infection and Reactivation in Mice. *The American Journal of Pathology* 184: 2045–2055.

8 - Ehlers, S., and U. E. Schaible. 2013. The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion. *Frontiers in Immunology* 3.

9 - Cadena, A. M., S. M. Fortune, and J. L. Flynn. 2017. Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*.

10 - Wetton C.W., McCarty M., Tomlinson D., Rosbotham J., Crofton M.E. 1993. Ultrasound findings in hepatic mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Clinical Radiology* 47(1): 36-8.

11 - Daher, E. D. F., E. J. G. Barros, and G. B. da Silva Junior. 2013. Renal Tuberculosis in the Modern Era. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 54–64.

12 - Jadhav, S. V. 2013. Splenic Tubercular Abscess in an Immunocompromised Patient–Rapid Diagnosis by Line Probe Assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 7(9): 1996-1998.

13 - Pulimood, A. B. 2011. Differentiation of Crohn's disease from intestinal tuberculosis in India in 2010. *World Journal of Gastroenterology* 17: 433.

14 - Karanikas, M., K. Porpodis, P. Zarogoulidis, A. Mitrakas, P. Touzopoulos, N. Lyratzopoulos, G. Kouklakis, N. Courcoutsakis, and A. Polychronidis. 2012. Tuberculosis in the Peritoneum: Not Too Rare After All. *Case Reports in Gastroenterology* 6: 369–374.

15 - DeLance, A. R., M. Safaee, M. C. Oh, A. J. Clark, G. Kaur, M. Z. Sun, A. W. Bollen, J. J. Phillips, and A. T. Parsa. 2013. Tuberculoma of the central nervous system. *Journal of Clinical Neuroscience* 20: 1333–1341.

- 16 - Chin, J. H. 2014. Tuberculous meningitis: Diagnostic and therapeutic challenges. *Neurology: Clinical Practice* 4: 199–205.
- 17 - Tanveer, N., and K. Soni. 2016. Bone marrow tuberculosis: A diagnosis not to be missed. *Journal of Applied Hematology* 7: 81.
- 18 - Shepard CC. Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other mycobacteria in HeLa cells. *J. 42 Exp Med* 1957; 105: 39-48.
- 19 - Shepard CC. A comparison of the growth of selected mycobacteria in HeLa, monkey kidney, and human amnion cells in tissue culture. *J Exp Med* 1958; 107: 237-46
- 20 - Randall, P. J., N.-J. Hsu, V. Quesniaux, B. Ryffel, and M. Jacobs. 2015. Mycobacterium tuberculosis infection of the “non-classical immune cell.” *Immunology and Cell Biology* 93: 789–795.
- 21 - Chackerian A.A., Alt J.M., Perera T.V., Dascher C.C., Behar S.M. 2002. Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and Immunity* 70(8): 4501-9
- 22 - Mehta PK, King CH, White EH, Murtagh JJ, Jr., Quinn FD. Comparison of in vitro models for the study of Mycobacterium tuberculosis invasion and intracellular replication. *Infect Immun* 1996; 64: 2673-9
- 23 - Harding, J. S., A. Rayasam, H. A. Schreiber, Z. Fabry, and M. Sandor. 2015. Mycobacterium-Infected Dendritic Cells Disseminate Granulomatous Inflammation. *Scientific Reports* 5: 15248

- 24 - Raghuvanshi, S., P. Sharma, S. Singh, L. Van Kaer, and G. Das. 2010. Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 21653–21658.
- 25 - Garhyan, J., S. Bhuyan, I. Pulu, D. Kalita, B. Das, and R. Bhatnagar. 2015. Preclinical and Clinical Evidence of Mycobacterium tuberculosis Persistence in the Hypoxic Niche of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells after Therapy. *The American Journal of Pathology* 185: 1924–1934.
- 26 - Das, B., S. S. Kashino, I. Pulu, D. Kalita, V. Swami, H. Yeger, D. W. Felsner, and A. Campos-Neto. 2013. CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells May Provide a Niche for Dormant Mycobacterium tuberculosis. *Science Translational Medicine* 5: 170ra13-170ra13.
- 27 - Lee, J. Y. 2015. Diagnosis and Treatment of Extrapulmonary Tuberculosis. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 78: 47
- 28 - Morrison, S. J., and D. T. Scadden. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505: 327–334
- 29 - Mauer A.M., Athens J.W., Ashenbrucker H., Cartwright G.E., Wintrobe M.M. Leukokinetic studies II. 1960. A method for labelling granulocytes in vitro with radioactive diidopropylfluorophosphate (DFP) *Journal of Clinical Investigation*: 39:1481–1486.
- 30 - Dacie J.V., WHITE J.C. Erythropoiesis with particular reference to its study by biopsy of human bone marrow: A Review. 1949. *Journal of Clinical Pathology* 2, 1.

