



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

MÁRICK RODRIGUES STARICK

**O papel do sistema complemento na interação *Mycobacterium tuberculosis*-monócito humano**

Florianópolis

2022

Márick Rodrigues Starick

**O papel do sistema complemento na interação *Mycobacterium tuberculosis*-monócito humano**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em Farmacologia  
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Barbosa Báfica  
Coorientadores: Prof. Dr. Johan Van Weyenbergh e Prof. Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha

Florianópolis

2022

Starick, Márick Rodrigues

O papel do sistema complemento na interação Mycobacterium tuberculosis monócito humano / Márick Rodrigues Starick ; orientador, André Luiz Barbosa Báfica, coorientador, Johan Van Weyenbergh, coorientador, Edroaldo Lummertz Rocha, 2022.

101 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Sistema complemento. 4. Monócito humano. I. Báfica, André Luiz Barbosa. II. Van Weyenbergh, Johan. III. Rocha, Edroaldo Lummertz IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. V. Título.

Márick Rodrigues Starick

**O papel do sistema complemento na interação *Mycobacterium tuberculosis*-monócito humano**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Lourdes Isaac, Dra.

Universidade de São Paulo

Profa. Maria Luiza Bazzo, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Helena Cimarosti, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

---

Prof. José Eduardo Da Silva Santos, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

---

Prof. André Luiz Barbosa Báfica, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus pais e irmãs, ao meu filho (*in memoriam*), aos meus amigos e aos meus mestres.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, à liberdade e ao povo brasileiro.

Tamanho amor e gratidão que carrego são incomensuráveis e indescritíveis. Com imensa alegria digo, que todos aqueles que amo e sou grata, o sabem, não cabendo às palavras dessa página finalidade de prova de amor ou gratidão. No entanto, como as palavras e os sentimentos se perdem no tempo, irei nomear aqui os humanos que fizeram da minha vida a melhor que ela poderia ser.

Aos meus pais, Henrique Starick e Lucimar Rodrigues Starick.

Às minhas irmãs, Meirick R. Starick, Milena R. Starick e Morgana R. Starick.

Ao meu melhor amigo Marcos André Schorner

Aos meus grandes amigos Priscila Creppas, Edgar Kozlova, Seppe Duwé, Byengho Cho, Greicy Malaquias, Daniel Patrício e Taíssa R. Jorge

Aos meus mestres André Báfica, Maria Luiza Bazzo e Cho Kyung Jin

Aos meus mestres e coorientadores Johan Van Weyenbergh e Edroaldo L. da Rocha.

Aos meus amigos do laboratório de Imunobiologia da UFSC, Daniel Mendes, Yonne Menezes, Nicholas Mendes, Lucilene Wildner, Zamira Guerra, Adara Aurea, Gabriela Luiz, Lucas Mascarin, Meice Mantovanni, Anelize Baranzeli, Juliano Ferreira

Aos meus amigos de infância, Wosley Lopes Rodrigues e Liliane Inês de Oliveira

À CAPES

Ao CNPq

À UFSC

## RESUMO

A tuberculose (TB) é uma das principais causas infecciosas de morte no mundo. Dados da literatura demonstraram que, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente causador da tuberculose, ativa as vias clássica, alternativa e via das lectinas do sistema complemento. Foi também demonstrado que o soro humano aumentou a ligação de Mtb às células hospedeiras, nos permitindo postular que componentes do complemento, depositados na superfície bacteriana, agem como uma ligante entre as micobactérias e os receptores do complemento, como o CD46, molécula que é conhecida por interagir com os componentes do complemento e regular funções celulares. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da ativação do complemento na interação Mtb-célula hospedeira. Os resultados demonstraram que Mtb é resistente à lise mediada pelo complemento e a pré-opsonização bacteriana aumenta a aderência, fagocitose e a viabilidade intracelular de Mtb em monócitos, apontando para o papel da opsonização bacteriana durante infecção. Também mostramos que a expressão de CD46 aumentou nas frações sanguíneas de pacientes com tuberculose ativa em comparação aos portadores de TB latente e controles saudáveis. Demonstramos que a infecção por Mtb pré-opsonizada regulou negativamente a expressão proteica de CD46, ao passo que induziu a expressão gênica deste, em diferentes tempos de infecção. O bloqueio de CD46 por anticorpo monoclonal (GB24) não reduziu a fagocitose de Mtb pré-opsonizada e não opsonizada por células imunes, sugerindo que CD46 não possui grande relevância como receptor para micobactérias. Da mesma forma, o bloqueio de CD46 não alterou a viabilidade intracelular do Mtb 24 h pós-infecção, independentemente da opsonização, indicando que o CD46 não atua na regulação celular durante os estágios iniciais da infecção. Futuras investigações se fazem necessárias no intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos na interação Mtb-sistema complemento-monócito humano.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*. Sistema complemento. Monócito humano.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the leading infectious causes of death worldwide. Prior studies have established that *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the bacillus that causes TB, activates the classical, lectin, and alternative pathways of the complement system, and normal human serum greatly enhances the binding of Mtb to host cells, allowing us to postulate that complement components on bacterial surface act as a link (intersect) between mycobacteria and complement receptors, such as CD46, a molecule that is known to interact with complement components and regulate cell functions. Therefore, this study aimed was to investigate the role of complement activation on the Mtb-host cell interactions. Here, we showed that Mtb is resistant to complement-mediated lysis, and bacteria preopsonization enhances adherence, phagocytosis, and intracellular viability, pointing to the role of complement opsonization during infection. We also showed that CD46 expression increased in the blood fractions of patients with active tuberculosis compared to individuals with latent TB infection and healthy controls. We demonstrated that preopsonized Mtb infection downregulated CD46 protein expression while upregulated CD46 gene expression at different time points. CD46 blockade with monoclonal antibody (GB24) did not reduce preopsonized and unopsonized Mtb association to cells, providing the insight that CD46 may not act alone as the main receptor for mycobacteria attachment and phagocytosis. Similarly, CD46 blockade did not alter Mtb intracellular viability at 24 h post-infection, regardless of opsonization, indicating that CD46 does not act on cell regulation during the early stages of Mtb infection. Further investigations are needed to shed light on the mechanism of interaction between Mtb, complement system, and human monocyte.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*. Complement system. Human monocyte.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cascata de Ativação do Sistema Complemento .....	22
Figura 2 – Clivagem da proteína C3 e de seus subprodutos .....	28
Figura 3 – Estrutura de CD46.....	30
Figura 4 – Iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR para detecção das isoformas <i>CD46-CYT1</i> e <i>CD46-CYT2</i> .....	45
Figura 5 – Detecção de subprodutos de C3 em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> após exposição ao soro humano e PBS.....	49
Figura 6 – Lise mediada pelo sistema complemento em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	51
Figura 7 – O papel da opsonização mediada pelo complemento na aderência de Mtb às células imunes .....	53
Figura 8 – O papel da opsonização mediada pelo complemento na fagocitose de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por monócitos THP-1 .....	55
Figura 9 - O papel da opsonização mediada pelo complemento na fagocitose de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por células mononucleares do sangue periférico .....	56
Figura 10 - O papel da opsonização mediada pelo complemento e a viabilidade intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em células imunes .....	60
Figura 11 - Níveis de expressão de genes pró-inflamatórios durante infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pré-exposta ao SF ou SI.....	63
Figura 12 – Níveis de expressão de genes reguladores do sistema complemento no sangue total de pacientes portadores de tuberculose.....	66
Figura 13 - Níveis de expressão de genes reguladores do sistema complemento no PBMC de pacientes portadores de tuberculose.....	67
Figura 14 – Expressão basal da proteína CD46 no PBMC humano e células THP-1 .....	69
Figura 15 – Expressão proteica de CD46 durante infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . 71	
Figura 16 - Expressão gênica de <i>CD46</i> durante infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ..	74
Figura 17 – Bloqueio de CD46 e fagocitose de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pré-opsonizada por células THP-1 .....	77
Figura 18 – Bloqueio de CD46 e crescimento intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pré-opsonizada em células THP-1 após 24h de infecção.....	79

Figura 19 - Bloqueio de CD46 e crescimento intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pré-opsonizada em células THP-1 após 96h e 120h de infecção.....	80
Figura 20 - Bloqueio de CD46 e fagocitose de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> não opsonizada por células THP-1.....	82
Figura 21 - Bloqueio de CD46 e crescimento intracelular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> não opsonizada em células THP-1 após 24 h de infecção.....	83

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Reguladores do Sistema Complemento e seus mecanismos descritos .....	25
Quadro 2 – Exemplos de mecanismos de evasão à lise mediada pelo sistema complemento utilizados por patógenos.....	34
Quadro 3 – Iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADC</b>	Albumina, Dextrose e Catalase
<b>BMDMs</b>	Macrófagos derivados de medula óssea, do inglês <i>Bone marrow-derived macrophages</i>
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>FB</b>	Fator B
<b>FD</b>	Fator D
<b>GEO</b>	Gene Expression Omnibus, base de dados
<b>ISG</b>	Genes estimulados por interferon, do inglês <i>Interferon Stimulated Genes</i>
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>mAb</b>	Anticorpo monoclonal, do inglês <i>monoclonal antibody</i>
<b>MAC</b>	Complexo de Ataque à Membrana, do inglês <i>Membrane Attack Complex</i>
<b>MAP</b>	<i>Mycobacterium avium</i> subespécie <i>paratuberculosis</i>
<b>MBL</b>	Lectinas ligadoras de manose, do inglês <i>mannose-binding lectina</i>
<b>MDM</b>	Macrófagos Derivados de Monócitos, do inglês <i>Monocyte-derived macrophages</i>
<b>MFI</b>	Mediana da Intensidade de Fluorescência, do inglês <i>Median Fluorescence Intensity</i>
<b>MOI</b>	Multiplicidade de Infecção, do inglês <i>Multiplicity of Infection</i>
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MV</b>	Vírus sarampo, do inglês <i>measles virus</i>
<b>OADC</b>	Ácido oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
<b>P</b>	Properdina
<b>PBMC</b>	Célula Mononuclear do Sangue Periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato, do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>PPD-TST</b>	Proteína Purificada Derivativa -Teste Cutâneo para a Tuberculose, do inglês <i>Purified Protein Derivative – Tuberculosis Skin Test</i>
<b>RRP</b>	Receptor de reconhecimento de padrões
<b>RT-qPCR</b>	Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real, do inglês <i>Reverse Transcription Quantitative Real-time PCR</i>
<b>SCR</b>	Repetições consensuais curtas, do inglês <i>Short Consensus Repeats</i>

<b>SF</b>	Soro Fresco
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SI</b>	Soro Inativado
<b>STP</b>	serina, treonina e prolina, do inglês <i>serine, threonine and proline</i>
<b>T.A.</b>	temperatura ambiente
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TCR</b>	Receptores de células T, do inglês <i>T cell Receptors</i>
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>VA</b>	Via Alternativa do sistema complemento
<b>VC</b>	Via Clássica do sistema complemento
<b>VL</b>	Via das Lectinas do sistema complemento
<b>WT</b>	Tipo selvagem, do inglês <i>Wild Type</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS.....	18
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISAO BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1	A TUBERCULOSE E <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	19
2.2	O SISTEMA COMPLEMENTO.....	20
<b>2.2.1</b>	<b>Os reguladores do sistema complemento .....</b>	<b>24</b>
2.2.1.1	<i>CD46</i> .....	28
2.3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> E O SISTEMA COMPLEMENTO.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	PARTICIPANTES DO ESTUDO .....	37
3.2	CÉLULAS IMUNES .....	37
<b>3.2.1</b>	<b>Células primárias do PBMC humano .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Células da linhagem THP-1.....</b>	<b>38</b>
3.3	SORO HUMANO.....	38
3.4	BACTÉRIAS.....	39
3.5	EXPOSIÇÃO DE MTB AO SORO HUMANO .....	40
3.6	WESTERN BLOT .....	40
3.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	41
3.8	TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM ANTICORPO NEUTRALIZANTE ANTI-CD46.....	41
3.9	INFECÇÃO DAS CÉLULAS IMUNES POR MTB.....	42
<b>3.9.1</b>	<b>Avaliação da aderência de Mtb às células imunes .....</b>	<b>42</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Avaliação da associação (fagocitose) de Mtb às células imunes .....</b>	<b>42</b>
<b>3.9.3</b>	<b>Avaliação do crescimento intracelular de Mtb em células imunes .....</b>	<b>42</b>

3.10	QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA (UFC).....	43
3.11	CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
3.12	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL POR TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-qPCR).....	44
3.13	ANÁLISE DOS DADOS DE MICROARRANJO .....	46
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
4.1	MTB ATIVA O SISTEMA COMPLEMENTO.....	48
4.2	MTB É RESISTENTE À LISE MEDIADA PELO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA.....	50
4.3	A PRÉ-OPSONIZAÇÃO MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO AUMENTA A ADERÊNCIA E FAGOCITOSE DE MTB POR CÉLULAS IMUNES .....	52
4.4	A PRÉ-OPSONIZAÇÃO MEDIADA PELO COMPLEMENTO FAVORECE A VIABILIDADE INTRACELULAR DE MTB EM CÉLULAS IMUNES.....	59
4.5	RECEPTORES DO SISTEMA COMPLEMENTO INTERACTORES DE C3b e iC3b ESTÃO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE TB ATIVA <i>IN VIVO</i> .....	64
4.6	A INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> POR MTB ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE CD46 .....	68
4.7	O BLOQUEIO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO À C3B EM CD46 NÃO ALTERA A FAGOCITOSE DE MTB PRÉ-OPSONIZADA POR CÉLULAS THP-1 .....	76
4.8	O BLOQUEIO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO À C3B EM CD46 NÃO ALTERA O CRESCIMENTO INTRACELULAR DE MTB PRÉ-OPSONIZADA EM CÉLULAS THP-1 .....	78
4.9	O BLOQUEIO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO À C3B EM CD46 NÃO ALTERA A FAGOCITOSE DE MTB NÃO OPSONIZADA EM CÉLULAS THP-1 .....	81
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE A – Figuras suplementares .....</b>	<b>99</b>





## 1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB), doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, foi responsável por 1,5 milhão de mortes no ano de 2020, sendo de grande relevância no âmbito da saúde pública (WHO, 2021). A TB se dissemina principalmente por via aérea, mediante inalação de gotículas contendo o bacilo, expelidas pelo portador de TB ativa; tais gotículas se depositam nos alvéolos pulmonares, local onde se iniciará o processo infeccioso (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986).

Durante o processo de interação com hospedeiros, patógenos são constantemente desafiados pelo sistema complemento, uma parte central da resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; SCHLESINGER, 1998). O sistema complemento é constituído por proteínas presentes no plasma e superfície celular, as quais interagem entre si bem como com outras moléculas do sistema imune, de uma forma regulada, desempenhando papel crucial na eliminação de patógenos, debris celulares e células mortas (ZIPFEL; SKERKA, 2009).

A ativação do sistema complemento se dá pelas vias clássica, alternativa ou via das lectinas. De forma geral, a via clássica é ativada por anticorpos ligados à antígenos, ao passo que a via alternativa é espontânea e continuamente iniciada; já a via das lectinas é ativada pela ligação de lectinas ligadoras de manose à carboidratos presentes na superfície de patógenos (RICKLIN et al., 2010; ZIPFEL; SKERKA, 2009). A clivagem da proteína C3 é o evento comum a todas as vias de ativação e corresponde ao evento central desse processo. A partir da clivagem de C3 são gerados os subprodutos C3a, potente anafilotoxina, e C3b, que atua como opsonina. C3b se liga covalentemente a superfície celular microbiana, dando prosseguimento a uma série de ativações em cascata, as quais culminarão na formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC, do inglês *Membrane Attack Complex*), responsável pela lise celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; ZIPFEL; SKERKA, 2009). As opsoninas ligadas à superfície microbiana são reconhecidas por receptores do complemento, presentes em células fagocíticas, o que induz a fagocitose e ativa os mecanismos antimicrobianos intracelulares (DUNKELBERGER; SONG, 2010; MURPHY; WEAVER, 2017; ROSS; LAMBRIS, 1982; WALPORT, 2001a, 2001b). Além disso, as anafilotoxinas C3a e C5a interagem com os receptores C3aR e C5aR, respectivamente, presentes em células de origem mieloide, células epiteliais, células da musculatura lisa e linfócitos T e B ativados, resultando na ativação e

inicialização de diversas vias, sobretudo as que estão ligadas à processos pro-inflamatórios (BARNUM, 2015; EMBER; HUGLI, 1997; KOHL, 2001).

Assim, a patogênese da TB está intimamente relacionada ao sistema complemento, uma vez que proteínas desse sistema estão presentes nos alvéolos pulmonares, durante a disseminação hematogênica e nos sítios de infecção (FERGUSON et al., 2004; SCHLESINGER, 1998). Além disso, monócitos e macrófagos são fontes importantes de síntese de componentes do complemento das vias clássica e alternativa (WHALEY, 1980), contribuindo para o aporte de proteínas no espaço alveolar. Outrossim, proteínas do sistema complemento também foram detectadas no lavado broncoalveolar de várias espécies de mamíferos, incluindo humanos (FERGUSON et al., 2004; GICLAS et al., 1987; WATFORD; GHIO; WRIGHT, 2000).

*Mycobacterium tuberculosis*, quando em contato com soro ou fluidos corpóreos, promove a ativação do sistema complemento pelas três vias descritas (BARTLOMIEJCZYK et al., 2014; FERGUSON et al., 2004; SCHLESINGER, 1998; SCHLESINGER et al., 1990); tendo sido demonstrada a ligação de C3 à superfície de Mtb, após exposição ao soro e lavado broncoalveolar concentrado (FERGUSON et al., 2004; SCHLESINGER et al., 1990). Embora seja um potente ativador do sistema complemento, ainda não há dados que avaliem se Mtb é susceptível à lise mediada por este. Nesse sentido, foi demonstrada a resistência de *M. bovis* BCG à ação lítica do sistema complemento (CARROLL et al., 2009).

Estudos demonstraram que os receptores CR1, CR3 e CR4, os quais se ligam a subprodutos de C3, estão envolvidos na internalização de Mtb previamente tratada com soro fresco (HIRSCH et al., 1994; HU et al., 2000; SCHLESINGER et al., 1990), sugerindo que a opsonização mediada pela ativação do complemento atua na interação Mtb-célula hospedeira.

Em suma, pouco se sabe acerca do papel das proteínas do sistema complemento na patofisiologia da tuberculose (JAGATIA; TSOLAKI, 2021). Postula-se que a interação Mtb-sistema complemento ocorre no primeiro contato entre patógeno e hospedeiro, podendo ser determinante para o curso da infecção. Dessa forma, se faz necessária a caracterização detalhada dos mecanismos imunológicos envolvidos na interação Mtb-sistema complemento-células fagocíticas, no intuito de possibilitar o delineamento de novos alvos farmacológicos que venham a contribuir para o encurtamento do tratamento da tuberculose. Atualmente, o tratamento da tuberculose tem duração mínima de 6 meses e pode se estender por mais de 2 anos (WHO, 2021).

Dessa forma, postula-se que, durante infecção por Mtb, subprodutos de ativação de C3 ligados à parede bacteriana interagem com receptores que possuem sítios de ligação para esses subprodutos, resultando em modulação da resposta celular, de forma a viabilizar o estabelecimento da infecção. Assim, o presente trabalho buscou avaliar o potencial lítico do sistema complemento frente à Mtb; o papel da pré-opsonização bacteriana mediada pela ativação do complemento na interação com monócitos, com enfoque nos aspectos da aderência, fagocitose e viabilidade intracelular bacteriana; os níveis de expressão de moléculas do complemento durante infecção *in vivo* por Mtb; os níveis da proteína regulatória do sistema complemento CD46 durante infecção *in vitro* por Mtb; e o papel de CD46 na fagocitose e viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada e não opsonizada.

Os resultados demonstraram que: I) Mtb promove a ativação do sistema complemento, resultando em deposição dos subprodutos C3b e iC3b na superfície bacteriana; II) Mtb é resistente a lise mediada pelo sistema complemento; III) a pré-opsonização bacteriana aumenta a aderência, a fagocitose e o crescimento intracelular de Mtb em monócitos; IV) o regulador do sistema complemento CD46 encontra-se superexpresso durante infecção *in vivo* por Mtb; V) a infecção *in vitro* por Mtb pré-opsonizada reduz a expressão proteica de CD46 em 24h e 48h, ao passo que induz a expressão gênica em 96h de infecção; e VI) o bloqueio dos sítios de ligação à C3b contidos nas regiões SCR3 e SCR4 de CD46, por anticorpo monoclonal neutralizante anti-CD46, não afeta a fagocitose e crescimento intracelular de Mtb pré-opsonizada e não opsonizada. Tais resultados reforçam o papel do sistema complemento na patofisiologia da tuberculose e apontam para a necessidade de futuros estudos que clarifiquem a interação Mtb-sistema complemento-célula hospedeira.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do sistema complemento na interação *Mycobacterium tuberculosis*-monócito humano.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Validar a ativação do sistema complemento por Mtb, *in vitro*, após exposição ao soro.

Avaliar o potencial lítico do sistema complemento frente à Mtb.

Avaliar o papel da pré-opsonização bacteriana mediada pela ativação do complemento na interação com monócitos, com enfoque nos aspectos da aderência, fagocitose e viabilidade intracelular bacteriana.

Avaliar os níveis de expressão de moléculas do complemento durante infecção *in vivo* por Mtb, com enfoque nos receptores do sistema complemento que possuem sítios de ligação para subprodutos de C3, como CD46.

Avaliar os níveis de expressão gênica e proteica de CD46 durante infecção *in vitro* por Mtb.

Avaliar o papel de CD46 na fagocitose e crescimento intracelular de Mtb pré-opsonizada e não opsonizada, por meio da utilização de anticorpo monoclonal neutralizante anti-CD46 (clone GB24).

## 2 REVISAO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 A TUBERCULOSE E *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* sendo o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) o principal representante deste complexo. Pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* as espécies patogênicas *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis* e a estirpe não virulenta *M. bovis* BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) (BODDINGHAUS et al., 1990; BROSCHE et al., 2002; CDC, 2013; VAN INGEN et al., 2012).

A tuberculose é uma das principais causas de morte de seres humanos a nível mundial, sendo que em 2020, estimou-se que 10 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,5 milhão morreram em decorrência da doença. Além disso, estima-se que 1,8 bilhão de pessoas, o que corresponde a um quarto da população mundial, seja portadora de TB latente, representando um reservatório em potencial do bacilo. Mulheres, crianças e pessoas vivendo com HIV estão entre os mais vulneráveis a desenvolver a tuberculose (WHO, 2021).

O processo de transmissão de Mtb se dá por via aérea, por meio da produção de aerossóis contendo em seu interior o bacilo, produzidos pelo indivíduo portador de TB pulmonar ativa (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986). Quando inalados, tais aerossóis se depositam nos alvéolos pulmonares, local onde se iniciará o processo infeccioso, caso o bacilo consiga superar as defesas primárias do hospedeiro e multiplicar-se principalmente no interior dos macrófagos alveolares (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986; NUNES-ALVES et al., 2014; PANDOLFI et al., 2007). Em decorrência, múltiplos desfechos podem ocorrer: I) eliminação/erradicação do bacilo pela ativação imune do hospedeiro, II) multiplicação bacilar com consequente estabelecimento da infecção ativa (TB primária), III) sobrevivência bacilar em estado latente, com ausência de sintomatologia e transmissibilidade (TB latente), e IV) modificação do estado latente com consequente reativação bacilar e estabelecimento da infecção ativa (TB pós-primária) (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986; GIDEON; FLYNN, 2011; NUNES-ALVES et al., 2014; PANDOLFI et al., 2007; TRAUNER et al., 2012). O sucesso no estabelecimento da infecção por Mtb, inicialmente, está relacionado a habilidade e

necessidade por parte deste patógeno em infectar células fagocíticas mononucleadas, sobretudo os macrófagos (PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017).

Estudos epidemiológicos indicam que aproximadamente 95% dos indivíduos que contraem Mtb desenvolverão a forma latente da doença, o que demonstra o equilíbrio imunológico entre o patógeno e o hospedeiro. Cerca de 5 a 10% dos portadores de TB latente desenvolverão TB ativa ao longo da vida (TB pós-primária), em decorrência da diminuição do controle imunológico e reativação do bacilo (BARRY et al., 2009; GIDEON; FLYNN, 2011).

Nos estágios iniciais da infecção, ocorre a ativação da imunidade inata, com o recrutamento de leucócitos para o sítio infeccioso. Células fagocíticas promovem então a fagocitose de Mtb, com decorrente carreamento dos bacilos ao linfonodo, local onde ocorre a apresentação de antígenos. A apresentação dos antígenos micobacterianos resulta em proliferação de células T efectoras, as quais migram para o sítio infeccioso e em conjunto com outras células e proteínas promovem a formação do granuloma. A manutenção do granuloma é crítica para o controle da tuberculose por limitar o crescimento e disseminação bacilar. No entanto, Mtb pode permanecer em forma latente no interior do granuloma, representando um risco em potencial para a o desenvolvimento de TB ativa, caso ocorra imunossupressão no hospedeiro (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986; HORSBURGH; RUBIN, 2011; NUNES-ALVES et al., 2014; RUSSELL, 2007). A taxa de replicação de Mtb é lenta, sendo que o tempo médio de duplicação do bacilo em laboratório gira em torno de 16-24h, quando em condições ótimas de replicação. Durante infecção *in vivo*, a taxa de replicação varia de acordo com o sítio de infecção e o estágio da doença, sendo que durante a TB latente a replicação bacilar é extremamente baixa (BESTE et al., 2009).

## 2.2 O SISTEMA COMPLEMENTO

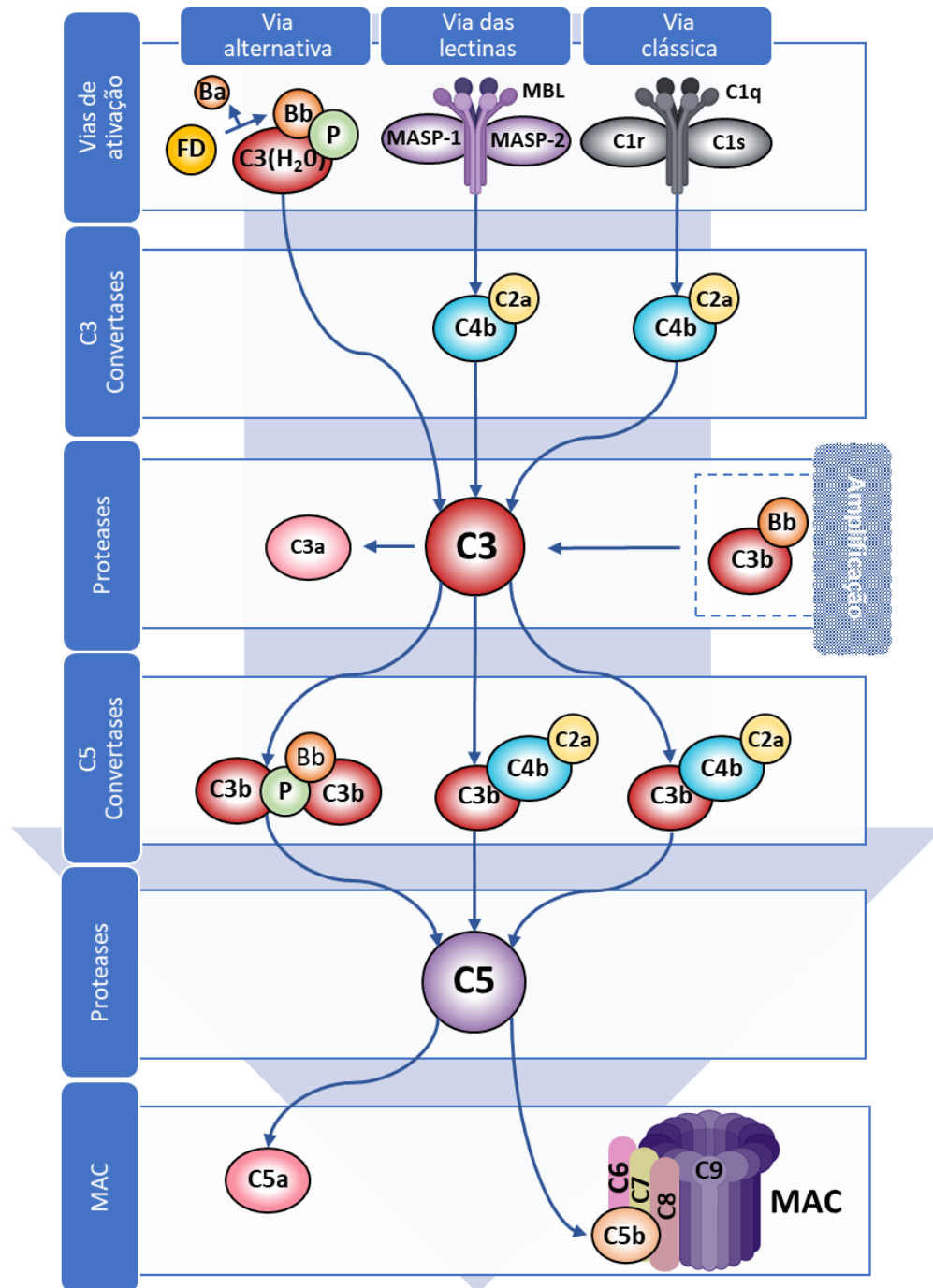
Durante infecção ou quando em contato com plasma ou fluidos corpóreos, patógenos são constantemente desafiados pelo sistema complemento, uma parte central da resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; SCHLESINGER, 1998). O sistema complemento é constituído por proteínas presentes no plasma e membrana celular, as quais interagem entre si bem como com outras moléculas do sistema imune, de forma regulada. Tais proteínas encontram-se inativas no plasma e a ativação da cascata do complemento se restringe às superfícies celulares ou aos sítios dos anticorpos ligados a antígenos (ZIPFEL; SKERKA,

2009). O sistema complemento desempenha papel crucial na eliminação de patógenos, debris celulares e células mortas (CHIRCO; POTEMPA, 2018).

A ativação do sistema complemento se dá pelas vias clássica (VC), via das lectinas (VL) e via alternativa (VA) (Figura 1). A via clássica é ativada a partir da ligação da proteína C1q a anticorpos ligados a antígenos, o que resulta na ativação do complexo de proteases C1q+C1r+C1s, clivagem das proteínas C2 e C4 e formação da C3 convertase C4bC2b (RICKLIN et al., 2010; ZIPFEL; SKERKA, 2009). A ativação da via das lectinas ocorre por meio da ligação das lectinas ligadoras de manose (MBL, *mannose-binding lectin*) ou ficolinas a carboidratos específicos encontrados na superfície de patógenos. Ao ser ativado, o complexo MBL+MASP-1+MASP-2 promove a clivagem das proteínas C2 e C4, dando origem a C3 convertase C4bC2b (AMBRUS et al., 2003; RICKLIN et al., 2010). A via alternativa é espontânea e continuamente iniciada, por meio da hidrólise da ponte tio éster de C3. Essa ativação ocorre em taxa reduzida. Mediante contato com a superfície microbiana ocorre a amplificação da ativação, resultando na ligação de C3 ao Fator B (FB), o qual é então clivado pelo Fator D (FD), formando os subprodutos Bb e Ba. O complexo C3bBb, estabilizado pela Properdina (P), compõe a C3 convertase da via alternativa (Figura 1) (ELVINGTON et al., 2019).

As C3 convertases geradas promovem a clivagem da proteína C3, sendo este o fenômeno comum a todas as vias de ativação, correspondendo ao evento central desse processo (Figura 1, Figura 2). A partir da clivagem de C3 são gerados os subprodutos C3a, potente anafilotoxina, e C3b, que atua como opsonina. C3b se liga covalentemente a superfície de ativação, dando prosseguimento a uma série de ativações em cascata, as quais culminarão na formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC, do inglês *Membrane Attack Complex*) responsável pela lise celular (Figura 1) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; ZIPFEL; SKERKA, 2009).

Figura 1 - Cascata de Ativação do Sistema Complemento



Legenda: **A cascata de ativação do complemento.** A ativação do sistema complemento ocorre por três vias: a via alternativa, a via das lectinas e a via clássica. As três vias de ativação dão origem às enzimas  $C3$  convertases ( $C3bBb$  para a via alternativa e  $C4bC2a$  para as vias clássica e das lectinas), as quais clivam a proteína  $C3$  nos subprodutos  $C3a$  (peptídeo antimicrobiano e anafilático) e  $C3b$  (opsonina).  $C3b$  se liga à superfície celular e além de atuar como opsonina é também utilizada para a formação de  $C3$  convertases adicionais, aumentando a clivagem de  $C3$  e amplificando a ativação do sistema. Com o prosseguimento da cascata de ativação ocorre a formação das enzimas  $C5$  convertases ( $C3bBbC3b$  para a via alternativa e  $C4bC2aC3b$  para a via clássica e das lectinas) as quais clivam a proteína  $C5$  em  $C5a$  (potente peptídeo anafilático) e  $C5b$ .  $C5b$  ligada à membrana celular promove o recrutamento das proteínas do complemento  $C6$ ,  $C7$ ,  $C8$  e  $C9$  para a superfície da célula alvo, em consequência o



complexo C9 é inserido como um poro na membrana levando à lise celular. Fator D – FD. P – Properdina. MAC – Complexo de ataque à membrana.

As opsoninas C3b (e seus produtos de clivagem iC3b, C3dg e C3d) e C4b ligadas à superfície microbiana também atuam como sinalizadores, sendo reconhecidas por receptores do complemento presentes em células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos, promovendo a fagocitose e consequente eliminação intracelular de microrganismos (DUNKELBERGER; SONG, 2010; MURPHY; WEAVER, 2017; ROSS; LAMBRIS, 1982; WALPORT, 2001a, 2001b). Além disso, as anafilotoxinas C3a e C5a interagem com os receptores C3aR e C5aR, respectivamente, presentes em células de origem mieloide, células epiteliais, células da musculatura lisa e linfócitos T e B ativados, resultando na ativação e inicialização de diversas vias, sobretudo as que estão ligadas a processos pró-inflamatórios (BARNUM, 2015; EMBER; HUGLI, 1997; KOHL, 2001). Dessa forma, a ativação do sistema complemento gera inúmeros compostos efetores que irão orquestrar futuras reações imunes.

Tendo em vista aspectos evolutivos, o sistema complemento se desenvolveu primariamente em organismos unicelulares, como mecanismo de defesa ao dano, estresse ou patógenos. Posteriormente, com o desenvolvimento de organismos multicelulares, os componentes do complemento começaram a ser secretados no ambiente extracelular, dando origem aos níveis plasmáticos de proteínas do complemento observadas em mamíferos (FRIEC; KEMPER, 2009; KOLEV; FRIEC; KEMPER, 2014; LISZEWSKI et al., 2013).

A síntese das proteínas solúveis do sistema complemento ocorre predominantemente nos hepatócitos, respondendo pela maior parte do aporte dessas proteínas no plasma (RICKLIN et al., 2010). Entretanto, monócitos e macrófagos são fontes importantes de produção de componentes do complemento (WHALEY, 1980). Monócitos sintetizam e secretam os componentes do complemento C1q, C1r, C1s, C3, C2, C4, Fator B, Fator D, Properdina, C5, C6, C7, C8 e C9, possibilitando a formação do complexo C1 e montagem do MAC. Quando em cultura, secretam Fator H, Fator I, C4BP e C1INH (SERPING1). Os monócitos expressam os receptores para anafilotoxinas C3aR e C5aR1 e se ligam à C3b e seus subprodutos via receptores CR1, CR3 e CR4 (BENSA; REBOUL; COLOMB, 1983; HETLAND et al., 1986; LAPPIN et al., 1992; LAPPIN; WHALEY, 1990; LUBBERS et al., 2017; MERLE et al., 2015; MORGAN; GASQUE, 1997; WHALEY, 1980). Macrófagos humanos sintetizam C1q, C1s, C2, C4, C3, Fator B, Properdina, Fator D e C5; secretam reguladores do complemento como Fator H, Fator I e C1INH; e expressam os receptores C3aR, C5aR1, C5aR2, CR1, CR3 e CR4

(CHRISTMAS et al., 2006; HARTUNG; HADDING, 1983; KURITA-TANIGUCHI et al., 2002; LUBBERS et al., 2017; MERLE et al., 2015; VAN KOOTEN et al., 2008).

Adicionalmente, linfócitos T ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e B), monócitos, neutrófilos, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos, quando em repouso, possuem estoques intracelulares de C3 e são capazes de clivar C3 em C3a e C3b (LISZEWSKI et al., 2013). Ressalta-se ainda que, no pulmão, células epiteliais (STRUNK; EIDLEN; MASON, 1988) e macrófagos alveolares (COLE et al., 1983) produzem uma série de proteínas do sistema complemento (MORGAN; GASQUE, 1997). Além disso, proteínas do sistema complemento também foram detectadas no lavado broncoalveolar de várias espécies de mamíferos, incluindo humanos (FERGUSON et al., 2004; GICLAS et al., 1987; WATFORD; GHIO; WRIGHT, 2000), contribuindo então para o aporte local de proteínas do complemento no ambiente pulmonar durante uma possível infecção. No entanto, no caso específico da TB, ainda não há dados que demonstrem a ativação ou síntese de proteínas do sistema complemento no interior do granuloma (JAGATIA; TSOLAKI, 2021).

Além das funções relacionadas a ativação da cascata do complemento e eliminação de patógenos e células anormais, moléculas do sistema complemento atuam de forma direta na manutenção e homeostasia de células e tecidos e na regulação da resposta celular mediante estresse (LISZEWSKI et al., 2013; RICKLIN et al., 2010; SCHMIDT; LAMBRIS; RICKLIN, 2016). Como exemplo, Asgari e colaboradores (2013) observaram que, em monócitos, a estimulação do receptor do tipo Toll 4 por lipopolissacarídeo (LPS), em presença de agonista do receptor C3aR, induziu maior produção de IL-1 $\beta$  (citocina pró-inflamatória) (ASGARI et al., 2013).

### **2.2.1 Os reguladores do sistema complemento**

Devido ao caráter inespecífico de algumas de suas proteínas, a ativação do sistema complemento requer controle restrito por parte dos chamados Reguladores do Sistema Complemento (SCHMIDT; LAMBRIS; RICKLIN, 2016; ZIPFEL; SKERKA, 2009). A importância da restrição do complemento, mediando seu potencial inflamatório e evitando uma ativação inapropriada sobre as células do hospedeiro é destacada pelo grande número de proteínas reguladoras (Quadro 1). Estes reguladores, presentes na fase fluida (plasma) ou ligados à membrana celular, atuam em diferentes fases da cascata de ativação: sobre a iniciação,

sobre as convertases e sobre a fase terminal (MAC), de forma a controlar o potencial inflamatório mediado pela liberação das anafilotoxinas e prevenir a ativação inapropriada do complemento sobre as células do hospedeiro (Quadro 1) (GRALINSKI et al., 2018; HOURCADE; ATKINSON, 1989; KIM; SONG, 2006).

Como exemplo, pode-se destacar o papel inibitório dos receptores reguladores do complemento CD46 (SEYA; ATKINSON, 1989), CD55 (FUJITA et al., 1987; LUBLIN; ATKINSON, 1989), CR1 (ROSS et al., 1982) e VSIG4 (WIESMANN et al., 2006), os quais interagem com subprodutos de C3 depositados na membrana do hospedeiro de forma a inativá-los, impedindo que a cascata de ativação prossiga nessa membrana e garantindo a sobrevivência celular no microambiente de ativação do complemento. Esses receptores estão presentes na superfície das células do hospedeiro tornando o prosseguimento da ativação da cascata direcionado sobretudo para patógenos como vírus, bactérias (GRALINSKI et al., 2018; HEESTERBEEK et al., 2018).

Quadro 1 - Reguladores do Sistema Complemento e seus mecanismos descritos

Gene/ Uniprot	Mecanismo de Regulação	EX	Ref.
<i>A2M</i> P01023	<i>Alfa-2-Macroglobulina</i> : inibidor da serina protease MASP-1 ( <i>Mannan-binding lectin-associated serine protease 1</i> )	P	(AMBRUS et al., 2003)
<i>C1QBP</i> Q0702	<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein</i> : em complexo com C1qR (CD93), atua como receptor para C1q. A ligação à porção globular de C1q leva à inibição da ativação do complexo C1. Envolvida na quimiotaxia de neutrófilos e células dendríticas imaturas.	M	(GHEBREHIWET et al., 1994; VEGH et al., 2006)
<i>C4BPA</i> P04003	<i>C4b-binding protein</i> - Cadeia $\alpha$ : inibe as vias clássica e das lectinas, por meio da ligação à C4b: a) atua como cofator do Fator I, na inativação proteolítica de C4b, o que impede a formação e reconstituição da C3 convertase C4bC2a; b) age impedindo a formação da C3 convertase C4bC2a pela ligação ao C4b, acelerando o decaimento desta convertase. Além disso, atua como cofator do Fator I na clivagem de C3b presente na fase fluida. No entanto, não é capaz de inibir a convertase C3bBb.	P	(BLOM; KASK; DAHLBÄCK, 2003; BLOM; VILLOUTREIX; DAHLBÄCK, 2004; SEYA et al., 1995)
<i>C4BPB</i> P20851	<i>C4b-binding protein</i> – Cadeia $\beta$		
<i>CD46</i> P15529	<i>CD46</i> ou <i>Membrane Cofactor Protein (MCP)</i> - Se liga à C3b e C4b, atuando como cofator do Fator I na clivagem desses subprodutos. A clivagem de C3b promove a formação do subproduto iC3b ( <i>inactiveC3b</i> ), o qual não é capaz de formar convertases, resultando em bloqueio da ativação da cascata. Como fator co-estimulatório, age na indução da diferenciação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .	M	(ADAMS et al., 1991; IWATA et al., 1995; LE FRIEC et al., 2012; LISZEWSKI et al., 2005, 2013; NI CHOILEAIN; ASTIER, 2012; SEYA; ATKINSON, 1989)
<i>CD55</i> P08174	<i>Decay-accelerating Factor (DAF)</i> – Atua na inibição da ativação de C3 e C5, tanto impedindo a formação, bem como dissociando as convertases C3 e C5, através da ligação à C3b e C4b e	M	(FUJITA et al., 1987; HARRIS et al., 2007; LUBLIN; ATKINSON,