- 31 - Jacobson L.O., Simmons E.L., Marks E.K., Robson M.J., Bethard W.F., Gaston E.O. 1950. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 35:746–770.
- 32 - Jacobson L.O., Simmons E.L., Marks E., Eldredge J.H. 1951. Recovery from radiation injury. *Science* 113:510–511
- 33 - Na Nakorn T., Traver D., Weissman I.L., Akashi K. 2002. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *Journal of Clinical Investigation* 109:1579–1585
- 34 - Humphries R.K., Eaves A.C., Eaves C.J. 1981. Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(6):3629–3633
- 35 - Rossi, D. J., J. Seita, A. Czechowicz, D. Bhattacharya, D. Bryder, and I. L. Weissman. 2007. Hematopoietic Stem Cell Quiescence Attenuates DNA Damage Response and Permits DNA Damage Accumulation During Aging. *Cell Cycle* 6: 2371–2376.
- 36 - Milyavsky, M., O. I. Gan, M. Trottier, M. Komosa, O. Tabach, F. Notta, E. Lechman, K. G. Hermans, K. Eppert, Z. Konovalova, O. Ornatsky, E. Domany, M. S. Meyn, and J. E. Dick. 2010. A Distinctive DNA Damage Response in Human Hematopoietic Stem Cells Reveals an Apoptosis-Independent Role for p53 in Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 7: 186–197.
- 37 - Sato, T., N. Onai, H. Yoshihara, F. Arai, T. Suda, and T. Ohteki. 2009. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nature Medicine* 15: 696–700

- 38 - Baldrige, M. T., King, K. Y., Boles, N. C., Weksberg, D. C., & Goodell, M. A. 2010. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- γ in response to chronic infection. *Nature*, 465(7299), 793–797
- 39 - Fares, I., J. Chagraoui, Y. Gareau, S. Gingras, R. Ruel, N. Mayotte, E. Csaszar, D. J. H. F. Knapp, P. Miller, M. Ngom, S. Imren, D.-C. Roy, K. L. Watts, H.-P. Kiem, R. Herrington, N. N. Iscove, R. K. Humphries, C. J. Eaves, S. Cohen, A. Marinier, P. W. Zandstra, and G. Sauvageau. 2014. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* 345: 1509–1512.
- 40 - Harrison D.E., Zhong R.K. 1992. The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(21):10134–10138.
- 41 - Ng, A. P., and W. S. Alexander. 2017. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery* 3: 17002
- 42 - Yu, X., C. Wu, D. Bhavanasi, H. Wang, B. D. Gregory, and J. Huang. 2017. Chromatin dynamics during the differentiation of long-term hematopoietic stem cells to multipotent progenitors. *Blood Advances* 1: 887–898
- 43 - Antoniani, C., O. Romano, and A. Miccio. 2017. Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications. *STEM CELLS Translational Medicine* 6: 2106–2114
- 44 - Goode, D. K., N. Obier, M. S. Vijayabaskar, M. Lie-A-Ling, A. J. Lilly, R. Hannah, M. Lichtinger, K. Batta, M. Florkowska, R. Patel, M. Challinor, K. Wallace, J. Gilmour,

S. A. Assi, P. Cauchy, M. Hoogenkamp, D. R. Westhead, G. Lacaud, V. Kouskoff, B. Göttgens, and C. Bonifer. 2016. Dynamic Gene Regulatory Networks Drive Hematopoietic Specification and Differentiation. *Developmental Cell* 36: 572–587

45 - Doulatov, S., F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick. 2012. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* 10: 120–136

46 - Höfer, T., K. Busch, K. Klapproth, and H.-R. Rodewald. 2016. Fate Mapping and Quantitation of Hematopoiesis In Vivo. *Annual Review of Immunology* 34: 449–478

47 - Velten, L., S. F. Haas, S. Raffel, S. Blaszkiewicz, S. Islam, B. P. Hennig, C. Hirche, C. Lutz, E. C. Buss, D. Nowak, T. Boch, W.-K. Hofmann, A. D. Ho, W. Huber, A. Trumpp, M. A. G. Essers, and L. M. Steinmetz. 2017. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nature Cell Biology* 19: 271–281

48 - Buenrostro, J. D., M. R. Corces, C. A. Lareau, B. Wu, A. N. Schep, M. J. Aryee, R. Majeti, H. Y. Chang, and W. J. Greenleaf. 2018. Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell* 173: 1535–1548.e16

49 - Novershtern, N., A. Subramanian, L. N. Lawton, R. H. Mak, W. N. Haining, M. E. McConkey, N. Habib, N. Yosef, C. Y. Chang, T. Shay, G. M. Frampton, A. C. B. Drake, I. Leskov, B. Nilsson, F. Pfeffer, D. Dombkowski, J. W. Evans, T. Liefeld, J. S. Smutko, J. Chen, N. Friedman, R. A. Young, T. R. Golub, A. Regev, and B. L. Ebert. 2011. Densely Interconnected Transcriptional Circuits Control Cell States in Human Hematopoiesis. *Cell* 144: 296–309

50 - Gattinoni, L., E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C. M. Paulos, M. F. Quigley, J. R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D. C. Douek, D. A. Price, C. H. June, F. M. Marincola, M. Roederer, and N. P. Restifo. 2011. A human memory T cell subset with stem cell–like properties. *Nature Medicine* 17: 1290–1297.