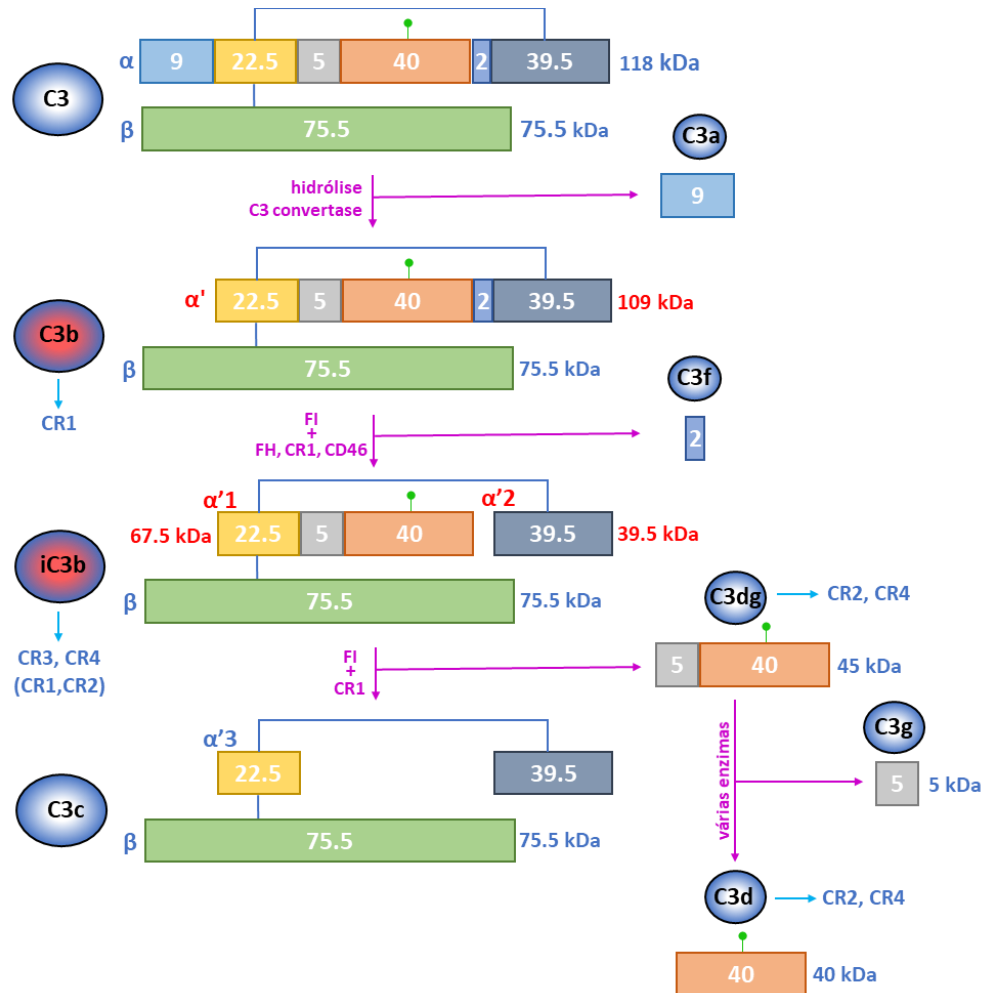
	dissociação de C2b e Bb.		1989)
CD59 P13987	<i>Protectina</i> - Inibe a incorporação de C8 e/ou C9 ao MAC, impedindo a formação do poro transmembrana. Em complexo com proteína tirosina quinase, está envolvido na transdução de sinal para ativação de linfócitos T.	M	(CHRISTMAS et al., 2006; KIMBERLEY; SIVASANKAR; PAUL MORGAN, 2007)
CFH P08303	<i>Complement Factor H</i> ou beta 1H – Atua como cofator do Fator I na inativação de C3b, através da ligação a este. De forma complementar, promove a dissociação das convertases C3 e C5 e se liga à C3d.	P	(JÓZSI; ZIPFEL, 2008; KOPP et al., 2012; SEYA et al., 1995; SIM; DISCIPIO, 1982)
CFHR Q03591 P36980 Q9BXR6	<i>Complement Factor H-related Protein</i> - CFHR1 (FHL1): Inibe a atividade da C5 convertase e bloqueia a deposição de C5b na superfície celular, impedindo a formação do MAC. É capaz de se ligar à C5, C5b6 e C3b/C3d. CFHR1, CFHR2 e CFHR5: compete com CFH pela ligação à C3b, no entanto, diferentemente do CFH, a interação CFHR-C3b não impede a amplificação da clivagem de C3b.	P	(GOICOECHEA DE JORGE et al., 2013; HEINEN et al., 2009; JÓZSI; ZIPFEL, 2008; ZIPFEL; SKERKA, 1999)
CFI J02770	<i>Complement Factor I</i> ou C3bINA - Na presença dos cofatores Fator H, C4BP, CD46 ou CR1, promove a clivagem de C3b em iC3b, C3dg e C3d, bem como a clivagem C4b.	P	(ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; SOAMES; SIM, 1997; ZIPFEL; SKERKA, 2009)
CLU P10909	<i>Clusterin</i> – se liga ao complexo em formação C5b-9 e inibe a agregação do complexo de ataque à membrana.	M e P	(CACCAMO et al., 2004; JENNE; TSCHOPP, 1989; SCHWARZ et al., 2008)
CPN1 P15169	<i>Carboxipeptidase N</i> - Subunidade Catalítica. Promove a clivagem dos aminoácidos arginina e lisina na porção C-terminal de peptídeos e proteínas. No sistema complemento, é responsável pela clivagem da arginina nas anafilotoxinas C3a e C5a, inativando-as.	P	(MUELLER-ORTIZ et al., 2009; SKIDGEL; ERDOS, 2007)
CPN2 P22792	<i>Carboxipeptidase N</i> , subunidade 2 – estabiliza a subunidade catalítica da Carboxipeptidase N.		
CR1 P17927	<i>Complement Receptor Type 1</i> – Glicoproteína polimórfica multifuncional: a) atua como receptor para C3b e C4b, impedindo a formação e desestabilizando o funcionamento das convertases C3 e C5, tanto da VC quanto da VA; b) possui atividade como cofator do Fator I na inativação de C3b (gerando iC3b e C3dg, e posteriormente C3d) e C4b; c) nos eritrócitos, é capaz de se ligar a complexos imunes, promovendo o <i>clearance</i> destes. Possui sítios de ligação para C3b, iC3b, C4b, MBL e C1q.	M	(GHIRAN et al., 2000; HOLERS, 2014; KHERA; DAS, 2009; KIM; SONG, 2006; KLICKSTEIN et al., 1988; ROSS et al., 1982)
PROS1 P07225	<i>Vitamin K-dependent protein S</i> – No plasma, 60-70% da proteína S circula em complexo com C4BP. Sugere-se que o complexo PROS1/C4BP atua na regulação do complemento na superfície de células apoptóticas. A proteína S interage com receptores tirosino quinase da família TAM (Tyro3, Axl, e Mer) e esta interação estimula a fagocitose de células apoptóticas	P	(FERNÁNDEZ et al., 1998; JIANG et al., 2017; WEBB; BLOM; DAHLBACK, 2002)
SERPIN G1 P05155	<i>Plasma Protease C1 Inhibitor</i> (C1INH) - Liga-se às proteases C1r e C1s formando complexo sem atividade proteolítica, o que ocasiona a dissociação do complexo C1. Também é capaz de inativar a proteína MASP2, inibindo a via das lectinas. Interage com C3b, inibindo a ligação C3b-Fator B.	P	(DAVIS-III; MEJIA; LU, 2008; JIANG et al., 2001; MATSUSHITA et al., 2000)
SUSD4 Q5VX71	<i>Sushi domain-containing protein 4</i> . Isoforma 3: impede a formação da C3 convertase da via clássica; isoforma predominante em todos os tecidos humanos (exceto córtex, cerebelo, rim e mamário). Isoforma 1: inibe a deposição de C3b tanto pela VC quanto VA; encontrada no esôfago e cérebro.	M e P	(HOLMQUIST et al., 2013)
VSIG4 Q9Y279	<i>V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4</i> - CR1g - Inibe as convertases da VA, ligando-se à C3b. Interage com iC3b e	M	(HE; WIESMANN; VAN LOOKEREN

	C3c. Alta expressão nos pulmões e placenta e em diversos tecidos fetais. Expresso nos macrófagos em repouso. Regulador negativo da proliferação de linfócitos T e produção de IL2.		CAMPAGNE, 2008; KIM et al., 2016; WIESMANN et al., 2006)
<i>VTN</i> P04004	<i>Vitronectin</i> – (proteína S) Inibe o efeito citolítico do MAC. Pode ser encontrada no interior de plaquetas.	P	(PREISSNER; SEIFFERT, 1998)

Legenda: EX – Local de Expressão. M – Membrana celular. P – Plasma. Fonte: a autora

Outro exemplo de regulador do sistema complemento é o Fator I, que quando ligado aos cofatores Fator H, CD46, C4BP ou CR1, medeia a clivagem de C3b em iC3b (*inactive*C3b), C3dg e C3d (Figura 2). Estes subprodutos não contribuem para a formação das C5 convertases e portanto, não culminam na formação do MAC. No entanto, são reconhecidos por receptores presentes em fagócitos e linfócitos B, atuando como opsoninas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). A detecção dos subprodutos de inativação de C3b é considerada evidência de ativação de C3 (MAILLARD et al., 2015) e portanto, evidência de ativação do sistema complemento.

Figura 2 – Clivagem da proteína C3 e de seus subprodutos



Legenda: **Clivagem da proteína C3.** A proteína C3 é composta pelas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , as quais estão ligadas por ponte dissulfeto. Os fragmentos de 22.5 kDa e 39.5 kDa da cadeia  $\alpha$  também estão ligados por ponte dissulfeto (□). Mediante ativação do sistema complemento, C3 é clivada em C3b, opsonina que se deposita na superfície de ativação por meio da ligação entre a ponte tio éster de C3b (↑) e macromoléculas da superfície celular. O Fator I (FI), juntamente com seus cofatores Fator H (FH), CR1 ou CD46, promovem a clivagem de C3b em iC3b, resultando em bloqueio da ativação da cascata do complemento. FI+CR1 medeiam a clivagem de iC3b em C3dg e C3c, sendo que C3dg permanece aderida à membrana. Por meio da ação de diversas enzimas, como a plasmina, C3dg é clivada em C3d e C3g. Os fragmentos destacados na cor vermelha foram identificados associados à Mtb pelo presente trabalho. A técnica de Western Blot em gel desnaturante promove a quebra das ligações do tipo dissulfeto, resultando na visualização fragmentada das cadeias  $\alpha'1$  e  $\alpha'2$  de iC3b.

### 2.2.1.1 CD46

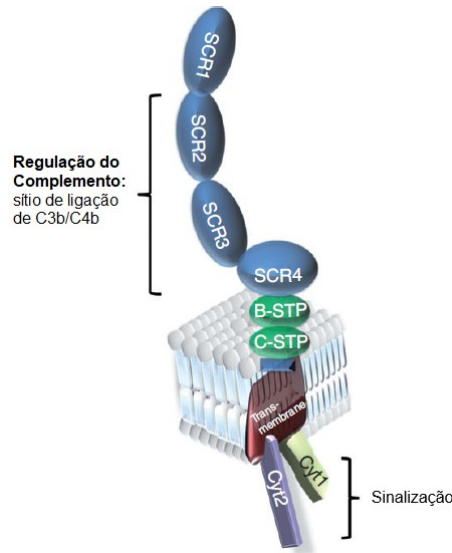
O regulador do sistema complemento CD46 se liga aos subprodutos de C3 e C4, C3b e C4b, respectivamente. Tendo em vista sua função canônica como regulador do sistema

complemento, CD46 atua como cofator do Fator I, mediando a clivagem de C3b em iC3b (SEYA; ATKINSON, 1989) e C4b em C4d (BARILLA-LABARCA et al., 2002), bloqueando o prosseguimento da cascata de ativação.

Com exceção dos eritrócitos, CD46 é expresso em todas as células humanas. Em camundongos, ratos e cobaias, CD46 é expresso apenas nos testículos (CARDONE; LE FRIEC; KEMPER, 2011; CHRISTMAS et al., 2006; KIM; SONG, 2006; LISZEWSKI et al., 2005; LISZEWSKI; POST; ATKINSON, 1991; LUBBERS et al., 2017; POST et al., 1991; RILEY-VARGAS et al., 2004; WANG et al., 2017).

CD46 é uma glicoproteína transmembrana do tipo I; sua porção extracelular N-terminal consiste em 4 domínios de repetições consensuais curtas (Figura 3) (SCR, do inglês *Short Consensus Repeats*). Estudos de mapeamento bioquímico indicam que CD46 interage com C3b em regiões contidas nas SCR3 e SCR4 (PERSSON et al., 2010). As SCRs são seguidas por uma região rica em glicosilações gerada a partir de *splicing* alternativo, que compreende as variantes B e/ou C. Os domínios B e C se ligam ao domínio transmembrana. O domínio intracelular é composto por uma cauda citoplasmática (CYT), a qual apresenta as variantes CYT-1 ou CYT-2, geradas a partir de *splicing* alternativo. Ambas as caudas possuem motivos de sinalização e são expressas de forma distinta em condições inflamatórias. O motivo de sinalização Tyr-X-X-Leu, presente na região intracelular (cauda), é comum à vários receptores imunológicos, necessários para sinalização celular durante a resposta imune. Quatro isoformas de CD46 são comumente expressas: BC1, BC2, C1 e C2, onde B e C indicam o domínio extracelular, e 1 e 2 indicam as caudas citoplasmáticas. Grande parte dos tipos celulares expressam ambas as caudas. Embora o mecanismo de *splicing* determine o perfil de expressão das caudas nos diferentes tipos celulares, este perfil pode ser modulado por estímulos externos (Figura 3) (CARDONE; LE FRIEC; KEMPER, 2011; HANSEN et al., 2016, 2018; KURITA-TANIGUCHI et al., 2002; LISZEWSKI et al., 2005; PURCELL et al., 1991; SEYA; ATKINSON, 1989; YANT; HIRANO; WONG, 1997).

Figura 3 – Estrutura de CD46



Legenda: **Estrutura de CD46.** A porção N-terminal de CD46 consiste em 4 domínios SCR. Os SCR são seguidos por uma região rica nos aminoácidos serina, treonina e prolina (STP, do inglês *serine, threonine and proline*), constituída pelas variantes B e/ou C. Doze aminoácidos promovem a ligação da região B/C ao domínio transmembrana, o qual se liga à cauda intracelular CYT-1 ou CYT-2. Fonte: adaptado de CARDONE et al., 2011

Além de atuar no controle da ativação da cascata do complemento, estudos mostraram que CD46 regula a resposta a estímulos microbianos em células mielóides. Em monócitos humanos, a ativação de CD46 a partir da interação com o vírus sarampo, C3b dimerizado, ou anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD46, levou à inibição da produção da citocina pró-inflamatória IL-12 (IL-12 p40 e IL-12 p70), em resposta à LPS ou *Staphylococcus aureus* (KARP et al., 1996). Observou-se que o tratamento de monócitos humanos com GM-CSF, durante indução da maturação monocítica, induziu a formação do complexo proteico contendo as proteínas CD46, CD9, tirosina fosfatase SHP-1 e Integrina  $\alpha$ - $\beta$ 1, postulando-se que este complexo estaria envolvido na inibição da expressão de IL-12. Por fim, sugeriu-se que CD46 inibe a resposta pró-inflamatória em monócitos humanos (KURITA-TANIGUCHI et al., 2000). Hansen e colaboradores (2017, 2018) demonstraram que a ativação de CD46 em células dendríticas derivadas de monócitos inibiu a síntese de CXCL10 (citocina pró-inflamatória) mediante estímulo com LPS, reduzindo o potencial pró-inflamatório da estimulação com LPS. No entanto, este fenômeno não foi observado em monócitos (BILTOFT; HANSEN; HÖLLSBERG, 2017; HANSEN et al., 2018). Assim, sugere-se que a ativação de CD46 pode induzir sinalização distinta nos diferentes tipos celulares mielóides.



Wang e colaboradores (2017) demonstraram que macrófagos murinos expressando CD46 humana (CD46<sup>+/+</sup>), mediante estímulo com LPS, exibiram fenótipo com tendências pró-inflamatórias (M1), com elevada expressão de mediadores pró-inflamatórios (IL-6, *IL-1β*, IL-12 e CCLA) e expressão reduzida de fatores anti-inflamatórios (como IL-4, CCL-17, CCL-22, Arg-1 e Fizz-1). A expressão de CD46 aumentou a diferenciação de monócitos para macrófagos, promoveu a apoptose de macrófagos durante infecção meningocócica ou estímulo com LPS e induziu o *killing* bacteriano contra *N. meningitidis*, quando comparado aos macrófagos WT (tipo selvagem, do inglês, *Wild Type*,) (WANG et al., 2017); sugerindo que CD46 promove fenótipo pró-inflamatório em macrófagos murinos CD46<sup>+/+</sup>, contrapondo o fenótipo observado em macrófagos humanos. Pelo fato de roedores não expressarem CD46 em células somáticas e um homólogo funcional não ter sido identificado, há diferenças substanciais na sinalização celular mediada pelo complemento entre humanos e murinos (ARBORE; KEMPER, 2016; KOLEV; FRIEC; KEMPER, 2014). Desta forma, em se tratando de CD46, a adoção dos conceitos gerados a partir de estudos com animais transgênicos deve ser adotada com cautela.

As diferentes isoformas de CD46, por meio das caudas CYT-1 e CYT-2, medeiam sinalizações intracelulares distintas. Estudos demonstraram o papel das diferentes caudas citoplasmáticas de CD46 na regulação de células imunes, no entanto ainda não há um consenso acerca do perfil de indução de cada cauda nos diferentes tipos celulares (CARDONE et al., 2010; KOLEV et al., 2015; LE FRIEC et al., 2012; LISZEWSKI et al., 2005, 2013; NI CHOILEAIN et al., 2011).

Cardone e colaboradores (2010) demonstraram que a co-ativação dos receptores de células T (TCR, do inglês *T cell Receptors*) e CD46, em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, induziu a conversão dos linfócitos para o fenótipo linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) e produção de interleucina 2 (IL-2) (citocina pró-inflamatória), por parte destas células. Após ativação, em resposta às concentrações crescentes de IL-2, CD46 promoveu então a conversão para o fenótipo regulatório, por meio da interação da cauda citoplasmática CYT-1 com a quinase serina/treonina SPAK, o que resultou em atenuação da produção de IL-2 e aumento da expressão de IL-10 (citocina anti-inflamatória), sugerindo que a sinalização mediada por CD46-CYT1 resulta em efeitos anti-inflamatórios (CARDONE et al., 2010). Em contraposição, Ni Choileain e colaboradores (2011), demonstraram que a cauda CYT-1, em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, deflagra resposta pró-inflamatória, sendo fundamental para a produção de INF- $\gamma$  e ativação

destas células, ao passo que a cauda CYT-2 deflagra resposta anti-inflamatória, orientando a diferenciação dos linfócitos ativados para um fenótipo regulatório. Ambas as caudas requerem processamento pela Presenilina/ $\gamma$ Secretase para exercer suas funções (NI CHOILEAIN et al., 2011). Corroborando com Ni Choileain e colaboradores (2011), Liszewski e colaboradores (2013) demonstraram que em linfócitos T CD4<sup>+</sup> em repouso, a clivagem intracelular de C3 é catalisada continuamente pela catepsina L (CTSL); C3a gerada se liga ao receptor C3aR, o qual é expresso em grandes quantidades nos lisossomos das células em repouso, e esta ativação contribui para a atividade homeostática de mTOR (LISZEWSKI et al., 2013). Em presença de estímulo, via receptores TCR, os fragmentos intracelulares de C3 (C3a e C3b), bem como os receptores, são encaminhados à superfície das células efectoras, onde ocorre amplificação da clivagem de C3 pela CTSL. A sinalização celular deflagrada a partir da ligação de C3a ao receptor acoplado à proteína G C3aR, e ligação de C3b ao receptor CD46-CYT1 induz a produção de INF- $\gamma$ , promovendo resposta pró-inflamatória mediada por linfócitos Th1 (LE FRIEC et al., 2012; LISZEWSKI et al., 2005, 2013).

Ademais, foi descrito que CD46 atua como receptor para diversos patógenos como *Neisseria gonorrhoeae* e o vírus sarampo (CATTANEO, 2004a; GILL et al., 2003; KIM et al., 2019; SCHNEIDER-SCHAULIES et al., 1996). Foi demonstrado também que *Escherichia coli* se liga à CD46 por meio de opsoninas do complemento depositadas em sua membrana juntamente com adesinas bacterianas, sugerindo a associação entre bactéria opsonizada e CD46 (LI et al., 2006).

Descrita como a “multitarefa” das proteínas do complemento, CD46 está associada a diversas funções tanto na manutenção da homeostasia celular quanto na mediação de resposta à infecção (YAMAMOTO et al., 2013).

### 2.3 *Mycobacterium tuberculosis* E O SISTEMA COMPLEMENTO

*Mycobacterium tuberculosis*, quando em contato com soro ou fluidos corpóreos, promove a ativação do sistema complemento pelas três vias descritas (BARTLOMIEJCZYK et al., 2014; FERGUSON et al., 2004; SCHLESINGER, 1998; SCHLESINGER et al., 1990).

Schlesinger e colaboradores (1990) avaliaram a fixação *in vitro* de C3 à parede de Mtb pelas vias clássica e alternativa, pela metodologia de ELISA (do inglês *Enzyme-linked immunoassay*). Para tanto, a bactéria foi exposta ao soro fresco (SF), soro inativado (SI), SF em

presença de EDTA (inibe as vias clássica e alternativa), ou SF em presença de EGTA+MgCl<sub>2</sub> (inibe seletivamente a via clássica). Os resultados demonstraram que a deposição de C3 na parede micobacteriana foi significativamente maior na presença de SF quando comparado ao SI. A presença de EDTA aboliu a deposição de C3 ao passo que a presença de EGTA+MgCl<sub>2</sub> resultou em níveis de deposição similares ao soro fresco puro. A partir desses resultados os autores concluíram que Mtb é capaz de ativar o sistema complemento quando em contato com soro humano e que esta ativação ocorre principalmente pela via alternativa (SCHLESINGER et al., 1990).

Ferguson e colaboradores (2004) demonstraram que, no soro, a ligação entre C3 e Mtb ocorre de maneira rápida e é mediada pela ligação covalente entre os subprodutos de clivagem desta proteína (C3b) e moléculas da superfície bacteriana. Tal estudo também indicou que a via clássica mediou a deposição de C3 na superfície de Mtb no lavado bronco alveolar. A partir destes achados, os autores postularam que Mtb é capaz de ativar o sistema complemento e se ligar à proteína C3 nas vias aéreas do hospedeiro (FERGUSON et al., 2004).

Devido ao alto risco de transmissão e ausência de vacina efetiva, os estudos envolvendo Mtb exigem requerimentos específicos de biossegurança que por muitas vezes não são acessíveis à comunidade científica. Dessa forma, a utilização de modelos empregando organismos similares se torna uma alternativa viável. Carroll e colaboradores (2009) utilizaram *Mycobacterium bovis* BCG como modelo de ativação do complemento, pois tal bactéria possui 99,9% de similaridade de nucleotídeos quando comparado a Mtb (BODDINGHAUS et al., 1990). A partir dos resultados observou-se que *M. bovis* BCG ativou as três vias do complemento por meio da interação direta com as proteínas C1q, MBL ou L-ficolina e C3b, correspondendo às vias clássica, das lectinas ou via alternativa, respectivamente. Em decorrência da ativação, ocorreu a fixação de C3b a macromoléculas da superfície micobacteriana (CARROLL et al., 2009).

*M. bovis* BCG e *M. vaccae*, são resistentes a lise mediada pelo sistema complemento (CARROLL et al., 2009; PARKASH et al., 1992). Utilizando *M. bovis* BCG e *Mycobacterium vaccae* como modelo, Parkash e colaboradores (1992) desafiaram tais bactérias frente a atividade lítica do sistema complemento, pelo método do *uptake* de <sup>3</sup>H-uracil. Os resultados demonstraram ausência de morte bacteriana, mesmo quando estas bactérias foram pré-tratadas com anticorpos antimicobacterianos. Posteriormente os autores analisaram por microscopia eletrônica de transmissão bactérias expostas ao soro (na presença e ausência de anticorpos). A

ausência de mudanças estruturais indicativas de destruição da parede celular demonstrou a resistência dessas bactérias frente à lise mediada pelo complemento (PARKASH et al., 1992).

Carroll e colaboradores (2009) observaram que *M. bovis* BCG é resistente à lise mediada pelo sistema complemento. Os autores também demonstraram a ligação do Fator H à superfície micobacteriana e consequente inibição da internalização do patógeno por macrófagos THP-1, de forma dose-dependente, sugerindo possível regulação da ativação do complemento por parte do Fator H na superfície bacteriana (CARROLL et al., 2009). Em consonância com o disposto, observou-se que alguns microrganismos como *Borrelia burgdorferi* (ALITALO et al., 2005), *Neisseria gonorrhoeae* (RAM et al., 1998) e *Candida albicans* (MERI et al., 2002) sintetizam proteínas que recrutam o Fator H para a superfície bacteriana, inibindo o prosseguimento da cascata de ativação do complemento e evadindo da lise mediada pelo MAC (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Diversos microrganismos desenvolveram estratégias de evasão ao sistema complemento, como descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Exemplos de mecanismos de evasão à lise mediada pelo sistema complemento utilizados por patógenos

Patógeno	Mecanismo de evasão	Referência
<i>Schistosoma mansoni</i>	Transferência enzimática do ácido siálico presente nas células do hospedeiro para a superfície parasitária. O ácido siálico na membrana recruta o Fator H circulante promovendo o bloqueio da cascata de ativação	(DAGENAIS et al., 2022)
<i>Schistosoma mansoni</i>	A proteína de superfície SCIP-1 (P06198 Paramyosin) se liga à C8 e C9 e inibe a formação do MAC	(DENG et al., 2003)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Possui ácido siálico em sua membrana, o qual recruta o Fator H circulante promovendo o bloqueio da cascata de ativação	(RAM et al., 1997)
<i>Haemophilus influenzae</i> não tipável	Incorporação do ácido siálico presente nas células do hospedeiro para a superfície bacteriana. O ácido siálico na membrana recruta o Fator H circulante promovendo o bloqueio da cascata de ativação	(OERLEMANS et al., 2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Possui ácido siálico em sua membrana, o qual recruta o Fator H circulante promovendo o bloqueio da cascata de ativação	(KHATUA et al., 2010)
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Possui serina protease extracelular que cliva C3/C3b e C5. Secreta metaloproteinase que potencializa a ação da SERPING1. Entre outros mecanismos.	(ABREU; BARBOSA, 2017)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Proteínas bacterianas que se ligam ao Fator H, recrutando-o para a superfície do patógeno e mediando a inativação do complemento	(ALITALO et al., 2005)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Proteínas bacterianas que se ligam ao Fator H, recrutando-o para a superfície do patógeno e mediando a inativação do complemento	(RAM et al., 1998),
<i>Candida albicans</i>	Proteínas bacterianas que se ligam ao Fator H, recrutando-o para a superfície do patógeno e mediando a inativação do complemento	(MERI et al., 2002)

Fonte: a autora

Sob orientação do Prof. André Báfica, o grupo de pesquisa em tuberculose vinculando ao Laboratório de Imunobiologia da UFSC analisou a similaridade *in silico* entre proteínas de Mtb e proteínas expressas por outros patógenos, relacionadas à evasão ao sistema complemento por meio da ligação ao Fator H. Os resultados preliminares destas análises revelaram 60% de similaridade entre as proteínas Gpm1 de *Candida albicans* e Gpm1 de Mtb (Mendes et al., dados não publicados).

A proteína Gpm1 de *C. albicans* se liga a diversos fatores reguladores plasmáticos do sistema complemento, como o Fator H, a proteína Fator H-like 1 (FHL-1) e C4BP (MERI et al., 2002; POLTERMANN et al., 2007). Os complexos de ligação Gpm1-Fator H e Gpm1-FHL-1 são funcionalmente ativos e atuam como cofatores na degradação da opsonina C3b mediado pelo Fator I. Uma vez ligados à superfície fúngica, tais fatores reguladores bloqueiam a cascata de ativação do sistema complemento. Portanto, a ligação da proteína Gpm1 ao Fator H pode contribuir para a evasão ao sistema imune (LOPEZ et al., 2014). A proteína Gpm1 de Mtb, codificada pelo gene *Rv0489*, é caracterizada como provável fosfoglicerato mutase 1 e está envolvida na via metabólica da glicólise micobacteriana (COLE, 1998; LEW et al., 2011). Assim, Mendes e colaboradores (dados não publicados) postularam que micobactérias podem evadir à lise mediada pelo complemento por meio da ligação ao Fator H, mediada pela proteína de Gpm1. O complexo Gpm1-Fator H funcionalmente ativo atuaria como cofator do Fator I, o qual cliva a proteína C3b em iC3b. Como demonstrado, iC3b medeia a fagocitose de Mtb por macrófagos alveolares, via receptores do complemento, e não representa uma ameaça à sobrevivência de Mtb, uma vez que iC3b não induz a formação do MAC (Mendes et al., dados não publicados). Até o momento, não há estudos que comprovem a ligação da proteína Gpm1 de Mtb ao Fator H.

A inserção da proteína C7 na membrana bacteriana é um passo crítico para a formação do MAC. Nesse sentido, Welsh e colaboradores (2012) infectaram camundongos *knockout* para a proteína C7 (C7<sup>-/-</sup>) com Mtb e, dentre outros fatores, analisaram a quantidade de bactérias nos diferentes tecidos e a imunopatologia pulmonar. Os resultados demonstraram que os camundongos C7<sup>-/-</sup> apresentaram menor disseminação bacteriana no fígado, imunopatologia reduzida nos pulmões e granulomas menores, apontando para um papel imunopatológico da proteína C7 (WELSH et al., 2012). Uma vez que C7 é essencial para a formação do MAC esses achados se opõem ao conceito de que a formação do MAC tem papel protetor na infecção

(CHIRCO; POTEPA, 2018). Espera-se que futuros estudos esclareçam esta aparente contradição.

Em relação aos receptores do complemento, observou-se que a opsonização resultante da deposição de subprodutos de C3 na parede celular de Mtb, decorrente da exposição ao SF, mediou a internalização bacteriana pelos receptores do complemento CR1, CR3 e CR4. CR1 e CR3 foram os principais mediadores da internalização de Mtb por monócitos e CR4 foi o principal promotor da internalização por macrófagos (HIRSCH et al., 1994; HU et al., 2000; SCHLESINGER et al., 1990).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO

O sangue periférico de 8 voluntários saudáveis com idades entre 23 e 40 anos (4 voluntários do sexo masculino, e 4 voluntárias do sexo feminino) foi coletado por punção venosa para o isolamento do soro e células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os voluntários não possuíam histórico clínico prévio ou atual de TB ou outras doenças respiratórias e todos receberam no mínimo uma dose da vacina com *M. bovis* BCG. Os voluntários não foram testados quanto a sensibilização à Mtb pelo Teste Cutâneo para a Tuberculose (PPD-TST, do inglês *Purified Protein Derivative – Tuberculosis Skin Test*).

Os voluntários proferiram o consentimento em participar do estudo por meio da assinatura do termo de consentimento livre esclarecido, antes que qualquer amostra fosse coletada. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob número IRB# 89894417.8.0000.0121.

O estudo foi realizado no Laboratório de Imunobiologia, laboratório integrante ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), situada na cidade de Florianópolis, Santa Catarina.

#### 3.2 CÉLULAS IMUNES

Tanto as células primárias do PBMC humano quanto as células da linhagem monocítica THP-1 foram mantidas em meio RPMI Completo, o qual foi suplementado com piruvato de sódio (1 mM), glutamina (2 mM), Penicilina/Estreptomicina (1%), HEPES (1,2 mM) e soro inativado. Para a manutenção do PBMC humano utilizou-se 1% soro autólogo inativado e para a manutenção dos monócitos THP-1 utilizou-se 10% Soro Fetal Bovino (SFB) inativado.

### 3.2.1 Células primárias do PBMC humano

O PBMC dos doadores foi isolado por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque (GE), como descrito previamente (DELGOBO et al., 2019). As células isoladas foram suspensas em meio RPMI Completo na concentração requerida para os experimentos de infecção e incubadas entre 2h a 8h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, período em que se procedeu com a infecção.

### 3.2.2 Células da linhagem THP-1

Monócitos da linhagem THP-1 (ATCC TIB-202) foram obtidos do banco de células do Laboratório de Imunobiologia da UFSC. As células armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em temperatura ambiente (T.A.) e mantidas em RPMI Completo de acordo com as instruções do fabricante. Células com no máximo 15 passagens foram utilizadas nos experimentos.

Em preparo aos experimentos a suspensão celular foi centrifugada a 450 x g por 5min e o sedimento suspenso em RPMI sem adição de soro. Após quantificação, as células foram ajustadas na concentração requerida para cada experimento, distribuídas em placa de 96 poços de fundo chato e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por até 12h, período em que se procedeu com a infecção.

## 3.3 SORO HUMANO

Dois mililitros de sangue foram coletados por punção venosa em tubo sem anticoagulante BD *Vacutainer Serum Plus Blood Collection Tubes* (Becton Dickinson, Franklin Lakes) e homogeneizados imediatamente após a coleta. O sangue foi incubado em T.A. por 30min para ocorrência do processo de coagulação. Em seguida os tubos foram centrifugados a 1.810 x g por 10min e o sobrenadante foi transferido a um microtubo de 1,5 mL, o qual foi centrifugado novamente. O novo sobrenadante foi distribuído em microtubos identificados como SF ou SI. O SF foi armazenado a 4°C até a realização dos experimentos e o SI foi incubado a 56°C por 30min, para inativação dos componentes do sistema complemento. Após



processamento, ambos os soros foram armazenados a 4°C até o processo de pré-opsonização bacteriana.

A coleta de sangue e preparo do soro foi realizada em período imediatamente anterior a cada experimento. Por isso o soro foi denominado como soro fresco (SF) uma vez que não foi submetido ao processo de congelamento e descongelamento. Dessa forma, procedeu-se com um revezamento de doadores ao longo dos experimentos. Assim, experimentos consecutivos foram realizados com os soros de doadores distintos.

### 3.4 BACTÉRIAS

*Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, obtida do banco de bactérias do Laboratório de Imunobiologia da UFSC, foi cultivada em caldo Middlebrook 7H9 enriquecido com 10% ADC (Albumina, Dextrose e Catalase) e 0.2% de glicerol, a 37°C por 3-4 semanas, quando as bactérias foram centrifugadas. Os bacilos foram lavados e suspensos em solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*) contendo glicerol a 10%. Aliquotas foram distribuídas em microtubos e armazenadas a -20°C.

Em preparo à realização dos experimentos, as bactérias foram descongeladas em T.A. e o conteúdo celular foi semeado em ágar Lowenstein Jensen (LJ). O meio LJ semeado foi incubado a 37°C até o alcance da fase logarítmica de crescimento, que ocorre entre 21 a 28 dias. As colônias em fase logarítmica foram removidas do meio LJ com o auxílio de haste de madeira e transferidas a um tubo de vidro contendo 6 pérolas de vidro com 3 mm de diâmetro cada. Todos os materiais utilizados no processamento foram esterilizados anteriormente. As bactérias foram então vigorosamente homogeneizadas em agitador para tubos do tipo vórtex por 30s, para que ocorresse a dissociação dos aglomerados bacterianos, e o tubo foi deixado em repouso por 15min, para decantação de possíveis aerossóis formados. Em seguida foram adicionados 500 µL de solução salina ao tubo, o qual foi novamente homogeneizado em agitador para tubos do tipo vórtex por 30s e repousado por 15min. O sobrenadante da suspensão bacteriana foi coletado e a densidade óptima mensurada em espectrofotômetro Ultrospec 10 (Amersham Bioscience), sendo ajustada com solução salina a uma OD<sub>600</sub> de 0,88, a qual contém em média  $2,2 \times 10^7$  bactérias/mL.

Em preparo aos experimentos de citometria de fluxo, os bacilos foram marcados com o fluoróforo SYTO™ 24 Green (Thermo Fisher Scientific, EUA) na concentração 0,5 µM,

homogeneizados e incubados por 30min a 37°C. Após incubação procedeu-se a exposição ao soro, lavagens e suspensão em meio RPMI.

*E. coli* foi obtida do banco de bactérias do Laboratório de Imunobiologia da UFSC, sendo cultivada em meio Luria-Bertani a 37°C por 24h. Após cultivo as bactérias foram coletadas com haste estéril e os procedimentos realizados foram os mesmos reportados para Mtb.

### 3.5 EXPOSIÇÃO DE MTB AO SORO HUMANO

Aproximadamente  $1,1 \times 10^7$  bactérias foram centrifugadas a 20.000 x g por 20min, em seguida descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o sedimento. Os bacilos de Mtb foram então incubados com SF (100%), SI (100%), PBS (1X) ou solução salina por 30min a 37°C, temperatura óptima para a ativação do sistema complemento. Após incubação, as bactérias foram lavadas por duas vezes com 1 mL de solução salina para a remoção dos componentes do soro não aderidos à bactéria.

Para os experimentos de fixação de componentes do complemento por Western Blot, as bactérias foram suspensas em tampão de amostra contendo 2-β-mercaptoetanol. Para os experimentos de viabilidade celular pós exposição ao complemento, as bactérias foram suspensas em Tween 80 a 0,05%. Para os experimentos de infecção celular, os bacilos foram suspensos em meio RPMI sem SFB, em concentração calculada de acordo com a multiplicidade de infecção (MOI) planejada para cada experimento. O processo de exposição bacteriana ao soro foi denominado pré-opsonização, uma vez que as bactérias foram expostas ao soro em momento anterior à infecção. Além disso, não foram adicionados SF ou SI ao meio de cultura utilizado nas infecções de 1h e 4h. A adição de SI ocorreu apenas nos experimentos mais duradouros, de 24h, 96h e 120h. Nos experimentos de infecção do PBMC humano as bactérias foram pré-opsonizadas com soro autólogo.

### 3.6 WESTERN BLOT

Após exposição ao soro, *M. tuberculosis* foi extensivamente lavada com solução salina e suspensa em tampão de amostra contendo 0,6 M Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 10% glicerol, 0,025% azul de bromofenol e 5% 2-ME. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100°C por

10min. O extrato bacteriano foi submetido à eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE a 10% e posteriormente transferido à membrana de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBST) e 5% m/v de leite em pó (Molico, Nestlé®) por 1h em T.A., sob agitação constante. As membranas foram então incubadas com soro policlonal anti-C3 humana (*Goat Anti-Human C3*, número de catálogo A213, Complement Technology, Inc.) em PBST contendo 5% BSA a 4°C por aproximadamente 12h. Após incubação, a membrana foi lavada por três vezes com PBST e incubada com anticorpo secundário acoplado à peroxidase HRP (*Horseradish Peroxidase*) em PBST contendo 5% BSA por 2h em T.A. Após incubação as membranas foram lavadas por três vezes com PBST, duas vezes com PBS e reveladas por quimioluminescência (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra).

### 3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após incubação com o soro, as bactérias foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato a 0,1 M (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA) por 2h a 4°C. As bactérias foram depositadas em lâminas com Poly-L-lisina (Sigma Aldrich, Alemanha), desidratadas com etanol, secadas a ponto crítico em CO<sub>2</sub>, metalizadas com ouro e escaneadas em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550 (Kyoto, Japão). Em média, 5-10 campos por amostra foram randomicamente fotografados. A microscopia foi realizada em duplicata, de duas exposições independentes. O microscópio eletrônico de varredura encontra-se no LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 3.8 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM ANTICORPO NEUTRALIZANTE ANTI-CD46

O anticorpo monoclonal neutralizante mouse anti-CD46 humana (IgG1, clone GB24) bloqueia a função de CD46 como regulador da ativação do complemento e se liga aos epítomos nas regiões de repetições consensuais curtas SCR3 e SCR4 (HAKULINEN et al., 2004; KARP et al., 1996; LISZEWSKI et al., 2000; MANCHESTER et al., 1995).

Monócitos THP-1 foram incubados com o anticorpo neutralizante anti-CD46 clone GB24 na concentração de 10 µg/mL, em meio RPMI sem SFB, por 1h a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Após incubação, as células foram infectadas com Mtb.

### 3.9 INFECCÃO DAS CÉLULAS IMUNES POR MTB

As células primárias do PBMC humano ou macrófagos THP-1 (pré tratados ou não com mAb) foram infectados com Mtb pré-exposta ao SF ou SI ou solução salina, na multiplicidade de infecção (MOI) de 1 (1 bactéria/1 célula).

#### 3.9.1 Avaliação da aderência de Mtb às células imunes

Para avaliação da aderência (*binding*), as células infectadas foram incubadas por 1h em gelo. O processo da fagocitose ocorre de maneira ótima a 37°C, sendo que a incubação em gelo atua como um inibidor desse processo. Após incubação as células foram centrifugadas a 450 x g por 5min a 4°C e lavadas por duas vezes com 200 µL de solução salina, para remoção dos bacilos não aderidos. Assim, espera-se que os bacilos recuperados após lavagem estejam aderidos à membrana plasmática das células imunes, de forma extracelular. Após lavagem, as amostras foram processadas de acordo com a metodologia indicada por cada experimento.

#### 3.9.2 Avaliação da associação (fagocitose) de Mtb às células imunes

Para os experimentos de fagocitose, as células infectadas foram incubadas por 4h em temperatura ótima para ocorrência desse processo, a saber, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação as células foram centrifugadas a 450 x g por 5min e lavadas por duas vezes com 200 µL de solução salina, para remoção dos bacilos não internalizados. Assim, espera-se que os bacilos recuperados após lavagem estejam localizados na porção intracelular das células imunes. Após lavagem, as amostras foram processadas de acordo com a metodologia indicada por cada experimento.

#### 3.9.3 Avaliação do crescimento intracelular de Mtb em células imunes

Para avaliação do crescimento intracelular, as células infectadas foram incubadas por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e em seguida foram lavadas por duas vezes com solução salina a 37°C, para remoção dos bacilos não internalizados. As células foram então suspensas em meio RPMI Completo e incubadas pelos tempos de infecção determinados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Uma vez finalizado o período de incubação, as células infectadas foram processadas de acordo com a metodologia indicada por cada experimento.

### 3.10 QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA (UFC)

Para quantificação da viabilidade bacteriana após exposição ao SF, SI e PBS, os bacilos de Mtb foram suspensos em 200 µL de solução Tween 80 na concentração 0,05% e vigorosamente homogeneizados.

Para a quantificação da aderência, fagocitose e crescimento intracelular de Mtb em células imunes, o sedimento de células infectadas foi suspenso em 200 µL da solução Tween 80 na concentração 0,05% e vigorosamente homogeneizados para que ocorresse a ruptura das células e liberação dos bacilos.

As bactérias suspensas em solução Tween 80 foram diluídas em série na ordem 10 nesta mesma solução e inoculadas em placa de Petri de diâmetro 90 mm contendo ágar Middlebrook 7H10 enriquecido com 10% OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase) e 0,5% glicerol. As placas foram então incubadas a 37°C por 21 a 28 dias, quando as UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de Mtb foram quantificadas. Os resultados foram expressos em UFC por mililitro (UFC/mL).

### 3.11 CITOMETRIA DE FLUXO

Nos experimentos de avaliação da associação de Mtb a fagócitos, as bactérias foram marcadas com corante SYTO™ 24 Green (Thermo Fisher Scientific, EUA) como descrito na subseção 3.4 BACTÉRIAS, da seção Materiais e Métodos.

As células foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL e centrifugadas a 450 x g por 10 min a 4°C. Em seguida as células foram bloqueadas com soro AB (1:10) em tampão para FACS (Cloreto de sódio 0,9%, SFB 10%) por 30 min a 4°C, e marcadas com anticorpo anti-CD46 APC (Biolegend, EUA) e anti-CD14 PerCPCy5.5 (Biolegend, EUA), ambos na

diluição 1:50, por 1h a 4°C. Após marcação as células foram centrifugadas a 450 x g por 10 min a 4°C, suspendidas em paraformaldeído a 4% em tampão FACS e incubadas por no mínimo 30min. As células foram adquiridas no citometro de fluxo FACSVerser™ (BD). Os resultados foram analisados no software FlowJo-VX v.10.1 (TreeStar, EUA).

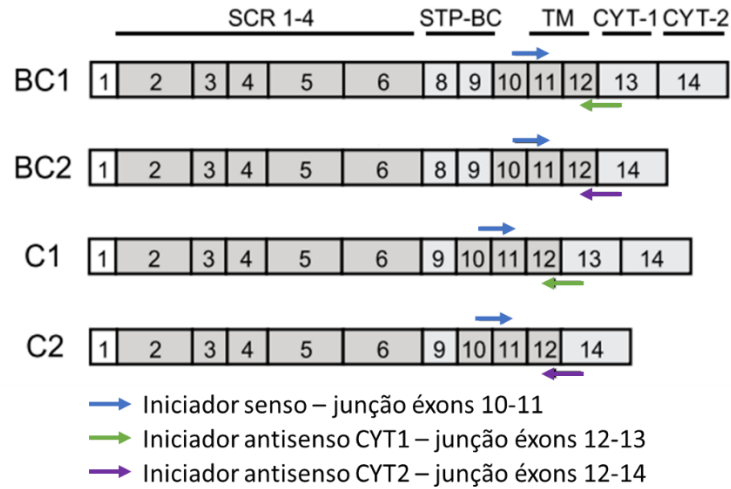
Os resultados de citometria de fluxo são comumente reportados utilizando os parâmetros de frequência e mediana da intensidade de fluorescência (MFI). A frequência foi interpretada como o percentual de células positivas para o fluoróforo analisado em relação ao total de células, sendo reportado como % X<sup>+</sup>. O MFI foi interpretado como a intensidade do fluoróforo em cada célula individualmente, sendo diretamente proporcional ao número de moléculas por célula. Dessa forma, quanto maior o MFI, mais moléculas a célula possui.

### 3.12 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL POR TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-qPCR)

A extração do RNA foi realizada com reagente Trizol (Ambion, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e rendimento do RNA extraído foi mensurado no equipamento Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo que 1 µg de RNA foi tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizado com o kit High capacity cDNA reverse transcription (Thermo Fisher Scientific, EUA) nas seguintes condições: hibridização - 25°C/10min; extensão - 37°C/2h; desnaturação - 87°C/5min. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até a realização da reação de RT-qPCR.

Os iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR para detecção das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* foram desenhados de forma a diferenciar as diferentes caudas citoplasmáticas. O iniciador senso foi desenhado na junção éxon-éxon 10-11, sendo que o mesmo iniciador senso foi utilizado para a detecção de ambas as caudas. Os iniciadores antisenso foram desenhados nas junções éxon-éxon únicas de cada isoforma, a saber junção 12-13 para *CD46-CYT1* e junção 13-14 para *CD46-CYT2* (HANSEN et al., 2016). A eficiência de amplificação de todos os iniciadores foi averiguada por meio da equação  $E = \{ [2^{(-1/\text{slope})}] - 1 \} * 100$ .