51 - Gomez Perdiguero, E., K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M. F. de Bruijn, F. Geissmann, and H.-R. Rodewald. 2014. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518: 547–551.

52 - Hotchkiss, R. S. et al. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 166, 6952–6963.

53 - Shahbazian, L. et al. 2004. *Escherichia coli* pneumonia enhances granulopoiesis and the mobilization of myeloid progenitor cells into the systemic circulation. *Crit. Care Med.* 32, 1740–1746.

54 - Takizawa, H., R. R. Regoes, C. S. Boddupalli, S. Bonhoeffer, and M. G. Manz. 2011. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 208: 273–284

55 - Nagai, Y., K. P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrn, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu, and P. W. Kincade. 2006. Toll-like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity* 24: 801–812

56 - Christopher, M. J., F. Liu, M. J. Hilton, F. Long, and D. C. Link. 2009. Suppression of CXCL12 production by

bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood* 114: 1331–1339

57 - Bendall, L. J., and K. F. Bradstock. 2014. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25: 355–367

58 - Chen, C., Y. Liu, Y. Liu, and P. Zheng. 2010. Mammalian target of rapamycin activation underlies HSC defects in autoimmune disease and inflammation in mice. *Journal of Clinical Investigation* 120: 4091–4101

59 - Furusawa, J., I. Mizoguchi, Y. Chiba, M. Hisada, F. Kobayashi, H. Yoshida, S. Nakae, A. Tsuchida, T. Matsumoto, H. Ema, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto. 2016. Promotion of Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells by Interleukin-27 into Myeloid Progenitors to Control Infection in Emergency Myelopoiesis. *PLOS Pathogens* 12: e1005507

60 - Pietras, E. M., R. Lakshminarasimhan, J.-M. Techner, S. Fong, J. Flach, M. Binnewies, and E. Passegué. 2014. Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons. *The Journal of Experimental Medicine* 211: 245–262

61 - Pascutti, M. F., M. N. Erkelens, and M. A. Nolte. 2016. Impact of Viral Infections on Hematopoiesis: From Beneficial to Detrimental Effects on Bone Marrow Output. *Frontiers in Immunology* 7.

62 - Maeda, K., A. Malykhin, B. N. Teague-Weber, X.-H. Sun, A. D. Farris, and K. M. Coggeshall. 2009. Interleukin-6 aborts lymphopoiesis and elevates production of

myeloid cells in systemic lupus erythematosus–prone B6.Sle1.Yaaanimals. *Blood* 113: 4534–4540

63 - Zhao, J. L., C. Ma, R. M. O’Connell, A. Mehta, R. DiLoreto, J. R. Heath, and D. Baltimore. 2014. Conversion of Danger Signals into Cytokine Signals by Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Regulation of Stress-Induced Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 14: 445–459

64 - Schaper, F., and S. Rose-John. 2015. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26: 475–487.

65 - Hirahara, K., A. Onodera, A. V. Villarino, M. Bonelli, G. Sciumè, A. Laurence, H.-W. Sun, S. R. Brooks, G. Vahedi, H.-Y. Shih, G. Gutierrez-Cruz, S. Iwata, R. Suzuki, Y. Mikami, Y. Okamoto, T. Nakayama, S. M. Holland, C. A. Hunter, Y. Kanno, and J. J. O’Shea. 2015. Asymmetric Action of STAT Transcription Factors Drives Transcriptional Outputs and Cytokine Specificity. *Immunity* 42: 877–889

66 - Niehof, M., K. Streetz, T. Rakemann, S. C. Bischoff, M. P. Manns, F. Horn, and C. Trautwein. 2000. Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBP β Promoter Suggests a New Mechanism of Transcriptional Regulation by STAT3. *Journal of Biological Chemistry* 276: 9016–9027

67 - Hirai, H., P. Zhang, T. Dayaram, C. J. Hetherington, S. Mizuno, J. Imanishi, K. Akashi, and D. G. Tenen. 2006. C/EBP β is required for “emergency” granulopoiesis. *Nature Immunology* 7: 732–739

68 - Baran, P., S. Hansen, G. H. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H. J. Huber, M. R. Ahmadian, J. M. Moll, and J. Scheller. 2018. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6·soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130

complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *Journal of Biological Chemistry* 293: 6762–6775

69 - Schumacher, N., D. Meyer, A. Mauermann, J. von der Heyde, J. Wolf, J. Schwarz, K. Knittler, G. Murphy, M. Michalek, C. Garbers, J. W. Bartsch, S. Guo, B. Schacher, P. Eickholz, A. Chalaris, S. Rose-John, and B. Rabe. 2015. Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles. *Journal of Biological Chemistry* 290: 26059–26071

70 - Schürch, C. M., C. Riether, and A. F. Ochsenbein. 2014. Cytotoxic CD8+ T Cells Stimulate Hematopoietic Progenitors by Promoting Cytokine Release from Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *Cell Stem Cell* 14: 460–472

71 - Boettcher, S., and M. G. Manz. 2017. Regulation of Inflammation- and Infection-Driven Hematopoiesis. *Trends in Immunology* 38: 345–357

72 – Olaniyi J.A., Aken'Ova Y.A. 2003. Bone marrow findings in patients with pulmonary tuberculosis. *African Journal of Medicine and Medical Sciences* 32(2): 155-7.

73 - Viallard, J., M. Parrens, J. Boiron, J. Texier, P. Mercie, and J. Pellegrin. 2002. Reversible Myelofibrosis Induced by Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* 34: 1641–1643.

74 - Schmitt E., Meuret G., Stix L. 1977. Monocyte recruitment in tuberculosis and sarcoidosis. *British Journal of Hematology* 35(1): 11-7.

- 75 - La Manna, M. P., V. Orlando, F. Dieli, P. Di Carlo, A. Cascio, G. Cuzzi, F. Palmieri, D. Goletti, and N. Caccamo. 2017. Quantitative and qualitative profiles of circulating monocytes may help identifying tuberculosis infection and disease stages. *PLOS ONE* 12: e0171358
- 76 - Henig, N., N. Avidan, I. Mandel, E. Staun-Ram, E. Ginzburg, T. Paperna, R. Y. Pinter, and A. Miller. 2013. Interferon-Beta Induces Distinct Gene Expression Response Patterns in Human Monocytes versus T cells. *PLoS ONE* 8: e62366
- 77 - Southworth, T., A. Metryka, S. Lea, S. Farrow, J. Plumb, and D. Singh. 2012. IFN- γ synergistically enhances LPS signalling in alveolar macrophages from COPD patients and controls by corticosteroid-resistant STAT1 activation. *British Journal of Pharmacology* 166: 2070–2083
- 78 - Anders, S., D. J. McCarthy, Y. Chen, M. Okoniewski, G. K. Smyth, W. Huber, and M. D. Robinson. 2013. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols* 8: 1765–1786
- 79 - Law, C. W., M. Alhamdoosh, S. Su, G. K. Smyth, and M. E. Ritchie. 2016. RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Research* 5: 1408
- 80 - Carvalho de Sousa, J. 1992. Comparative ability of human monocytes and macrophages to control the intracellular growth of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*: effect of interferon-gamma and indomethacin. *FEMS Microbiology Letters* 89: 329–334
- 81 - Sharma, S., M. Sharma, and M. Bose. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* infection of human

monocyte-derived macrophages leads to apoptosis of T cells. *Immunology and Cell Biology* 87: 226–234

82 - Stukes, S., C. Coelho, J. Rivera, A. E. Jedlicka, K. A. Hajjar, and A. Casadevall. 2016. The Membrane Phospholipid Binding Protein Annexin A2 Promotes Phagocytosis and Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* and Impacts Survival in Fungal Infection. *The Journal of Immunology* 197: 1252–1261

83 - Ehrt, S., & Schnappinger, D. 2009. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cellular Microbiology*, 11(8), 1170–1178.

84 - Madan-Lala, R., Sia, J. K., King, R., Adekambi, T., Monin, L., Khader, S. A., ...Rengarajan, J. 2014. Mycobacterium tuberculosis Impairs Dendritic Cell Functions through the Serine Hydrolase Hip1. *The Journal of Immunology*, 192(9), 4263–4272.

85 - Terstappen L.W., Huang S., Safford M., Lansdorp P.M., Loken M.R. 1991. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 15; 77(6): 1218-27

86 - De Bruyn, C., A. Delforge, D. Bron, M. Bernier, M. Massy, P. Stryckmans, P. Ley, and D. De Hemptinne. 1995. Comparison of the coexpression of cd38, cd33 and hla-dr antigens on cd34+ purified cells from human cord blood and bone marrow. *Stem Cells* 13: 281–288

87 - Olweus J., Lund-Johansen F., Terstappen L.W. 1995. CD64/Fc gamma RI is a granulo-monocytic lineage marker on CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 85(9): 2402-13.

- 88- Akashi K1, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404 (6774): 193-7
- 89 - Six, E. M., D. Bonhomme, M. Monteiro, K. Beldjord, M. Jurkowska, C. Cordier-Garcia, A. Garrigue, L. Dal Cortivo, B. Rocha, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, and I. André-Schmutz. 2007. A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *The Journal of Experimental Medicine* 204: 3085–3093
- 90 - Wierenga, P. K., R. Setroikromo, G. Kamps, H. H. Kampinga, and E. Vellenga. 2002. Peripheral Blood Stem Cells Differ from Bone Marrow Stem Cells in Cell Cycle Status, Repopulating Potential, and Sensitivity Toward Hyperthermic Purging in Mice Mobilized with Cyclophosphamide and Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11: 523–532
- 91 - Yi, N., B.-G. Jung, X. Wang, R. Vankayalapati, and B. Samten. 2016. The early secreted antigenic target of 6 kD of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits the proliferation and differentiation of human peripheral blood CD34 + cells. *Tuberculosis* 101: S28–S34
- 92 - De Luca, K., Frances-Duvert, V., Asensio, M.-J., Ihsani, R., Debien, E., Taillardet, M., ... Defrance, T. 2009. The TLR1/2 agonist PAM3CSK4 instructs commitment of human hematopoietic stem cells to a myeloid cell fate. *Leukemia*, 23(11), 2063–2074
- 93 - Vogel, G., A. Cuénod, R. Mouchet, A. Strauss, C. Daubenberger, V. Pflüger, and D. Portevin. 2018. Functional characterization and phenotypic monitoring of human hematopoietic stem cell expansion and differentiation of monocytes and macrophages by whole-cell mass spectrometry. *Stem Cell Research* 26: 47–54