Figura 4 – Iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR para detecção das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2*



Legenda: Desenho esquemático da localização dos iniciadores desenhados para amplificação das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2*. Fonte: adaptado de (HANSEN et al., 2016).

As reações de RT-qPCR foram realizadas com o kit Gotaq qPCR Master Mix (Promega, EUA), segundo orientações do fabricante. Utilizou-se 0,25  $\mu$ M de cada iniciador e 2  $\mu$ L de cDNA (diluído 1:20) para um volume final de reação de 10  $\mu$ L. A reação de RT-qPCR se deu nas seguintes condições: 1 ciclo - ativação inicial (95°C/5min); 40 ciclos – desnaturação (95°C/10s), hibridização e extensão (60°C/30s); curva de *melting*. Os iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR encontram-se descritos no Quadro 3. Ao fim das reações, as curvas de *melting* foram checadas afim de se validar a geração de um único produto de amplificação para cada reação.

Quadro 3 – Iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR

Iniciador	Sequência	Tamanho	Tm	Eficiência
<i>CD46 CYT1/CYT2</i> senso	GACAGTTTGGATGTTTGGG	-	60,7°C	-
<i>CD46 CYT1</i> antisense	ATCAGTTAGGTATGTGCCTTTC	126 pb	60,2°C	91.8
<i>CD46 CYT2</i> antisense	ACCATCTGCTTTCCCTTTC	123 pb	59,9°C	109
<i>18S</i> senso	TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	104 pb	59.39	95.55
<i>18S</i> antisense	CGCTGAGCCAGTCAGTGT		59.66	

A expressão relativa das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* em relação ao controle não infectado foi calculada de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001); utilizando o gene *18S* como gene de referência; valores de expressão relativa acima de 1,5 foram considerados como superexpressos e valores abaixo de 0,5 foram considerados com subexpressos. Para o cálculo da expressão relativa de CD46 total, a expressão relativa de cada cauda foi calculada de acordo com o método  $2^{-\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o gene *18S* como gene de referência; os valores de expressão das caudas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* foram somados, resultando no valor de expressão de CD46 total.

### 3.13 ANÁLISE DOS DADOS DE MICROARRANJO

A análise dos níveis de expressão gênica de moléculas do complemento durante infecção por *Mtb in vivo* foi realizada a partir dos dados de transcriptoma por microarranjo gerados pelos trabalhos de Berry e colaboradores (2010) e Cai e colaboradores (2014). Os dados de microarranjo pré-processados e disponibilizados em forma de matriz de fluorescência foram obtidos da base de dados Gene Expression Omnibus (GEO), disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. Os estudos foram depositados sob os números GSE19439 (BERRY et al., 2010) e GSE54992 (CAI et al., 2014).

A matriz de expressão, a matriz de sondas e os metadados foram estruturados e a expressão diferencial entre os grupos foi realizada por meio da utilização do pacote limma versão 3.6, publicada em 31 de Outubro de 2017 (RITCHIE et al., 2015). As análises foram realizadas no programa R versão 3.4.

### 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 9 para Windows 64-bit versão 9.3.1 (471). A normalidade da amostragem foi averiguada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. O teste *t* de Student pareado foi utilizado para comparação entre dois grupos. O teste *two-way* ANOVA pareado e respectivos pós testes, foram utilizados na comparação de três ou mais grupos. Os resultados foram representados em média  $\pm$  EPM. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados como estatisticamente significantes.





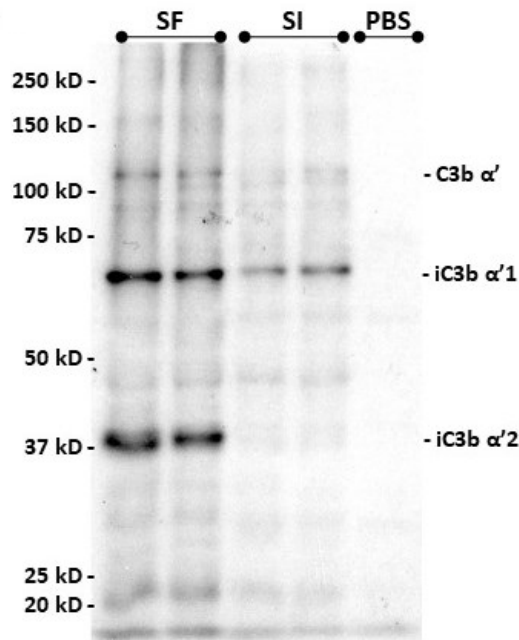
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou avaliar aspectos da interação Mtb-sistema complemento-monócitos humanos, nesse sentido, analisou-se a influência da opsonização mediada pelo complemento na aderência, fagocitose e crescimento intracelular de Mtb, em monócitos primários e de linhagem, bem como o envolvimento do receptor do complemento CD46 nesse processo. Assim, buscou-se inicialmente confirmar a capacidade de Mtb em ativar o sistema complemento, uma vez que a opsonização bacteriana por subprodutos de C3 é essencial para avaliação do papel do sistema complemento na interação Mtb-células imunes.

### 4.1 MTB ATIVA O SISTEMA COMPLEMENTO

A capacidade de ativação *in vitro* do sistema complemento por Mtb, cepa H37Rv, foi avaliada por meio da análise da fixação de subprodutos de ativação desse sistema na membrana micobacteriana. Para tanto, Mtb foi exposta ao SF por 30min e após sucessivas lavagens, avaliou-se os subprodutos de clivagem da proteína C3 – componente central da cascata de ativação – no extrato bacteriano. Neste contexto utilizou-se como controle Mtb exposta ao SI ou PBS (Figura 5). Como resultado observou-se a fixação de subprodutos de C3 na parede micobacteriana. Os componentes imunorreativos identificados na bactéria exposta ao SF possuem peso molecular aproximado de 110 kDa, 68 kDa e 40 kDa, e correspondem aos subprodutos de C3, C3b cadeia  $\alpha'$ , iC3b cadeia  $\alpha'1$  e iC3b cadeia  $\alpha'2$ , respectivamente (Figura 2). Na bactéria exposta ao SI observou-se em intensidade fraca apenas o fragmento de 68 kDa (iC3b cadeia  $\alpha'1$ ), ao passo que na bactéria exposta ao PBS não foi observado nenhum fragmento imunorreativo. A ausência de fragmentos imunorreativos na bactéria exposta a PBS indica a não ocorrência de ligação inespecífica entre o anticorpo utilizado e proteínas de Mtb (Figura 5). A presença de subprodutos de clivagem da cadeia  $\alpha$  é considerada evidência da ativação de C3 e portanto, da ativação do complemento (MAILLARD et al., 2015). Conclui-se então que Mtb promove a ativação *in vitro* do sistema complemento, com resultante deposição dos subprodutos de C3, C3b e iC3b em sua parede celular.

Figura 5 – Detecção de subprodutos de C3 em *Mycobacterium tuberculosis* após exposição ao soro humano e PBS



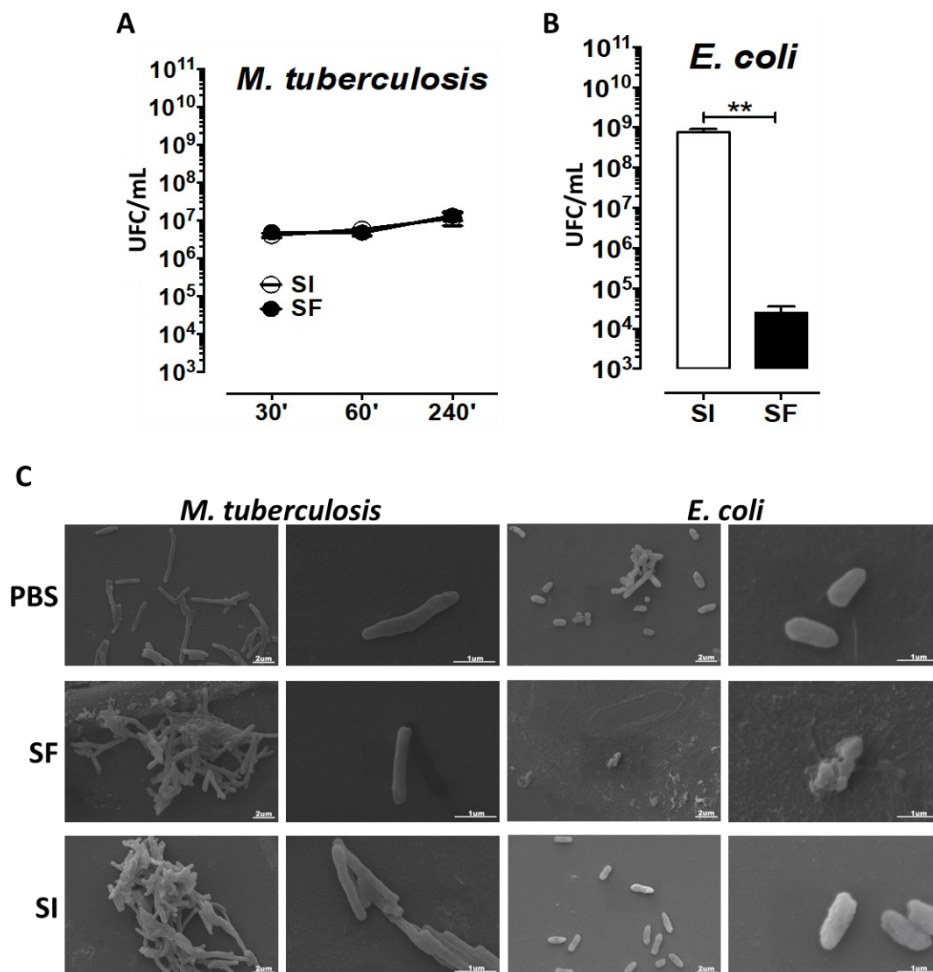
Legenda: *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv promove a ativação do sistema complemento. Mtb foi incubada em presença de SF, SI (humano) ou PBS por 30min a 37°C. Após incubação, as bactérias foram lavadas com solução salina e transferidas ao tampão de amostra para realização de Western Blot para detecção de C3. As amostras foram incubadas com soro policlonal anti-C3 humana. Colunas 1 e 2: Mtb incubada em SF, colunas 3 e 4: Mtb incubada em SI, coluna 5: Mtb incubada em PBS. Os marcadores de peso molecular encontram-se à esquerda da membrana e a identificação dos subprodutos de C3 à direita desta.

Os resultados encontrados corroboram os achados de Schlesinger e colaboradores (1990), os quais demonstraram a fixação da proteína C3 na parede de Mtb exposta ao SF, ao passo que quando exposta ao SI tal fixação foi substancialmente reduzida, porém não completamente eliminada, ocorrendo de forma residual. Os autores postularam que possivelmente as opsoninas fixadas à Mtb seriam C3b e iC3b (SCHLESINGER et al., 1990). Anos após, Ferguson e colaboradores (2004), orientados por Schlesinger, identificaram as opsoninas C3b e iC3b na parede de Mtb exposta ao SF, o que foi confirmado pelo presente trabalho. Adicionalmente, os autores mencionados anteriormente demonstraram a fixação *in vitro* de subprodutos de C3 à Mtb exposta ao lavado bronco alveolar concentrado, fornecendo evidências adicionais para a hipótese da ocorrência de opsonização *in vivo* (FERGUSON et al., 2004). No entanto, até o presente momento esta hipótese não foi comprovada.

#### 4.2 MTB É RESISTENTE À LISE MEDIADA PELO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (MAC)

Uma vez confirmada a ativação do sistema complemento por Mtb, buscou-se avaliar a viabilidade bacteriana mediante essa ativação, tendo vista que um dos pilares funcionais do sistema complemento é a lise bacteriana mediada pela formação do MAC (DUNKELBERGER; SONG, 2010; ZIPFEL; SKERKA, 2009). Para avaliar o potencial lítico do sistema complemento, Mtb e *Escherichia coli*, bactéria sabidamente susceptível à lise mediada por esse sistema, foram incubadas em SF ou SI, e a viabilidade bacteriana foi analisada pela quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e por microscopia eletrônica de varredura (Figura 6). Os resultados demonstraram que tanto Mtb exposta ao SF quanto ao SI apresentaram a mesma viabilidade (Figura 6A), ao passo que o organismo controle, *E. coli*, sofreu significativa redução nas contagens das UFC/mL quando exposto ao SF (Figura 6B), demonstrando o potencial lítico do sistema complemento presente no soro. Tais achados foram confirmados pela análise morfológica bacteriana por microscopia eletrônica, onde foi possível observar a parede celular intacta de Mtb exposta ao SF, contrastando com a evidente fragmentação da estrutura celular observada em *E. coli* exposta a essa mesma condição, fragmentação esta provocada pela lise mediada pelo sistema complemento (Figura 6C). Os resultados demonstram, portanto, que Mtb é resistente à lise mediada pelo sistema complemento.

Figura 6 – Lise mediada pelo sistema complemento em *Mycobacterium tuberculosis* e *Escherichia coli*



Legenda: **Mtb H37Rv é resistente à lise mediada pelo sistema complemento.** Mtb H37Rv e *E. coli* foram incubadas em SF, SI ou PBS a 37°C por 30min, 60min e 240 min (A), ou 30min (B, C). A viabilidade bacteriana após exposição ao soro foi avaliada (A-B) pela quantificação das UFC em ágar específico para cada espécie e (C) por microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de 6500X 8kV (colunas 1 e 3) e 25000X 8kV (colunas 2 e 4). Os resultados apresentados correspondem a média ± DV de um experimento representativo. Para a análise estatística empregou-se o teste t de Student: B)  $p = 0,0080$ . SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado.

Os resultados apresentados pelo presente trabalho preenchem uma lacuna na literatura, demonstrando pela primeira vez a resistência de Mtb à lise mediada pelo sistema complemento. Tal resistência também foi observada em outras micobactérias. Parkash e colaboradores (1992) avaliaram o efeito do sistema complemento sob a viabilidade de *Mycobacterium bovis* BCG e *Mycobacterium vaccae* demonstrando que a exposição ao complemento não resultou em redução da viabilidade ou alterações estruturais indicativas de destruição da parede celular,

apontando para a resistência dos organismos estudados à lise mediada pelo complemento (PARKASH et al., 1992).

Mtb e *M. bovis* BCG compartilham mais de 99.9% de identidade de nucleotídeos (CARROLL et al., 2009; GARNIER et al., 2003) e pela baixa virulência *M. bovis* BCG é amplamente empregada como modelo para o estudo da Mtb (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1999). Neste sentido, Carroll e colaboradores (2009) demonstraram a ligação de *M. bovis* BCG ao Fator H, um inibidor da ativação do complemento. Os autores postularam então que a ligação ao Fator H, caso ocorra em Mtb, poderia ser o mecanismo pelo qual tal bactéria é resistente à lise mediada pelo complemento (CARROLL et al., 2009). Adicionalmente, Gupta e colaboradores (2012) propuseram que a opsonização mediada pelo complemento seria tão efetiva em induzir a fagocitose de Mtb pelos macrófagos que a bactéria sequer chegaria a ser exposta aos estágios finais da cascata, a saber, a formação do MAC, promovendo a resistência (GUPTA et al., 2012). Contudo, até o presente momento não há dados que comprovem a ligação de Mtb ao Fator H ou demonstrem outros mecanismos de resistência à lise mediada pelo complemento. Dessa forma, futuros estudos que avaliem os mecanismos de evasão a lise mediada pelo complemento se fazem necessários.

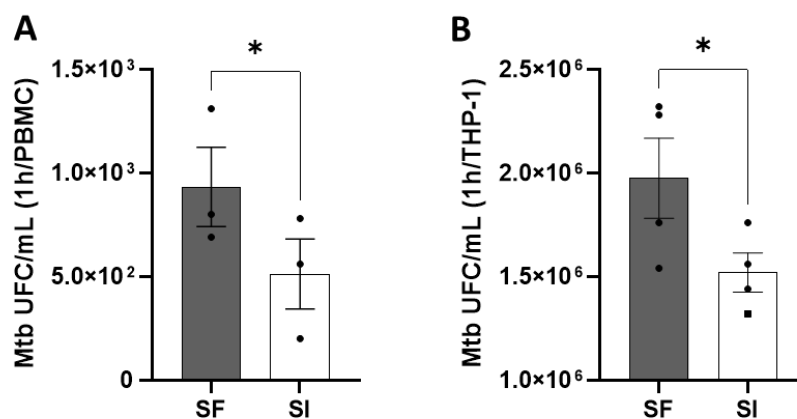
Os resultados apresentados até aqui indicam que, apesar de ativar o sistema complemento, Mtb é resistente à lise mediada por este, por mecanismos ainda não descritos. Como resultado da ativação do complemento Mtb é opsonizada pelos subprodutos de C3, C3b e iC3b. Desta forma, buscou-se avaliar a influência dessa opsonização na interação entre Mtb e células imunes, tendo em vista os aspectos de aderência e fagocitose.

#### 4.3 A PRÉ-OPSONIZAÇÃO MEDIADA PELO SISTEMA COMPLEMENTO AUMENTA A ADERÊNCIA E FAGOCITOSE DE MTB POR CÉLULAS IMUNES

A internalização bacteriana é fundamental para o estabelecimento do processo infeccioso uma vez que os bacilos de Mtb se multiplicam principalmente no interior dos macrófagos alveolares, seu principal nicho de infecção (EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986). A internalização é principalmente viabilizada por meio da aderência de Mtb aos macrófagos e decorrente fagocitose bacteriana promovida por estas células. Para a avaliação da aderência, Mtb H37Rv foi exposta ao SF ou SI por 30min a 37°C e após incubação as bactérias foram lavadas com solução salina, para remoção dos componentes do soro não aderidos à bactéria

(Figura 7). Em seguida, células primárias do PBMC humano (Figura 7A) e células de linhagem THP-1 (Figura 7B) foram expostas à Mtb e imediatamente incubadas por 1h a 4°C, temperatura impeditiva para a ocorrência do processo de fagocitose, o qual procede de maneira óptima a 37°C (SCHLESINGER et al., 1990). Após incubação, as células foram lavadas com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos e o sedimento celular foi lisado. As bactérias presentes no lisado celular foram então quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. Como resultado, observou-se maior número de UFC/mL no lisado celular infectado por bactérias pré-opsionizadas pelo complemento quando comparado a quantificação proveniente do lisado celular infectado com bactérias expostas ao SI (Figura 7). Dessa forma, concluiu-se que a pré-opsionização bacteriana aumenta a aderência de Mtb ao PBMC humano e monócitos THP-1.

Figura 7 – O papel da opsonização mediada pelo complemento na aderência de Mtb às células imunes



Legenda: **A opsonização promovida pela ativação do sistema complemento aumenta a aderência de Mtb ao PBMC e monócitos THP-1.** Mtb H37Rv foi incubada em SF ou SI por 30min a 37°C. Após lavagens as bactérias foram suspensas em meio RPMI sem SFB. Células do PBMC (A) e monócitos THP-1 não diferenciados (B) foram infectados com Mtb na MOI de 1 (1 bactéria/1 célula) por 1h e incubados em gelo. Após incubação as células foram lavadas por duas vezes com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos. O sedimento celular coletado após centrifugação foi lisado com Tween 0.05% e as UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. Os resultados apresentados correspondem (A) a média ± EPM de três doadores distintos em um experimento e (B) a média ± EPM de três doadores distintos em dois experimentos independentes. Para a análise estatística empregou-se o teste t de Student pareado: A) p = 0,0436, B) p = 0,0446. SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado. PBMC - Células Mononucleares do Sangue Periférico.

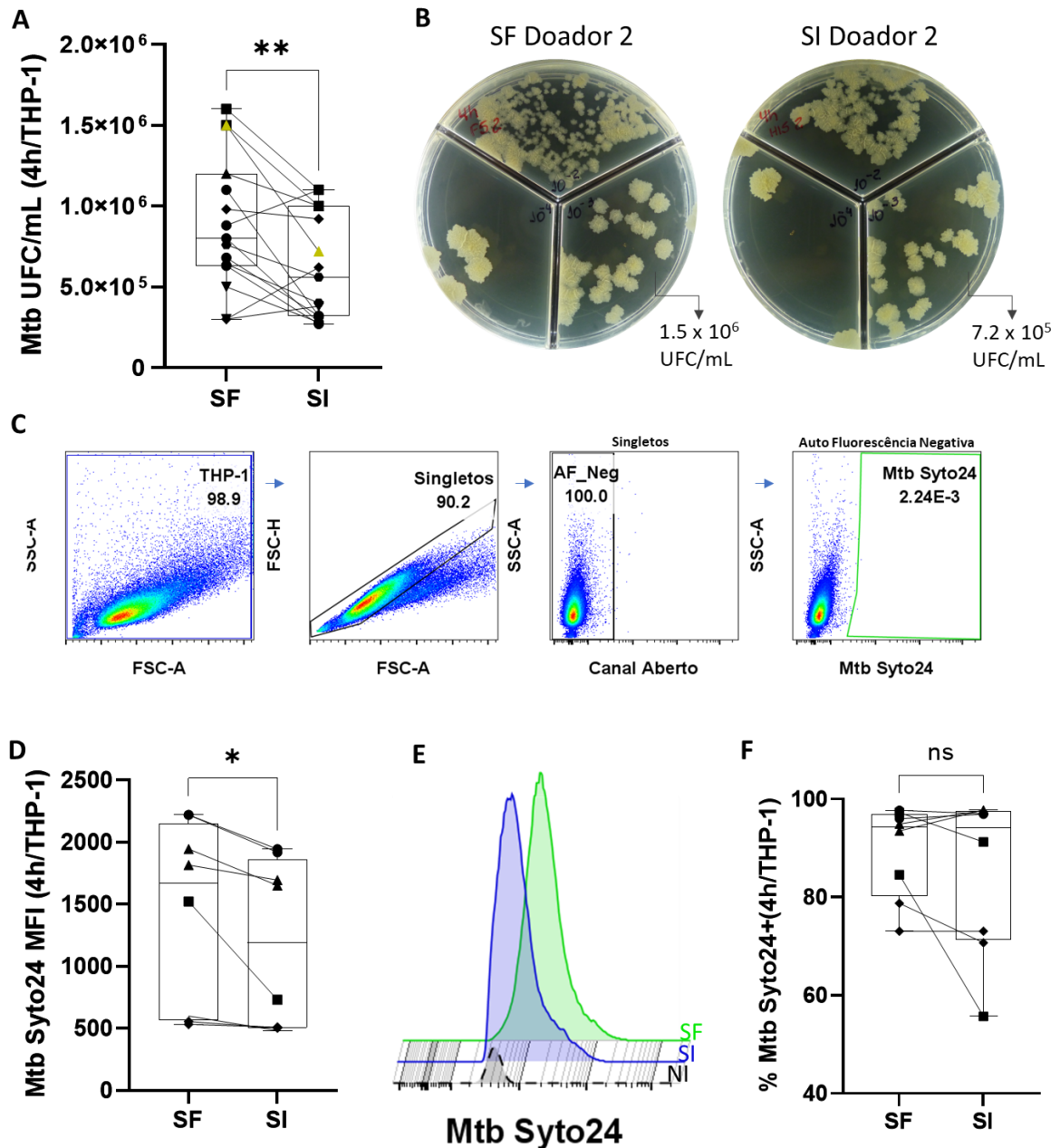
Até o presente momento não foram encontrados relatos na literatura acerca do papel da ativação do sistema complemento na aderência de Mtb a monócitos nas condições experimentais descritas pelo presente trabalho, especificamente no que se refere à incubação a 4°C com decorrente inibição da fagocitose. Os resultados apresentados indicam que a

opsonização bacteriana pelo complemento aumenta a fixação de Mtb aos monócitos, por mecanismos independentes da ativação do processo de fagocitose, o que pode vir a induzir a internalização bacteriana, seja ela mediada ou não pela fagocitose. Foi demonstrado que as opsoninas do complemento fixadas à parede celular de Mtb atuam como ligantes aos receptores do complemento CR1, CR3 e CR4 (HIRSCH et al., 1994; SCHLESINGER et al., 1990) os quais medeiam a internalização de Mtb por fagocitose. No entanto, o envolvimento de outros receptores que também possuem sítios de ligação para opsoninas do complemento, como CD46 e CD55, permanece inexplorado.

Uma vez que a opsonização bacteriana aumentou a aderência de Mtb ao PBMC e monócitos THP-1, em seguida investigou-se o papel de tal opsonização na promoção do processo de fagocitose. Para tanto, monócitos THP-1 foram infectados com Mtb pré-exposta ao SF ou SI e incubadas a 37°C por 4h (Figura 8). Após incubação as células foram lavadas com solução salina para remoção dos bacilos extracelulares e a fagocitose foi avaliada pela quantificação das UFC (Figura 8A-B) e associação de Mtb por citometria de fluxo (Figura 8C-F). A associação de Mtb previamente marcada com o fluoróforo Syto24 aos monócitos THP-1 foi quantificada pelo percentual de células positivas (Figura 8F) e pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de Mtb Syto24 (Figura 8C-E). Os resultados demonstraram maiores contagens das UFC de Mtb no lisado celular infectado pela bactéria pré-opsonizada pelo SF quando comparado ao lisado infectado por Mtb pré-exposta ao SI (Figura 8A-B). Além disso, tanto o percentual de células THP-1 positivas para Mtb Syto24 (Figura 8F) quando a mediana da intensidade de fluorescência de Syto24 nessas células (Figura 8D-E) foi maior durante a infecção por Mtb pré-exposta ao SF quando comparado a infecção por Mtb pré-exposta ao SI. Dessa forma, concluiu-se que a pré-opsonização bacteriana promoveu a fagocitose de Mtb por monócitos THP-1.



Figura 8 – O papel da opsonização mediada pelo complemento na fagocitose de *Mycobacterium tuberculosis* por monócitos THP-1

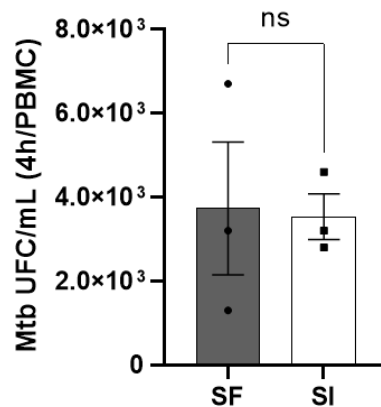


Legenda: A opsonização promovida pela ativação do sistema complemento aumenta a fagocitose de Mtb por monócitos THP-1. Mtb H37Rv foi incubada em SF ou SI de doadores distintos a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI sem SFB. Nos experimentos de citometria de fluxo, Mtb foi marcada com o fluoróforo Syto24 previamente à exposição ao soro. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas foram infectadas com Mtb pré-opsonizada na MOI de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após este período as células foram lavadas por duas vezes com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos. (A) O sedimento celular coletado após centrifugação foi lisado com Tween 80 a 0.05% e as UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. (B) Imagem representativa das UFC em ágar Middlebrook 7H10 após 28 dias de crescimento, referente a réplica destacada em amarelo em (A). (C-F) As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e a associação de Mtb a estas foi determinada por citometria de fluxo. (C) Gráficos de contorno representando a estratégia de *gate* utilizada para a análise da

associação de Mtb marcada com Syto24 às células THP-1. Os eventos selecionados em (C) foram analisados quanto ao MFI (D-E) e frequência (F) dos eventos positivos para Mtb Syto24. Os resultados apresentados em A, D e F correspondem a mediana + diagrama de caixa, quartis e limites máximo e mínimo, dos dados das réplicas de (A) 7 experimentos independentes e (D,F) 4 experimentos independentes, sendo que cada experimento foi identificado por diferentes símbolos. Para a análise estatística empregou-se o teste t de *Student* pareado: ns – não significante, A)  $p = 0,0057$ , D)  $p = 0,0254$ , F)  $p = 0,2777$ . SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado. NI – Não Infectado.

De forma semelhante, avaliou-se o papel da opsonização promovida pelo complemento sobre a fagocitose de Mtb pelo PBMC humano, sob as mesmas condições descritas para a avaliação da fagocitose por monócitos THP-1 (Figura 9). A fagocitose foi analisada pela quantificação das UFC de Mtb do lisado celular pós infecção em ágar Middlebrook 7H10. Os resultados demonstraram que a pré-opsonização pelo complemento não induziu aumento nas contagens de UFC, como observado em células THP-1. No entanto, deve-se considerar que a ausência de réplica biológica para o experimento em questão possa ter contribuído para a obtenção de resultado não significativo na análise estatística.

Figura 9 - O papel da opsonização mediada pelo complemento na fagocitose de *Mycobacterium tuberculosis* por células mononucleares do sangue periférico



Legenda: **A opsonização promovida pela ativação do sistema complemento não altera a fagocitose de Mtb por células do PBMC humano.** Mtb H37Rv foi incubada em SF ou SI de doadores distintos a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI sem SFB. Células do PBMC humano de doadores distintos foram infectadas com Mtb pré-opsonizada na MOI de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após infecção as células foram lavadas por duas vezes com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos. O sedimento celular coletado após centrifugação foi lisado com Tween 80 a 0.05% e as UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. Os resultados apresentados correspondem a média ± EPM de três doadores distintos em um experimento. Para a análise estatística empregou-se o teste t de *Student* pareado ( $p = 0,9322$ ), ns – não significante.

Os resultados apresentados corroboram os achados de diversos autores, os quais de forma comum, avaliaram a influência do complemento na fagocitose de Mtb por fagócitos

mononucleares, sob incubação a 37°C, porém diferiram amplamente em termos de cepa bacteriana utilizada (Erdman, H37Rv e H37Ra), tempo de infecção (1h à 2h), tipo celular infectado (monócitos derivados de PBMC, macrófagos derivados de monócitos - MDMs de PBMC e macrófagos alveolares), metodologia de opsonização, concentração de soro (0.02% a 30%) e metodologia utilizada para a avaliação da fagocitose (microscopia de fluorescência ou campo claro) (HIRSCH et al., 1994; MANIVANNAN; NARAYAN RAO; RAMANATHAN, 2012; SCHLESINGER, 1993; SCHLESINGER et al., 1990). Como resultado, todos os trabalhos mencionados observaram a indução da fagocitose de Mtb por fagócitos mononucleares mediada pela ativação do sistema complemento. Neste sentido, foi demonstrado que a fagocitose de Mtb em presença de soro é mediada principalmente pelos receptores CR1, CR3 e CR4, sendo que C3 fixada à parede bacteriana atua como o principal ligante desse processo (HIRSCH et al., 1994; SCHLESINGER et al., 1990).

Embora Mtb possa ser fagocitada por diversos tipos de receptores de forma dependente e independente da opsonização mediada pelo complemento (KILLICK et al., 2013), postula-se que a fagocitose induzida pela pré-opsonização observada no presente estudo seja mediada principalmente pelos receptores do complemento CR1, CR3 e CR4 uma vez que estes são os principais receptores fagocíticos presentes em monócitos e macrófagos, juntamente com os receptores Fcγ (FcγRI, II, III) (GUIRADO; SCHLESINGER; KAPLAN, 2013) e que já foi demonstrada a ligação de Mtb opsonizada a esses receptores (HIRSCH et al., 1994; SCHLESINGER et al., 1990).

Em relação à metodologia de opsonização, Schlesinger e colaboradores (1990) concluíram que a ativação do complemento promove a fagocitose tanto na condição de opsonização bacteriana anterior à infecção (pré-opsonização) quanto na condição em que o soro é adicionado ao meio de infecção. Neste sentido, o presente trabalho optou por avaliar a promoção da fagocitose na condição de pré-opsonização. Desta forma os achados encontrados possibilitam inferir que a promoção da fagocitose observada decorre da presença das opsoninas na parede de Mtb e não está associada a outros componentes presentes no soro (citocinas, quimiocinas, hormônios, anticorpos, entre outros), os quais podem influenciar a resposta celular quando presentes no meio de infecção. Além disso, o presente trabalho avaliou a fagocitose após 4h de incubação, tempo superior aos períodos avaliados na literatura. Desta forma, ampliou-se o tempo de exposição das células ao patógeno, o que pode vir a aumentar o número de bactérias fagocitadas. Ainda que o tempo de incubação tenha sido maior o fenótipo de

indução da fagocitose promovido pela ativação do complemento foi mantido, demonstrando a robustez do desenho experimental utilizado na avaliação do processo de fagocitose. De forma interessante, todos os trabalhos analisados avaliaram a fagocitose de Mtb por microscopia, por meio da quantificação visual dos bacilos associados às células (HIRSCH et al., 1994; MANIVANNAN; NARAYAN RAO; RAMANATHAN, 2012; SCHLESINGER, 1993; SCHLESINGER et al., 1990). Tal metodologia pode ser considerada menos sensível e mais laboriosa, quando comparada à quantificação das UFC de Mtb do lisado celular adotada no presente trabalho.

Em suma, os dados apresentados confirmam o papel promotor da ativação do complemento na indução da fagocitose de diversas cepas de Mtb, por diversos tipos celulares. Neste sentido o presente trabalho valida o papel do complemento na indução da fagocitose também em células de linhagem, as quais carregam as vantagens de fácil obtenção e manutenção, quando comparadas às células primárias como PBMC. Desta forma, o presente trabalho propõe um modelo experimental para avaliação da influência do complemento na fagocitose, apresentando uma metodologia de fácil execução e baixo custo, a qual reproduz os resultados relatados na literatura em vistas de se aprimorar o processo de avaliação da fagocitose mediada pelo complemento.

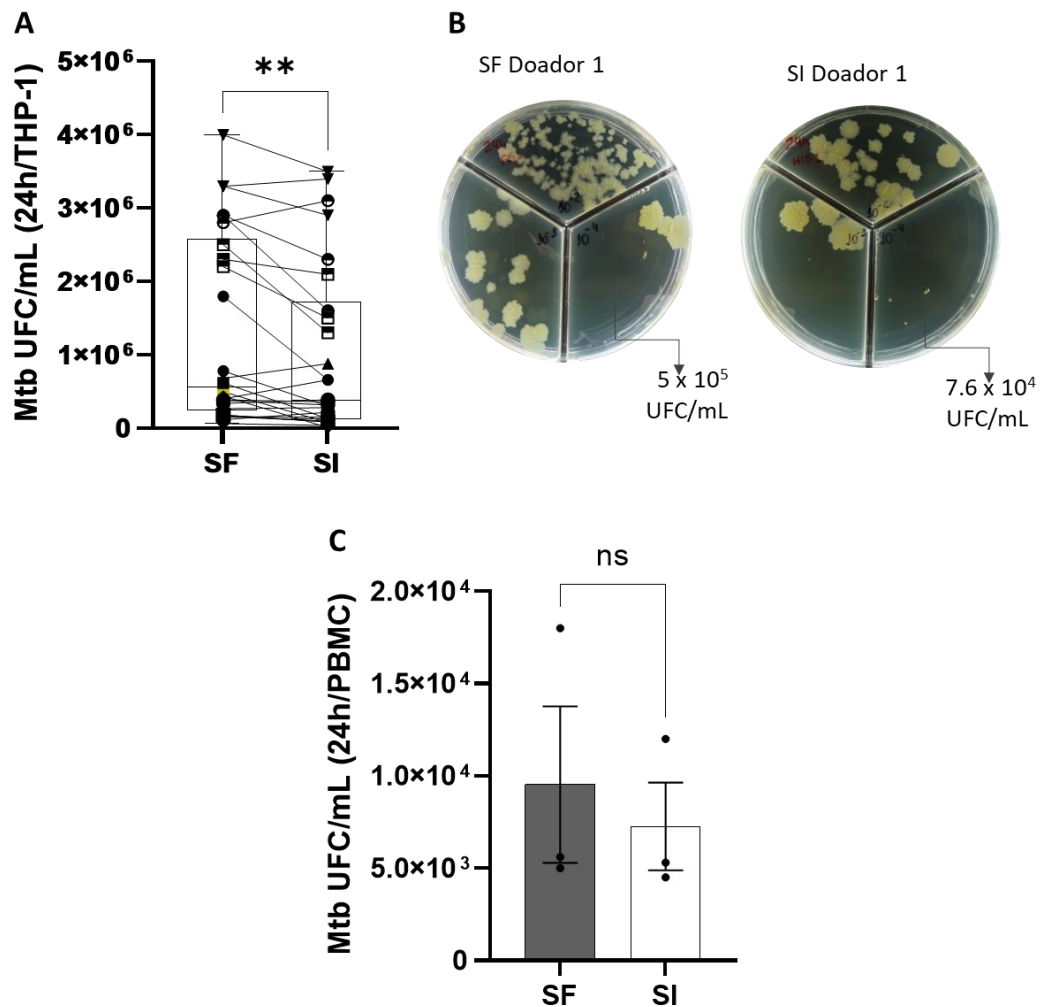
Os dados apresentados sugerem que a opsonização mediada pelo complemento favorece o estabelecimento da infecção, uma vez que a opsonização aumenta a internalização de Mtb pelo seu principal nicho de replicação, a saber, monócitos e macrófagos. No entanto, em consequência do processo de internalização, Mtb passa então a ser desafiada pelos mecanismos antimicrobianos intracelulares, os quais irão também determinar o curso da infecção. Essa aparente dualidade associada ao processo de internalização vem sendo investigada, uma vez que se acredita que a via de internalização pode modular a resposta celular, contribuindo para o sucesso ou fracasso do processo infeccioso. Como exemplo, Kang e colaboradores (2005) demonstraram que a ligação do lipídio de Mtb encapsulado por manose lipoarabinomanana (ManLAM) aos receptores de manose (MR) durante o processo fagocítico, limita a fusão do fagossomo com o lisossomo, favorecendo a sobrevivência bacteriana em macrófagos humanos (KANG et al., 2005). Este achado fomenta a hipótese de que a interação bactéria-receptor celular durante o processo da fagocitose pode ser determinante para a resposta antimicrobiana intracelular. Desta forma, buscou-se avaliar o papel da pré-opsonização bacteriana na viabilidade intracelular de Mtb em monócitos, com o objetivo de analisar se a

presença de opsoninas e consequente interação com seus receptores modula a resposta antimicrobiana do fagócito, sobretudo nos estágios iniciais da infecção.

#### 4.4 A PRÉ-OPSONIZAÇÃO MEDIADA PELO COMPLEMENTO FAVORECE A VIABILIDADE INTRACELULAR DE MTB EM CÉLULAS IMUNES

Por meio da fagocitose, Mtb alcança o microambiente intracelular, se localizando especificamente no interior dos fagossomos. Por mecanismos diversos Mtb é capaz de burlar as respostas antimicrobianas das células fagocíticas, de forma a impedir o processo de degradação e garantir a multiplicação e sobrevivência no interior dos macrófagos. Tais mecanismos vêm sendo continuamente investigados uma vez que o esclarecimento destes compõem potenciais alvos para fármacos. Nesta perspectiva, avaliou-se a viabilidade intracelular de Mtb pré-exposta ao SF ou SI, em células do PBMC humano e monócitos THP-1 após 24h de infecção. Para tanto, após 4h de infecção as células foram lavadas com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos, suspensas em meio RPMI Completo e incubadas por adicionais 20h. Ao fim do período de infecção as células foram lisadas e as bactérias contidas no interior dos fagócitos foram quantificadas em meio Middlebrook 7H10 (Figura 10). Como resultado, observou-se maior viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada por SF em monócitos THP-1 e, embora de forma não significativa, observou-se uma tendência a uma maior viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada em PBMC humano (Figura 10). Os resultados sugerem que a pré-opsonização bacteriana altera a resposta celular, de forma a favorecer a viabilidade intracelular bacteriana. Sugere-se ainda que esta alteração seja fruto da interação de Mtb pré-opsonizada com receptores de opsoninas do complemento.

Figura 10 - O papel da opsonização mediada pelo complemento e a viabilidade intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* em células imunes



Legenda: **A** opsonização promovida pela ativação do sistema complemento aumenta a viabilidade intracelular de Mtb monócitos THP-1. Mtb H37Rv foi incubada em SF ou SI de doadores distintos por 30min a 37°C. Após lavagens as bactérias foram suspensas em meio RPMI sem SFB. Monócitos THP-1 não diferenciados (**A-B**) ou PBMC humano (**C**) foram infectadas com Mtb na MOI aproximada de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação as células foram lavadas por duas vezes com solução salina, suspensas em meio RPMI Completo e incubadas por adicionais 20h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então centrifugadas e o sedimento coletado foi lisado com Tween 80 a 0.05%. As UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. (**B**) Imagem representativa das UFC em ágar Middlebrook 7H10 após 28 dias de crescimento, referente a réplica destacada em amarelo em (**A**). (**A**) Os resultados apresentados correspondem à mediana + diagrama de caixa, quartis e limites máximo e mínimo dos dados das réplicas de 11 experimentos independentes, sendo que cada experimento foi identificado por diferentes símbolos. Para a análise estatística empregou-se o teste de Wilcoxon pareado com  $p = 0,0055$ . (**B**) Os resultados apresentados correspondem a média  $\pm$  EPM de três doadores distintos em um experimento. Para a análise estatística empregou-se o teste t de *Student* pareado ( $p = 0,7419$ ), ns – não significante. SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado.

Os resultados encontrados no presente estudo somados aos achados de Manivannan e colaboradores (2012) contribuem para o melhor entendimento do papel do sistema

complemento na viabilidade intracelular bacteriana. Manivannan e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da presença de componentes da VC ou VA do complemento no crescimento intracelular de Mtb em MDMs humanos, após 24h de infecção. Os autores observaram aumento da viabilidade intracelular micobacteriana tanto em presença de componentes da VC quanto da VA, sendo que a indução da viabilidade foi similar entre as duas condições (MANIVANNAN; RAO; RAMANATHAN, 2012). De fato, tanto a ativação da VC quanto da VA resulta em clivagem de C3 e consequente opsonização, o que contribui para a indução da viabilidade também observada no presente estudo.

Considerando o aumento na aderência, fagocitose e viabilidade intracelular de Mtb induzida pela pré-opsonização bacteriana, sugere-se que a presença de opsoninas na parede extracelular do patógeno interfere com os mecanismos antimicrobianos intracelulares, por vias reguladas durante a interação entre patógeno opsonizado e receptores do complemento, durante o processo de aderência e fagocitose. Além disso, tendo em vista que Mtb é internalizada por diversos receptores (CR1, CR3, CR4, MR, FcγR, entre outros), sugere-se também que a via de internalização modula a resposta intracelular antimicrobiana. No entanto, os dados publicados em relação à internalização por diferentes receptores e decorrente modulação da resposta celular são controversos.

Malik e colaboradores (2000) demonstraram que a infecção de macrófagos por Mtb opsonizada pelo complemento inibiu a elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular mediada pelos receptores CR3 e CR4, o que contribui para a inibição da fusão fagossomo-lisossomo, promovendo a sobrevivência intracelular. De forma oposta, Mtb opsonizada por anticorpos induziu elevação dos níveis citosólicos de  $Ca^{2+}$ , o que promoveu as respostas antimicrobianas dos fagócitos (MALIK; DENNING; KUSNER, 2000). Esses achados fomentam a hipótese de que a via de internalização afeta a resposta antimicrobiana intracelular. Em contraponto, Hu e colaboradores (2000) evidenciaram que a progressão da tuberculose foi comparável entre camundongos CR3 *knockout* e camundongos selvagens, demonstrando que a ausência da sinalização mediada por CR3 não altera o curso da infecção *in vivo* (HU et al., 2000). Em consonância, Zimmerli e colaboradores (1996) mostraram que o bloqueio dos receptores CR1, CR3, CR4 e MR durante a infecção não afetou a viabilidade intracelular de Mtb opsonizada em MDMs, concluindo que os mecanismos pelos quais Mtb evade às respostas antimicrobianas intracelulares são independentes da internalização mediada por tais receptores (ZIMMERLI; EDWARDS; ERNST, 1996). Em suma, são necessários estudos que esclareçam o papel dos receptores

fagocíticos como CR1, CR3 e CR4 na viabilidade intracelular bacteriana, de forma a analisar se a ativação desses receptores durante a fagocitose resulta em sinalização celular que venha a modular os mecanismos antimicrobianos intracelulares.