- 94 - Abidin, B. M., A. Hammami, S. Stäger, and K. M. Heinonen. 2017. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLOS Pathogens* 13: e1006422.
- 95 - Kolb-Mäurer, A., F. Weissinger, O. Kurzai, M. Mäurer, M. Wilhelm, and W. Goebel. 2004. Bacterial infection of human hematopoietic stem cells induces monocytic differentiation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 40: 147–153
- 96 - Manz, M. G., T. Miyamoto, K. Akashi, and I. L. Weissman. 2002. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 11872–11877
- 97 - Lee, J., G. Breton, T. Y. K. Oliveira, Y. J. Zhou, A. Aljoufi, S. Pühr, M. J. Cameron, R.-P. Sékaly, M. C. Nussenzweig, and K. Liu. 2015. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* 212: 385–399
- 98 - Lugo-Villarino, G., and O. Neyrolles. 2013. Dressed not to kill: CD16+monocytes impair immune defence against tuberculosis. *European Journal of Immunology* 43: 327–330
- 99 - Lastrucci, C., A. Bénard, L. Balboa, K. Pingris, S. Souriant, R. Poincloux, T. Al Saati, V. Rasolofo, P. González-Montaner, S. Inwentarz, E. J. Moraña, I. Kondova, F. A. Verreck, M. del C. Sasiain, O. Neyrolles, I. Maridonneau-Parini, G. Lugo-Villarino, and C. Cougoule. 2015. Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16+ monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Research* 25: 1333–1351

100 - Abeles, R. D., M. J. McPhail, D. Sowter, C. G. Antoniadou, N. Vergis, G. K. M. Vijay, E. Xystrakis, W. Khamri, D. L. Shawcross, Y. Ma, J. A. Wendon, and D. Vergani. 2012. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14^{hi}/CD16^{neg} monocytes: Expansion of CD14^{hi}/CD16^{pos} and contraction of CD14^{lo}/CD16^{pos} monocytes in acute liver fail. *Cytometry Part A* 81A: 823–834

101 - Patel, A. A., Y. Zhang, J. N. Fullerton, L. Boelen, A. Rongvaux, A. A. Maini, V. Bigley, R. A. Flavell, D. W. Gilroy, B. Asquith, D. Macallan, and S. Yona. 2017. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 214: 1913–1923

102 - Hrdlickova, R., M. Toloue, and B. Tian. 2016. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 8: e1364

103 - Cahan, P., H. Li, S. A. Morris, E. Lummertz da Rocha, G. Q. Daley, and J. J. Collins. 2014. CellNet: Network Biology Applied to Stem Cell Engineering. *Cell* 158: 903–915

104 - Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>

105 - Rusinova, I., Forster, S., Yu, S., Kannan, A., Masse, M., Cumming, H., Hertzog, P. J. (2012). INTERFEROME v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D1040–D1046. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1215>

106 -Han, H., Cho, J.-W., Lee, S., Yun, A., Kim, H., Bae, D., Lee, I. (2017). TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D380–D386. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1013>

107 - Sadzak, I., Schiff, M., Gattermeier, I., Glinitzer, R., Sauer, I., Saalmüller, A., Kovarik, P. (2008). Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 8944–8949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801794105>

108 - Berry, M. P. R., Graham, C. M., McNab, F. W., Xu, Z., Bloch, S. A. A., Oni, T., ... O'Garra, A. (2010). An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*, 466(7309), 973–977. <https://doi.org/10.1038/nature09247>

109 - Buechler, M. B., Akilesh, H. M., & Hamerman, J. A. (2016). Cutting Edge: Direct Sensing of TLR7 Ligands and Type I IFN by the Common Myeloid Progenitor Promotes mTOR/PI3K-Dependent Emergency Myelopoiesis. *The Journal of Immunology*, 197(7), 2577–2582. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600813>

110 - Quiroga, M. F., V. Pasquinelli, G. J. Martinez, J. O. Jurado, L. C. Zorrilla, R. M. Musella, E. Abbate, P. A. Sieling, and V. E. Garcia. 2006. Inducible Costimulator: A Modulator of IFN- γ Production in Human Tuberculosis. *The Journal of Immunology* 176: 5965–5974.