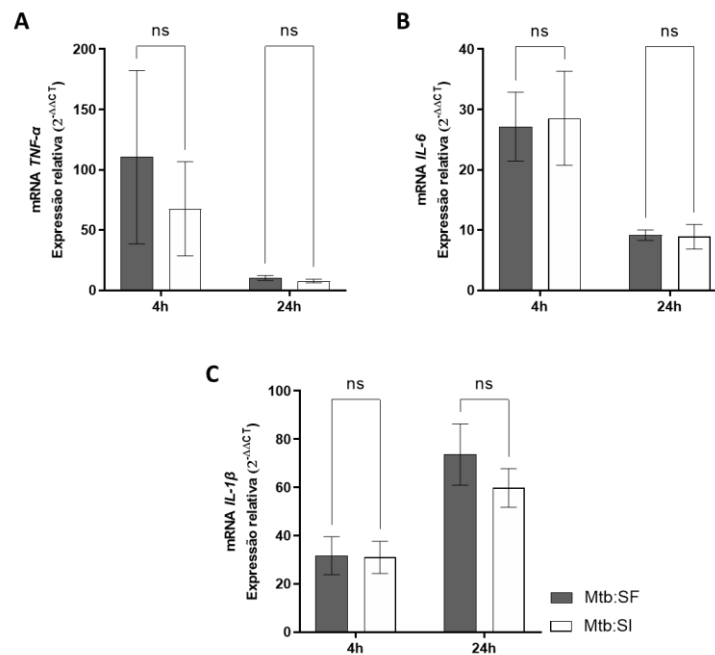
Manivannan e colaboradores (2012) também demonstraram aumento sinérgico da viabilidade intracelular de Mtb quando pré-opsonizada com anticorpos anti-Mtb IgG em conjunto com componentes do complemento (VC ou VA) (MANIVANNAN; RAO; RAMANATHAN, 2012), revelando o *crossalking* entre os receptores de internalização na modulação da resposta celular. A presença de quantidades moderadas de anticorpos antimicobacterianos foi observada em indivíduos de áreas endêmicas vacinados ou não com BCG (HERBERT et al., 1995) e a exposição humana à micobactérias do ambiente também está associada à produção de anticorpos antimicobacterianos (BRANDT et al., 2002). Assim, acrescenta-se que a indução da aderência, fagocitose e viabilidade intracelular observadas no presente estudo possa estar também associada à opsonização bacteriana mediada por anticorpos anti-Mtb, uma vez que não se conhece o perfil sorológico antimicobacteriano dos soros empregados nos experimentos. Nesse cenário, tanto o SF quanto o SI carregariam tais anticorpos, no entanto, o *crossalking* da sinalização mediada por receptores do complemento e receptores Fc $\gamma$  ocorreria somente na infecção por Mtb pré-opsonizada (SF), contribuindo para o fenótipo observado.

A resposta antimicrobiana intracelular de fagócitos é mediada pela ativação de diversas vias, como as vias pró-inflamatórias dos genes estimulados por interferon (ISGs), a via de IL-6, a via do NF- $\kappa$ B e a via do complemento. Os macrófagos, quando ativados, produzem diversas citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18, IL-2, entre outras), as quais estão envolvidas na indução do processo inflamatório e resposta antibacteriana (SHWAYAT, 2017). Uma vez que a pré-opsonização bacteriana aumentou a viabilidade intracelular de Mtb após 24h de infecção, buscou-se então avaliar se tal opsonização inibe a expressão de genes que codificam para citocinas pró-inflamatórias. Para tanto, monócitos THP-1 foram infectados com Mtb pré-exposta ao soro, por 4h e 24h e a expressão dos genes TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , os quais são induzidos durante fagocitose mediada por receptores do complemento (ACHARYA et al., 2020), foi avaliada pela técnica de Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) (Figura 11). Os resultados demonstraram que a pré-opsonização de Mtb não inibiu a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias avaliadas, tanto durante a fagocitose quanto nas primeiras 24h da



infecção *in vitro* (Figura 11). Os achados sugerem que os mecanismos de facilitação da sobrevivência intracelular bacteriana induzida pela opsonização por iC3b e C3b, em 24h de infecção, independem da supressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ .

Figura 11 - Níveis de expressão de genes pró-inflamatórios durante infecção por *Mycobacterium tuberculosis* pré-exposta ao SF ou SI



Legenda: A infecção por Mtb pré-opsonizada não inibe a expressão gênica de *TNF- $\alpha$* , *IL-6* e *IL-1 $\beta$*  nos tempos iniciais da infecção. Mtb H37Rv foi incubada em SF ou SI de doadores distintos a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI sem SFB. Monócitos THP-1 foram infectados com Mtb pré-exposta ao soro na MOI de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h e 24h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Nos tempos de infecção determinados extraiu-se o mRNA, sintetizou-se o cDNA e procedeu-se com a RT-qPCR. A expressão relativa dos genes (A) *TNF- $\alpha$* , (B) *IL-6* e (C) *IL-1 $\beta$*  nas amostras infectadas em relação ao controle não infectado foi calculada de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando o gene *18S* como gene de referência. Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  EPM das réplicas obtidas em três experimentos independentes. Para a análise estatística empregou-se o teste *two-way* ANOVA e pós teste de Šidák. ns – não significante. SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado.

Os resultados observados no presente estudo dialogam em concordância com os achados de Bohlson e colaboradores (2001), os quais demonstraram que os níveis da citocina TNF- $\alpha$ , no sobrenadante de BMDMs de camundongos *knockout* para C3 (C3<sup>-/-</sup>) infectados por *Mycobacterium avium*, foram similares entre a infecção por bactéria pré-opsonizada com soro C3<sup>-/-</sup> e pré-opsonizada com soro C3<sup>+/+</sup>. Tais achados propõem que a ausência da opsonização micobacteriana juntamente com a ausência da expressão de C3 não afeta a produção de TNF- $\alpha$  (BOHLSON et al., 2001). Assim, ambos resultados sugerem que a pré-opsonização por subprodutos de C3 não afeta a produção de TNF- $\alpha$ . Em oposição aos achados práticos do

presente estudo porém em concordância com a hipótese proposta por este, Irani e Maslow (2005) demonstraram que macrófagos murinos infectados por *M. avium* em presença de SF sintetizam quantidades inferiores de TNF- $\alpha$ , quando comparado à infecção em presença de SI (IRANI; MASLOW, 2005). Assim, a síntese de TNF- $\alpha$  em resposta a infecção por bactéria opsonizada pelo complemento permanece controversa.

Como mencionado anteriormente, Carroll e colaboradores (2009) demonstraram a ligação de *M. bovis* BCG ao Fator H. Abdul-Aziz e colaboradores (2016) observaram que a ligação do Fator H à *M. bovis* BCG aumentou a síntese, nas células hospedeiras, das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, ao passo que reduziu a síntese das citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- $\beta$  e IL-12. Os autores sugeriram que a ativação da resposta pró-inflamatória promovida pelo reconhecimento do Fator H nos estágios iniciais da infecção favorece a formação do granuloma, o que contribui para o estabelecimento do nicho de replicação bacteriana (ABDUL-AZIZ et al., 2016).

Em suma, a contribuição da pré-opsonização micobacteriana na síntese de citocinas pró-inflamatórias não está clara. Futuros estudos são necessários para esclarecer se a opsonização interfere com a resposta celular de forma a facilitar o estabelecimento da infecção.

Com base no disposto até aqui, fica clara a relevância da interação Mtb-sistema complemento durante infecção *in vitro*. Por meio de suas opsoninas e receptores, a ativação do sistema complemento promove o aumento da aderência, fagocitose e viabilidade intracelular de Mtb em fagócitos, o que pode interferir drasticamente no curso do processo infeccioso.

De forma a complementar os experimentos realizados até aqui, buscou-se então avaliar a relação Mtb-sistema complemento durante infecção *in vivo*, por meio da análise do perfil de expressão gênica de componentes do complemento durante a infecção por Mtb, sobretudo em relação aos receptores do complemento que possuem sítios de ligação para as opsoninas C3b e iC3b.

#### 4.5 RECEPTORES DO SISTEMA COMPLEMENTO INTERACTORES DE C3b e iC3b ESTÃO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE TB ATIVA *IN VIVO*

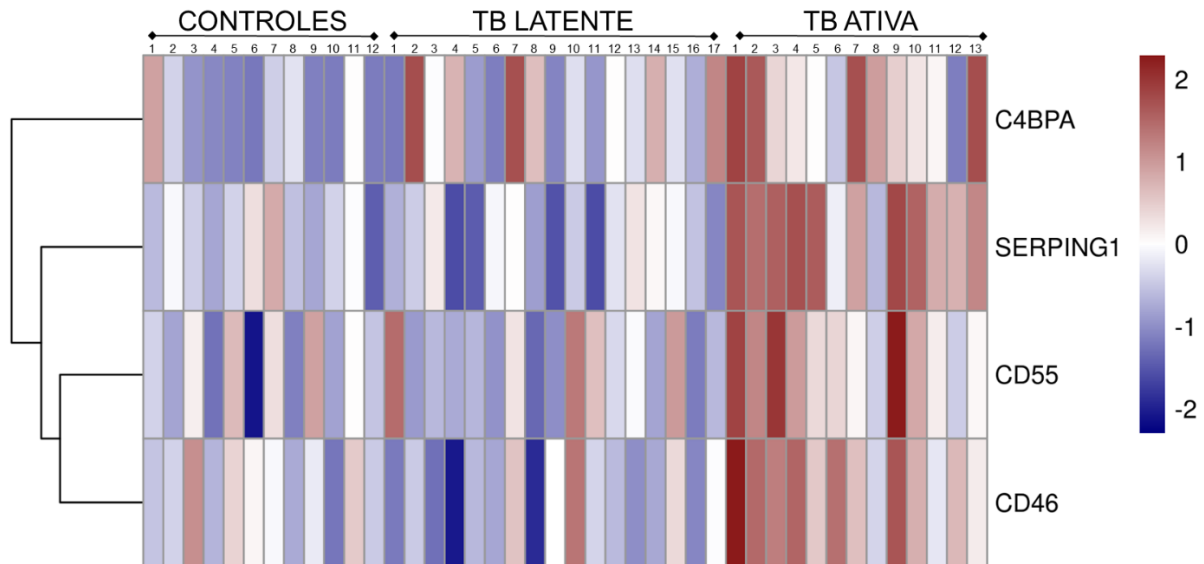
O sistema complemento é composto por moléculas presentes na membrana celular e plasma, as quais interagem entre si bem como com outras moléculas do sistema imune. (ZIPFEL; SKERKA, 2009). Das moléculas presentes na superfície celular, algumas interagem

com as opsoninas C3b e iC3b, as quais estão depositadas na parede celular micobacteriana e como demonstrado anteriormente, atuam na interação Mtb-célula hospedeira. CD46, CD55, CR1, VSIG4, SUSD4, CFH, CFHR e CFI são exemplos moléculas que possuem sítios de ligação para subprodutos de C3, sendo que CD46, CD55, VSIG4 estão expressas na membrana plasmática de monócitos humanos (FUJITA et al., 1987; SEYA; ATKINSON, 1989; WIESMANN et al., 2006).

Assim, o presente estudo buscou avaliar a expressão gênica de componentes do sistema complemento durante infecção *in vivo* por Mtb. A partir dos dados de *microarranjo* de dois estudos depositados no repositório Gene Expression Omnibus (GEO), sob os números GSE19439 (BERRY et al., 2010) e GSE54992 (CAI et al., 2014), analisou-se o transcriptoma de pacientes com TB ativa, TB latente e controles saudáveis, com enfoque nas moléculas que possuem sítios de ligação para subprodutos de (Figura 12, Figura 13). A matriz de contagem de ambos os estudos foi baixada e as análises de bioinformática foram executadas de forma independente às análises realizadas pelos autores que geraram o transcriptoma.

Berry e colaboradores (2010), realizaram o transcriptoma por *microarranjo* do sangue total de 13 pacientes portadores de TB ativa, 17 portadores de TB latente e 12 pacientes saudáveis (BCG+) (GSE19439). Os resultados obtidos a partir das análises dos dados de *microarranjo* demonstraram níveis elevados de expressão dos genes *C4BPA*, *SERPING1*, *CD55*, *CD46* (Figura 12), *CR1*, *CIQBP*, *CFH*, *SUSD4* e *VSIG4* (dados não demonstrados) nos pacientes portadores de TB ativa, em relação aos demais grupos.

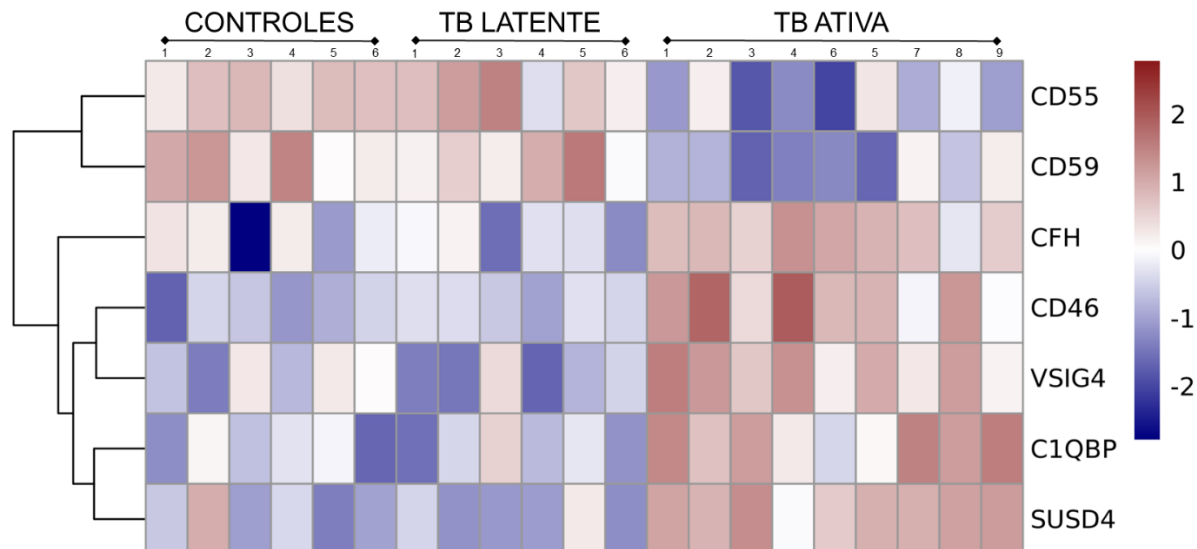
Figura 12 – Níveis de expressão de genes reguladores do sistema complemento no sangue total de pacientes portadores de tuberculose



Legenda: **Os genes que codificam para as proteínas do sistema complemento CD46 e CD55 encontram-se superexpressos em pacientes portadores de TB ativa.** Os dados de microarranjo do sangue total de pacientes portadores de TB ativa, TB latente e controles saudáveis, depositados na base de dados GEO sob o número GSE19439, foram reanalisados quanto a expressão gênica de moléculas do sistema complemento. A expressão diferencial entre os grupos foi analisada com o pacote limma. Os resultados apresentados no *heatmap* correspondem a expressão normalizada em z-score.

Cai e colaboradores (2014), realizaram o transcriptoma por microarranjo do PBMC de 9 pacientes portadores de TB ativa, 6 portadores de TB latente e 6 pacientes saudáveis (BCG+) (GSE54992). Os resultados demonstraram níveis elevados de expressão dos genes *CFH*, *CD46*, *VSIG4*, *CIQBP* e *SUSDA* e níveis reduzidos dos genes *CD55* e *CD59* nos pacientes portadores de TB ativa, em relação aos demais grupos (Figura 13).

Figura 13 - Níveis de expressão de genes reguladores do sistema complemento no PBMC de pacientes portadores de tuberculose



Legenda: **O gene que codifica para a proteína do sistema complemento CD46 encontra-se superexpresso em pacientes portadores de TB ativa.** Os dados de microarranjo de PBMC de pacientes portadores de TB ativa, TB latente e controles saudáveis, depositados na base de dados GEO sob o número GSE54992, foram reanalisados quanto a expressão gênica de moléculas do sistema complemento. A expressão diferencial entre os grupos foi analisada com o pacote limma. Os resultados apresentados no *heatmap* correspondem a expressão normalizada em z-score.

Dentre os genes que demonstraram alterações no perfil de expressão em pacientes portadores de TB ativa, destacam-se *CD46* e *CD55*, os quais interagem com subprodutos de C3 e estão presentes na membrana de monócitos. Nos resultados do microarranjo, *CD46* foi superexpresso tanto no sangue total quanto no PBMC, ao passo que *CD55* foi superexpresso apenas no sangue total.

Os resultados do presente estudo corroboram os achados de Scriba e colaboradores (2017), os quais analisaram o transcriptoma do sangue periférico de pacientes portadores de TB latente ao longo de 2 anos e meio, acessando as alterações transcricionais que precederam o diagnóstico dos indivíduos que evoluíram para TB ativa. Durante progressão da TB latente para TB ativa, os autores observaram elevação nos níveis de expressão de moléculas pertencentes as vias “Resposta ao IFN”, “Inflamação Mieloide”, “Monócitos” e “Cascata do Complemento”. Tais achados reforçam o cenário do processo inflamatório intenso que se estabelece durante a progressão da doença. Durante a progressão, os níveis transcricionais dos genes reguladores do sistema complemento *C4BPB*, *CD46*, *CD55*, *CD59*, *CLU*, *CRI*, *PROSI* e *SERPING1*

apresentaram-se elevados nos pacientes que progrediram para TB ativa em relação aos controles (SCRIBA et al., 2017). Os dados da literatura associados aos resultados do presente trabalho chamaram a atenção para o envolvimento do receptor CD46 na patogênese da tuberculose.

Além de atuar na regulação da cascata de ativação do complemento, estudos recentes demonstraram que CD46 também atua na regulação do processo inflamatório (HAJISHENGALLIS; LAMBRIS, 2010; HANSEN et al., 2018), autofagia (HUANG; BRUMELL, 2014; JOUBERT et al., 2009) e homeostasia de linfócitos T (TRUSCOTT et al., 2010). Adicionalmente, CD46 medeia a internalização de diversos patógenos como *Neisseria gonorrhoeae* (KÄLLSTRÖM et al., 1997) e o vírus sarampo (SCHNEIDER-SCHAULIES et al., 1996). Além disso, sugere-se que CD46 se liga a bactérias opsonizadas por C3b/C4b (RILEY-VARGAS et al., 2004)

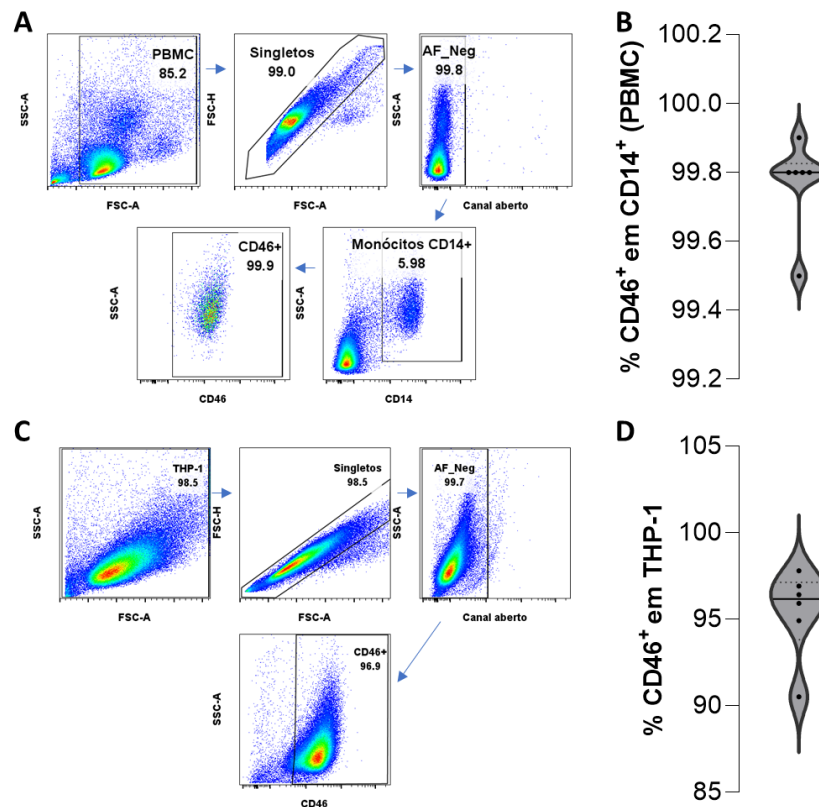
Tendo em vista a superexpressão de *CD46* durante infecção *in vivo* por *Mtb*, os relatos recentes do envolvimento desse receptor na sinalização do processo inflamatório e regulação da resposta celular e a interação direta com outros patógenos, postulou-se então que durante a infecção, *Mtb* interage com o receptor CD46, o que pode resultar em modulação da resposta intracelular. Sugere-se ainda que tal interação ocorra por meio dos subprodutos de C3 ligados à parede celular micobacteriana ou pela interação direta do patógeno com o receptor. Além disso, é possível que a infecção por *Mtb* module a expressão de CD46, de forma a favorecer a replicação bacteriana e o estabelecimento da infecção. Assim, buscou-se inicialmente avaliar a expressão de CD46 durante infecção *in vitro* por *Mtb*.

#### 4.6 A INFECÇÃO *IN VITRO* POR *MTB* ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE CD46

Sabe-se que a proteína CD46 é amplamente expressa em todas as células do sangue periférico, com exceção dos eritrócitos; e é também expressa por células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos (SEYA; ATKINSON, 1989). Com o intuito de confirmar a expressão de CD46 nos tipos celulares estudados, os níveis basais de expressão da proteína CD46 foram mensurados por citometria de fluxo em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC (Figura 14B) e monócitos THP-1 (Figura 14D). Para a seleção das células CD14<sup>+</sup> do PBMC utilizou-se a estratégia de *gate* representada na Figura 14A. Para o refinamento dos monócitos THP-1 utilizou-se a estratégia de *gate* apresentada na Figura 14B. A partir dos resultados observou-se que cerca de

99,8% e 96% dos monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC e monócitos THP-1 expressam CD46, respectivamente (Figura 14). Cerca de 99% das células totais do PBMC expressam CD46 sendo que os níveis de expressão de CD46 são superiores em células mielóides quando comparado a células linfóides (Figura Suplementar 1).

Figura 14 – Expressão basal da proteína CD46 no PBMC humano e células THP-1



Legenda: **Monócitos CD14<sup>+</sup> de PBMC humano e monócitos THP-1 expressam a proteína CD46 em sua maioria.** Células do PBMC humano e monócitos THP-1 não infectados foram marcados com anticorpos ligados a fluoróforos e fixados com paraformaldeído a 4%. O percentual de células positivas para a proteína CD46 foi mensurado por citometria de fluxo. (A, C) Gráficos de contorno representando a estratégia de *gate* utilizada para a análise do percentual basal (sem estímulo) de células CD46<sup>+</sup> em monócitos CD14<sup>+</sup> de PBMC humano (A) e células da linhagem THP-1 (C). Os resultados apresentados em B e C correspondem à mediana e interquartis dos dados obtidos em dois experimentos independentes.