111 - Correia, J. W., M. V. Freitas, J. A. Queiroz, M. PereiraPerrin, and B. Cavadas. 2008. Interleukin-6 Blood Levels in Sensitive and Multiresistant Tuberculosis. *Infection* 37: 138–141

- 112 - Ribeiro-Rodrigues, R., T. Resende Co, J. L. Johnson, F. Ribeiro, M. Palaci, R. T. Sa, E. L. Maciel, F. E. Pereira Lima, V. Dettoni, Z. Toossi, W. H. Boom, R. Dietze, J. J. Ellner, and C. S. Hirsch. 2002. Sputum Cytokine Levels in Patients with Pulmonary Tuberculosis as Early Markers of Mycobacterial Clearance. *Clinical and Vaccine Immunology* 9: 818–823
- 113 - Jung, B.-G., X. Wang, N. Yi, J. Ma, J. Turner, and B. Samten. 2017. Early Secreted Antigenic Target of 6-kDa of *Mycobacterium tuberculosis* Stimulates IL-6 Production by Macrophages through Activation of STAT3. *Scientific Reports* 7
- 114 - Wang, Y., A. H. H. van Boxel-Dezaire, H. Cheon, J. Yang, and G. R. Stark. 2013. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 16975–16980
- 115 – Zhang, Y., Broser, M. and Rom, W. N. 1994. Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 15;91(6): 2225 – 2229.
- 116 - Sahu, S. K., M. Kumar, S. Chakraborty, S. K. Banerjee, R. Kumar, P. Gupta, K. Jana, U. D. Gupta, Z. Ghosh, M. Kundu, and J. Basu. 2017. MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBP β regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* to lysosomes during infection. *PLOS Pathogens* 13: e1006410
- 117 - Sebba, A. 2008. Tocilizumab: The first interleukin-6-receptor inhibitor. *American Journal of Health-System Pharmacy* 65: 1413–1418.

- 118 - Sitnicka, E. 2003. Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* 102: 881–886
- 119 - Keller J.R., Ortiz M. and Ruscetti F.W. 1995. Stem factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. *Blood* 1; 86(5):1757-64.
- 120 – Brandt J.E., Bhalla K. and Hoffman R. 1994. Effects of interleukin-3 and c-kit ligand on the survival of various classes of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 15; 83(6): 1507-14.
- 121 - Guild A. A and Robson H.N. 1950. Polycythaemia Vera with tuberculosis splenomegaly; report of a case. *Edinb Med J. Apr* ;57(4):145–152.
- 122 - Veenstra, H., R. Baumann, N. M. Carroll, P. T. Lukey, M. Kidd, N. Beyers, C. T. Bolliger, P. D. van Helden, and G. Walzl. 2006. Changes in leucocyte and lymphocyte subsets during tuberculosis treatment; prominence of CD3dimCD56+ natural killer T cells in fast treatment responders. *Clinical and Experimental Immunology* 145: 252–260
- 123 - Lombard, E. H., and E. P. G. Mansvelt. 1993. Haematological changes associated with miliary tuberculosis of the bone marrow. *Tubercle and Lung Disease* 74: 131–135
- 124 - Moomaw, D. R., and H. L. Alt. 1954. A Study of the Bone Marrow in Far-Advanced Pulmonary Tuberculosis. *American Journal of Clinical Pathology* 24: 929–933

- 125 - Glasser, R. M. 1970. The Significance of Hematologic Abnormalities in Patients With Tuberculosis. *Archives of Internal Medicine* 125: 691
- 126 - Kolb-Maurer, A. 2002. Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. *Blood* 100: 3703–3709
- 127 - Carter, C. C., L. A. McNamara, A. Onafuwa-Nuga, M. Shackleton, J. Riddell IV, D. Bixby, M. R. Savona, S. J. Morrison, and K. L. Collins. 2011. HIV-1 Utilizes the CXCR4 Chemokine Receptor to Infect Multipotent Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Host & Microbe* 9: 223–234
- 128 - Boeckh, M., and A. P. Geballe. 2011. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *Journal of Clinical Investigation* 121: 1673–1680
- 129 - Tornack, J., S. T. Reece, W. M. Bauer, A. Vogelzang, S. Banderhann, U. Zedler, G. Stingl, S. H. E. Kaufmann, and F. Melchers. 2017. Human and Mouse Hematopoietic Stem Cells Are a Depot for Dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 12: e0169119.
- 130 - Takizawa, H., S. Boettcher, and M. G. Manz. 2012. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood* 119: 2991–3002
- 131 - Liu, A., M. Chen, R. Kumar, M. Stefanovic-Racic, R. M. O'Doherty, Y. Ding, W. Jahnen-Dechent, and L. Borghesi. 2018. Bone marrow lympho-myeloid malfunction in obesity requires precursor cell-autonomous TLR4. *Nature Communications* 9.
- 132 - Farrell, T. L., T. R. McGuire, L. D. Bilek, S. K. Brusnahan, J. D. Jackson, J. T. Lane, K. L. Garvin, B. J. O'Kane, A. M. Berger, S. R. Tuljapurkar, M. A. Kessinger,

and J. G. Sharp. 2014. Changes in the frequencies of human hematopoietic stem and progenitor cells with age and site. *Experimental Hematology* 42: 146–154

133 – Gercken J., Pryjma J., Ernst M., Flad H.D. 1994. Defective antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes. *Infection and Immunity* 62 (8): 3472-3478.

134 - Rajashree, P., G. Krishnan, and S. D. Das. 2009. Impaired phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 89: 77–83

135 - Pereira, C. B., M. Palaci, O. H. M. Leite, A. J. S. Duarte, and G. Benard. 2004. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations. *Microbes and Infection* 6: 25–33

136 - Atkinson, S., E. Valadas, S. M. Smith, P. T. Lukey, and H. M. Dockrell. 2000. Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG. *Tubercle and Lung Disease* 80: 197–207

137 - Flores-Guzmán, P., M. Gutiérrez-Rodríguez, and H. Mayani. 2002. In Vitro Proliferation, Expansion, and Differentiation of a CD34+ Cell-Enriched Hematopoietic Cell Population from Human Umbilical Cord Blood in Response to Recombinant Cytokines. *Archives of Medical Research* 33: 107–114

138 - Domen J, Weissman IL. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other. *J Exp Med.* 2000;192:1707–1718

- 139 - Furukawa, M., K. Kaji, H. Masuda, K. Ozaki, S. Asada, A. Koizumi, T. Kubo, N. Nishimura, Y. Sawada, K. Takeda, T. Mashitani, M. Kubo, I. Amano, T. Ootani, C. Ohbayashi, K. Murata, T. Ann, A. Mitoro, and H. Yoshiji. 2017. Severe Aplastic Anemia following Parvovirus B19-Associated Acute Hepatitis. *Case Reports in Hepatology* 2017: 1–5
- 140 - Carbone, A., A. Gloghini, and G. Dotti. 2008. EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders: Classification and Treatment. *The Oncologist* 13: 577–585
- 141 - Matatall, K. A., M. Jeong, S. Chen, D. Sun, F. Chen, Q. Mo, M. Kimmel, and K. Y. King. 2016. Chronic Infection Depletes Hematopoietic Stem Cells through Stress-Induced Terminal Differentiation. *Cell Reports* 17: 2584–2595
- 142 - Kawamura, S., N. Onai, F. Miya, T. Sato, T. Tsunoda, K. Kurabayashi, S. Yotsumoto, S. Kuroda, K. Takenaka, K. Akashi, and T. Ohteki. 2017. Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity* 46: 835–848.e4
- 143 - Kim, Y. C., Q. Wu, J. Chen, Z. Xuan, Y.-C. Jung, M. Q. Zhang, J. D. Rowley, and S. M. Wang. 2009. The transcriptome of human CD34+ hematopoietic stem-progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 8278–8283
- 144 - Shanley, C. A., M. I. Henao-Tamayo, C. Bipin, R. Mugasimangalam, D. Verma, D. J. Ordway, E. M. Streicher, and I. M. Orme. 2018. Biology of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* with varying levels of transmission. *Tuberculosis* 109: 123–133

145 - Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs, J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2002. Whole-Genome Comparison of Mycobacterium tuberculosis Clinical and Laboratory Strains. *Journal of Bacteriology* 184: 5479–5490

146 - Gorczyca, W., Z.-Y. Sun, W. Cronin, X. Li, S. Mau, and S. Tugulea. 2011. Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry Analysis. In *Methods in Cell Biology* Elsevier. 221–266.

147 - Hossain, M. M., and M.-N. Norazmi. 2013. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in Mycobacterium tuberculosis Infection—The Double-Edged Sword? *BioMed Research International* 2013: 1–18.

148 - Gehring, A. J., R. E. Rojas, D. H. Canaday, D. L. Lakey, C. V. Harding, and W. H. Boom. 2003. The Mycobacterium tuberculosis 19-Kilodalton Lipoprotein Inhibits Gamma Interferon-Regulated HLA-DR and Fc R1 on Human Macrophages through Toll-Like Receptor 2. *Infection and Immunity* 71: 4487–4497

149 - McNab, F., K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, and A. O'Garra. 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology* 15: 87–103

150 - Schneider, W. M., M. D. Chevillotte, and C. M. Rice. 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology* 32: 513–545

151 - Moreira-Teixeira, L., K. Mayer-Barber, A. Sher, and A. O'Garra. 2018. Type I interferons in tuberculosis: Foe

and occasionally friend. *The Journal of Experimental Medicine* 215: 1273–1285

152 - Dorhoi, A., V. Yeremeev, G. Nouailles, J. Weiner rd, S. Jörg, E. Heinemann, D. Oberbeck-Müller, J. K. Knaul, A. Vogelzang, S. T. Reece, K. Hahnke, H.-J. Mollenkopf, V. Brinkmann, and S. H. E. Kaufmann. 2014. Type I IFN signaling triggers immunopathology in tuberculosis-susceptible mice by modulating lung phagocyte dynamics. *European Journal of Immunology* 44: 2380–2393

153 - Zhang, G., N. A. deWeerd, S. A. Stifter, L. Liu, B. Zhou, W. Wang, Y. Zhou, B. Ying, X. Hu, A. Y. Matthews, M. Ellis, J. A. Triccas, P. J. Hertzog, W. J. Britton, X. Chen, and C. G. Feng. 2018. A proline deletion in IFNAR1 impairs IFN-signaling and underlies increased resistance to tuberculosis in humans. *Nature Communications* 9

154 - Novikov, A., M. Cardone, R. Thompson, K. Shenderov, K. D. Kirschman, K. D. Mayer-Barber, T. G. Myers, R. L. Rabin, G. Trinchieri, A. Sher, and C. G. Feng. 2011. Mycobacterium tuberculosis Triggers Host Type I IFN Signaling To Regulate IL-1 β Production in Human Macrophages. *The Journal of Immunology* 187: 2540–2547

155 - dos Santos, P. F., J. Van Weyenbergh, M. Delgobo, D. de Oliveira Patricio, B. J. Ferguson, R. Guabiraba, T. Dierckx, S. M. Menezes, A. Báfica, and D. S. Mansur. 2018. ISG15-Induced IL-10 Is a Novel Anti-Inflammatory Myeloid Axis Disrupted during Active Tuberculosis. *The Journal of Immunology* 200: 1434–1442

156 - Thompson, M. R., S. Sharma, M. Atianand, S. B. Jensen, S. Carpenter, D. M. Knipe, K. A. Fitzgerald, and E. A. Kurt-Jones. 2014. Interferon γ -inducible Protein (IFI) 16 Transcriptionally Regulates Type I Interferons and

Other Interferon-stimulated Genes and Controls the Interferon Response to both DNA and RNA Viruses. *Journal of Biological Chemistry* 289: 23568–23581

157 - Li, X., S. Leung, C. Burns, and G. R. Stark. 1998. Cooperative binding of Stat1–2 heterodimers and ISGF3 to tandem DNA elements. *Biochimie* 80: 703–710

158 - DECKER, T., P. KOVARIK, and A. MEINKE. 1997. GAS Elements: A Few Nucleotides with a Major Impact on Cytokine-Induced Gene Expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 17: 121–134

159 - Chmiest, D., N. Sharma, N. Zanin, C. Viaris de Lesegno, M. Shafaq-Zadah, V. Sibut, F. Dingli, P. Hupé, S. Wilmes, J. Piehler, D. Loew, L. Johannes, G. Schreiber, and C. Lamaze. 2016. Spatiotemporal control of interferon-induced JAK/STAT signalling and gene transcription by the retromer complex. *Nature Communications* 7: 13476

160 - Schwartz, K. T., J. D. Carleton, S. J. Quillin, S. D. Rollins, D. A. Portnoy, and J. H. Leber. 2012. Hyperinduction of Host Beta Interferon by a *Listeria monocytogenes* Strain Naturally Overexpressing the Multidrug Efflux Pump MdrT. *Infection and Immunity* 80: 1537–1545

161 - MacNamara, K. C., K. Oduro, O. Martin, D. D. Jones, M. McLaughlin, K. Choi, D. L. Borjesson, and G. M. Winslow. 2010. Infection-Induced Myelopoiesis during Intracellular Bacterial Infection Is Critically Dependent upon IFN- γ Signaling. *The Journal of Immunology* 186: 1032–1043

162 - de Bruin, A. M., S. F. Libregts, M. Valkhof, L. Boon, I. P. Touw, and M. A. Nolte. 2011. IFN- γ induces

monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood* 119: 1543–1554

163 - Feng, C. G., D. C. Weksberg, G. A. Taylor, A. Sher, and M. A. Goodell. 2008. The p47 GTPase Lrg-47 (*Irgm1*) Links Host Defense and Hematopoietic Stem Cell Proliferation. *Cell Stem Cell* 2: 83–89

164 - Bogdan, C., and U. Schleicher. 2006. Production of interferon- γ by myeloid cells – fact or fancy? *Trends in Immunology* 27: 282–290

165 – Hadel C. H., Blum C., Dreher A., Reifenberg K., Kopf M., Kaufmann S. H. 1997. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infection Immunology* 65 (11): 4843-4849.

166 - Nagabhushanam, V., A. Solache, L.-M. Ting, C. J. Escaron, J. Y. Zhang, and J. D. Ernst. 2003. Innate Inhibition of Adaptive Immunity: Mycobacterium tuberculosis-Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN-. *The Journal of Immunology* 171: 4750–4757

167 - Woo, M., C. Wood, D. Kwon, K.-H. P. Park, G. Fejer, and V. Delorme. 2018. Mycobacterium tuberculosis Infection and Innate Responses in a New Model of Lung Alveolar Macrophages. *Frontiers in Immunology* 9

168 - Kaufmann, E., J. Sanz, J. L. Dunn, N. Khan, L. E. Mendonça, A. Pacis, F. Tzelepis, E. Pernet, A. Dumaine, J.-C. Grenier, F. Mailhot-Léonard, E. Ahmed, J. Belle, R. Besla, B. Mazer, I. L. King, A. Nijnik, C. S. Robbins, L. B. Barreiro, and M. Divangahi. 2018. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 172: 176–190.e19

169 - Ding, X., J. Wu, and C. Jiang. 2010. ABCG2: A potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sciences* 86: 631–637

170 - Ramalho-Santos, M., and H. Willenbring. 2007. On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell* 1: 35–38