Os dados obtidos corroboram os relatos da literatura (RAO et al., 2012; SEYA; ATKINSON, 1989), confirmando a ampla expressão de CD46 nos tipos celulares estudados. Adicionalmente, Rao e colaboradores (2012) observaram que a expressão de CD46 foi maior em monócitos e células dendríticas do PBMC humano quando comparado às células linfóides (RAO et al., 2012), apontando para relevância de CD46 em células mielóides.

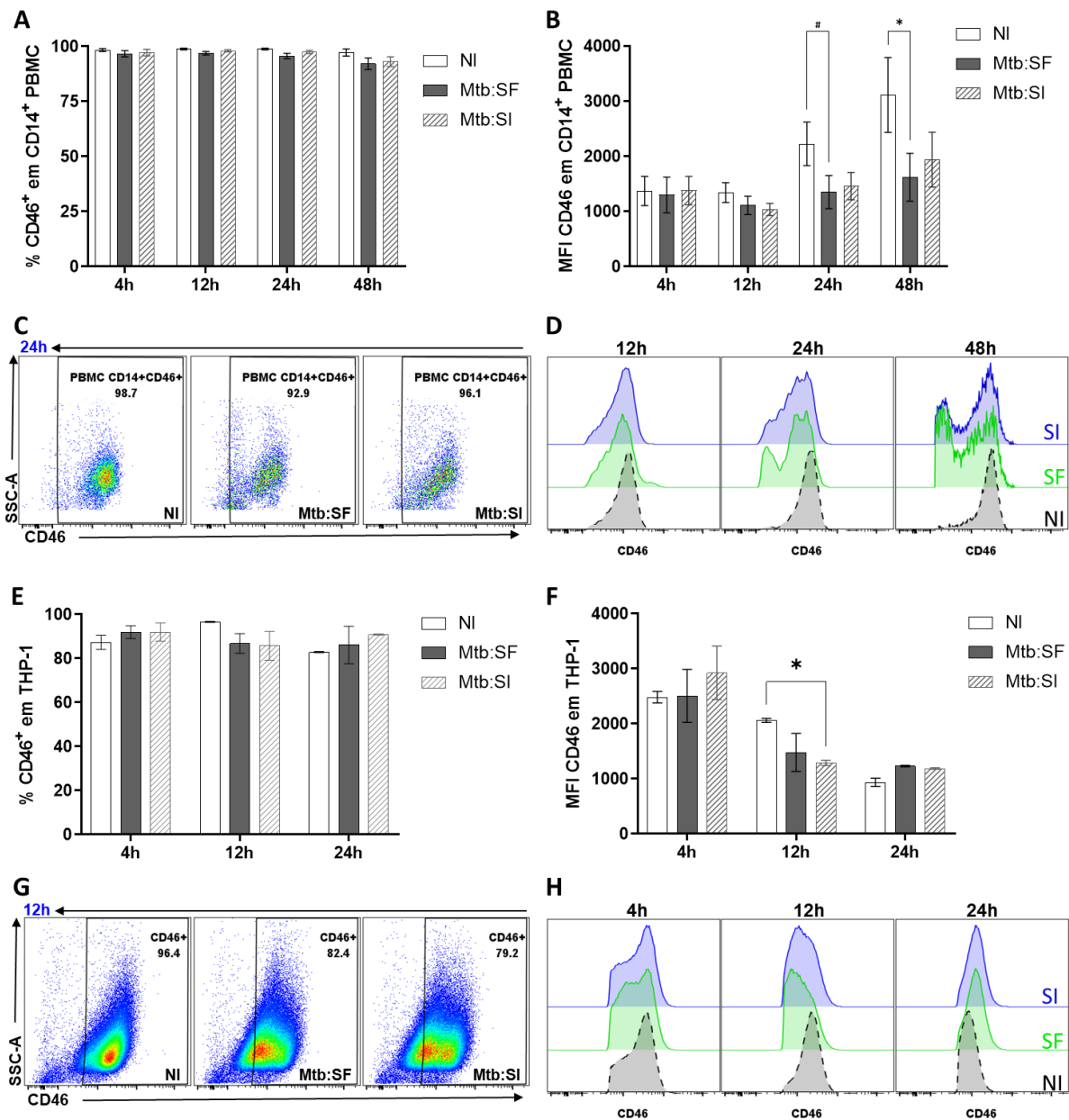
Após confirmar os níveis de expressão basal de CD46 nos tipos celulares estudados, buscou-se então avaliar a influência da infecção por Mtb pré-opsonizada na expressão proteica de CD46. Para tanto, células do PBMC humano e monócitos THP-1 foram infectados com Mtb pré-exposta ao SF ou SI e a expressão de CD46 foi avaliada por citometria de fluxo, nos tempos de infecção 4h, 12h, 24h e 48h (Figura 15). A frequência e MFI de CD46 foram avaliadas nas populações de monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC e monócitos THP-1, definidas pelas estratégias de *gate* representadas na Figura 14.

Em relação a frequência, observou-se que a infecção por Mtb, pré-exposta ao SF ou SI, não alterou o percentual de células positivas para CD46, tanto em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC (Figura 15A,C) quanto em THP-1 (Figura 15E,G), considerando todos os tempos de infecção. Em relação ao MFI de CD46 em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC, observou-se redução significativa nos níveis de expressão de CD46 após 24h e 48h de infecção por Mtb exposta ao SF, quando comparado ao controle não infectado (NI). Observou-se também tendência à redução no MFI de CD46 nas células infectadas por Mtb exposta ao SI, quando comparado ao NI, nos mesmos tempos de infecção. Nos tempos de 4h e 12h não foram observadas alterações em nenhuma das condições (Figura 15B,D). Em se tratando do MFI de CD46 em monócitos THP-1, observou-se redução significativa nos níveis de expressão de CD46 após 12h de infecção por Mtb exposta ao SI, quando comparado ao NI. Adicionalmente, observou-se tendência à redução no MFI de CD46 nas células infectadas por Mtb exposta ao SF, quando comparado ao NI, também em 12h. Nos tempos de 4h e 24h não foram observadas alterações em nenhuma das condições (Figura 15F,H). Acrescenta-se ainda que o experimento com monócitos THP-1 foi realizado uma única vez e deve ser repetido para confirmar os níveis observados (Figura 15E-H).

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a infecção por Mtb reduz a expressão de CD46 na superfície celular, tanto em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC quanto em THP-1, sendo que a exposição ao SF potencializou a redução de CD46 em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC.



Figura 15 – Expressão proteica de CD46 durante infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.



Legenda: A infecção por *Mtb* reduz a expressão proteica de CD46 de forma dependente da pré-exposição ao soro e tempo de infecção. *Mtb* H37Rv foi incubada em SF ou SI de doadores distintos a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI -SFB. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas ou células do PBMC humano de doadores distintos foram infectadas com *Mtb* pré-exposta ao soro na MOI de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram lavadas com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos, suspensas em meio RPMI Completo e incubadas por adicionais 8h, 20h e 44h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Nos tempos de infecção determinados as células foram sedimentadas, marcadas com anticorpos ligados a fluoróforos e fixadas com paraformaldeído a 4%. A expressão de CD46 em monócitos CD14<sup>+</sup> de PBMC humano (A-D) e monócitos THP-1 (E-H) foi analisada por citometria de fluxo. A estratégia de *gate* utilizada para a análise encontra-se descrita na Figura 14. A expressão de CD46 foi analisada quanto a frequência (%) e MFI. (A, E) Frequência de células positivas para CD46: em monócitos CD14<sup>+</sup> de PBMC (A) e monócitos THP-1 (E). MFI de CD46 em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC (B) e monócitos THP-1 (F). Gráficos de contorno representando a frequência de CD46 em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC (C) e monócitos THP-1 (G). Histogramas representativos do MFI de CD46 em monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC (D) e monócitos THP-1 (H).

(H). Os resultados apresentados em (A,B) correspondem à média  $\pm$  EPM de seis doadores em quatro experimentos independentes. Os resultados apresentados em (E,F) correspondem à média  $\pm$  EPM de duas réplicas em um experimento. Para a análise estatística em (B) empregou-se o teste t de *Student* pareado: #p = 0,0470, \*p = 0,0268. Para a análise estatística em (F) empregou-se o teste *two-way* ANOVA e pós teste de Dunnett, p = 0,0150. SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado. NI – Não Infectado.

Os resultados apresentados preenchem uma lacuna na literatura acerca da influência da infecção por Mtb na expressão do receptor CD46, o qual teve sua expressão proteica reduzida durante os tempos iniciais de infecção. A redução dos níveis extracelulares de CD46 pode contribuir para a sobrevivência intracelular de Mtb, atuando como mecanismo de evasão à ação antimicrobiana intracelular. Além disso, a pré-opsonização bacteriana potencializou o efeito redutor induzido pela infecção, apontando para possível *crosstalk* entre a sinalização decorrente do reconhecimento/internalização de Mtb e o envolvimento de receptores de opsoninas na redução da expressão proteica de superfície de CD46. É possível que a redução da expressão proteica de CD46 na superfície das células infectadas seja mediada pela inibição da transcrição gênica, pela internalização do receptor e/ou pela clivagem e desprendimento do receptor da superfície celular.

Outros patógenos como *N. gonorrhoeae* e o vírus sarampo regulam negativamente a expressão proteica de CD46 durante infecção, explorando tal receptor como mecanismo de evasão às defesas antimicrobianas do hospedeiro. Schneider-Schaulies e colaboradores (1996), demonstraram que algumas cepas do vírus sarampo promoveram a rápida redução da expressão proteica de CD46 em células não infectadas (células *bystander*) em co-cultivo com células infectadas. Em consequência, as células *bystander* se tornam mais susceptíveis à lise mediada pelo complemento, o que colabora em parte para explicar a linfopenia e imunossupressão observada na fase aguda da infecção por sarampo (SCHNEIDER-SCHAULIES et al., 1996). Yant e colaboradores (1997) observaram que a redução de CD46 durante infecção por sarampo ocorre pela internalização do receptor, o que resultou em maior susceptibilidade da célula hospedeira à lise mediada pelo complemento e redução da apresentação de antígeno via MHC-I e MHC-II (YANT; HIRANO; WONG, 1997). Gill e colaboradores (2003) mostraram que a redução da expressão de CD46 em células epiteliais durante infecção por *N. gonorrhoeae* produtora de pili ocorreu por meio da clivagem da proteína, liberada em vesículas derivadas do hospedeiro (GILL et al., 2003). Em 2019, Kim e colaboradores demonstraram que a ligação de *N. gonorrhoeae* à CD46 na superfície de células epiteliais induziu autofagia, mediada pelo receptor CD46-CYT1, o que promoveu a eliminação bacteriana nos estágios iniciais da

infecção. No entanto, no decorrer do processo infeccioso, *N. gonorrhoeae* promoveu o recrutamento de CD46-CYT1 para o córtex celular e clivagem do receptor por metaloproteinases e Presenilina/ $\gamma$ Secretase, o que juntamente com o remodelamento dos lisossomos resultou na evasão à morte mediada por autofagia e favorecimento da sobrevivência intracelular (KIM et al., 2019). Assim, observa-se que *N. gonorrhoeae* e sarampo promovem redução da expressão de superfície de CD46 por internalização e clivagem do receptor, como mecanismo de evasão aos processos antimicrobianos intracelulares.

A redução da expressão proteica de CD46 observada no tempo de 24h, durante infecção por Mtb pré-opsonizada, coincide com a maior viabilidade intracelular bacteriana observada nesse mesmo período. Assim, propõem-se alguns mecanismos que expliquem essa aparente relação entre redução de CD46 e aumento da viabilidade intracelular:

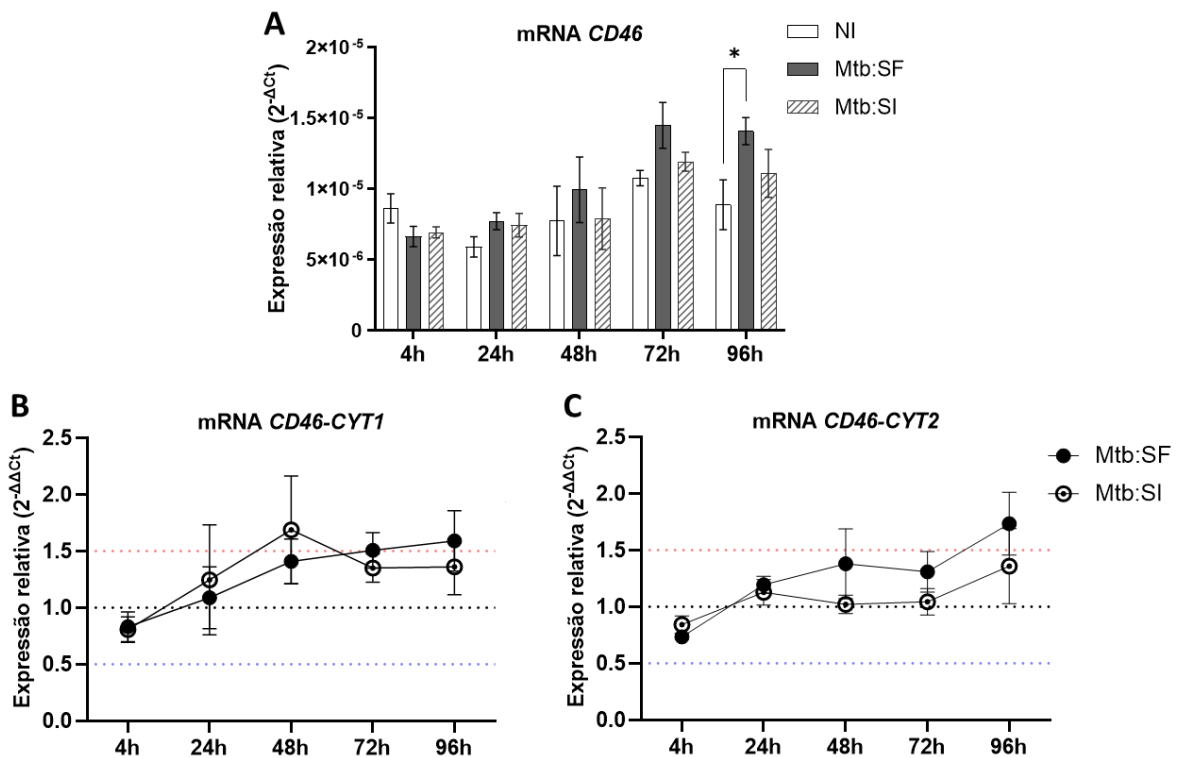
I) Joubert e colaboradores (2009) demonstraram que a ativação de CD46 induz o processo de autofagia, por meio da sinalização mediada pela cauda intracelular CD46-CYT1 (JOUBERT et al., 2009). Gutierrez e colaboradores (2004) mostraram que a autofagia reduz a sobrevivência de *M. bovis* BCG e Mtb em macrófagos infectados (GUTIERREZ et al., 2004). Assim, é possível que Mtb induza a redução de CD46 como forma de bloquear a indução da autofagia.

II) A proteína CD46 é alvo de processo enzimático, sendo clivada por metaloproteinases e pela Presenilina/ $\gamma$ Secretase (NI CHOILEAIN; ASTIER, 2012). A infecção por Mtb induz a expressão de metaloproteinases (COUSSENS et al., 2009; QUIDING-JÄRBRINK; SMITH; BANCROFT, 2001). Assim, é possível que as metaloproteinases induzidas por Mtb promovam a clivagem de CD46 da superfície celular, como forma de inibir a sinalização mediada por CD46, como por exemplo a autofagia.

Tendo em vista a redução na expressão de superfície de CD46 durante infecção por Mtb, buscou-se então avaliar se a redução da expressão proteica seria reflexo da inibição da transcrição do gene *CD46*. Para tanto, os níveis transcricionais de *CD46* e de suas isoformas caudais *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* foram analisados por RT-qPCR, em células do PBMC, durante infecção por Mtb pré-exposta ao soro, nos tempos de infecção 4h, 24h, 48h, 72h e 96h (Figura 16). A partir dos resultados observou-se que a infecção por Mtb pré-opsonizada induziu a expressão de *CD46* após 96h de infecção, em relação ao controle não infectado (Figura 16A). Ao analisar as diferentes isoformas caudais observou-se que a infecção por Mtb pré-opsonizada induziu minimamente (*fold increase* superior a 1,5) a expressão de *CD46-CYT1* (Figura 16B)

e *CD46-CYT2* (Figura 16C) no tempo de infecção de 96h, sendo que a indução da cauda *CD46-CYT2* foi ligeiramente superior à indução da cauda *CD46-CYT1*. Além disso, no decorrer do experimento, ocorreu modificação na proporção da expressão das diferentes caudas, com elevação da expressão cauda *CD46-CYT2*, o que foi observado mesmo nas células não infectadas (Figura Suplementar 2). Conclui-se, portanto, que a infecção por *Mtb* pré-opsonizada induz a expressão gênica de *CD46* após 96h de infecção no PBMC total.

Figura 16 - Expressão gênica de *CD46* durante infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.



Legenda: **A** infecção por *Mtb* aumenta a expressão gênica de *CD46* ao longo do tempo. *Mtb* H37Rv foi incubada em SF ou SI de doadores distintos a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI -SFB. Células do PBMC humano de doadores distintos foram infectadas com *Mtb* pré-exposta ao soro na MOI de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram lavadas com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos, suspensas em meio RPMI Completo e incubadas por adicionais 20h, 44h, 68h e 92h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Nos tempos de infecção determinados o mRNA foi extraído com o reagente TRIZOL, segundo instruções do fabricante. A expressão relativa das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* foi calculada de acordo com o método 2<sup>-ΔCt</sup> (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando o gene *18S* como gene de referência. **(A)** A expressão total de *CD46* foi obtida por meio da soma dos valores de expressão das diferentes isoformas. **(B,C)** A expressão relativa das isoformas *CD46-CYT1* **(B)** e *CD46-CYT2* **(C)** em relação ao controle não infectado foi calculada de acordo com o método 2<sup>-ΔCt</sup> (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando o gene *18S* como gene de referência; valores de expressão relativa acima de 1,5 foram considerados como superexpressos e valores abaixo de 0,5 foram considerados com subexpressos. Os resultados apresentados correspondem à média ± EPM de PBMC de três doadores distintos em um experimento. Para a análise estatística empregou-se o teste *two-way* ANOVA e pós teste de Tukey. Apenas as comparações significativas foram assinaladas, p = 0,0431. SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado. NI – Não Infectado.

Não foram encontrados relatos na literatura acerca do papel da infecção por *Mtb* (opsonizada ou não) na expressão gênica de *CD46* e suas isoformas caudais.

O PBMC é constituído aproximadamente por 70-90% de linfócitos (T CD3<sup>+</sup>: 70-85%, B CD19<sup>+</sup>: 5-20%), 5-20% de células *natural killer*, 5-20% de monócitos, 1-2% de células dendríticas, sendo que ocorre variação entre indivíduos (AUTISSIER et al., 2010). Dessa forma é importante considerar que a expressão gênica observada é representativa de todas as populações contidas no PBMC, não refletindo necessariamente o perfil transcricional das células fagocíticas como os monócitos CD14<sup>+</sup>. Tendo em vista o papel de *CD46* na regulação de linfócitos T (LE FRIEC et al., 2012; LISZEWSKI et al., 2005, 2013; TRUSCOTT et al., 2010), é possível que a indução de *CD46* observada em 96h seja reflexo da ativação dos receptores de células T (TCR) juntamente com os receptores de *Mtb* opsonizada. Futuros experimentos se fazem necessários no intuito de identificar a expressão de *CD46* nos monócitos do PBMC.

Hirano e colaboradores (1999) observaram que a expressão de *CD46-CYT1* humana em macrófagos murinos elevou a produção de óxido nítrico (NO) em resposta à infecção por sarampo em presença de INF- $\gamma$ , ao passo que a expressão de *CD46-CYT2* induziu redução nos níveis de NO (HIRANO et al., 1999). Assim, postula-se que a tendência à superexpressão da isoforma *CD46-CYT2* seja indicativa de uma polarização do PBMC para fenótipo anti-inflamatório. Hansen e colaboradores (2017, 2018), observaram que durante o processo de diferenciação dos monócitos para células dendríticas derivadas de monócitos ocorreu modificação no perfil de expressão das isoformas de *CD46*, com aumento da predominância das isoformas contendo a cauda *CD46-CYT2*, em relação a predominância desta cauda nos monócitos. Além disso, os monócitos apresentaram modificação da predominância para a isoforma *CD46-CYT2* mesmo quando não estimulados, como observado no presente estudo, indicando que a modificação no perfil de expressão das caudas citoplasmáticas pode ser induzida pelo cultivo por si só (Figura Suplementar 2) (BILTOFT; HANSEN; HÖLLSBERG, 2017; HANSEN et al., 2018).

A expressão gênica de *CD46* é induzida por interferon (IFN tipo I e IFN tipo II) (RUSINOVA et al., 2013). Assim, é possível que a elevação nos níveis de mRNA de *CD46* observada em 96h seja em resposta à produção de IFN pelas células infectadas, o que justificaria o fenótipo no tempo de infecção mais tardio. Além disso, é plausível que a elevação da

expressão gênica mais tardia ocorra como mecanismo de compensação resultante da redução da expressão proteica observada em 24h e 48h.

Em suma, os resultados demonstram que a infecção por Mtb, sobretudo quando pré-opsonizada, induz redução nos níveis proteicos de CD46 na superfície de monócitos CD14<sup>+</sup> do PBMC e células THP-1, nos tempos de 24h e 48h de infecção, o que não é explicado por alterações na expressão gênica de CD46 e suas isoformas. Nos tempos tardios de infecção (96h) ocorre a indução da expressão gênica de CD46, com discreto predomínio da expressão da isoforma *CD46-CYT2*.

Os resultados apresentados até aqui demonstram a relevância da interação Mtb-sistema complemento-células fagocíticas no estabelecimento da infecção, tendo sido demonstrada a indução da aderência, fagocitose e viabilidade intracelular de Mtb em fagócitos mediada pela pré-opsonização. Além disso, foi demonstrado que a infecção por Mtb induz a expressão do gene *CD46 in vivo* e *in vitro*, e reduz a expressão proteica de CD46 *in vitro*, tendo sido observado o envolvimento da pré-opsonização na modulação da expressão gênica e proteica *in vitro*.

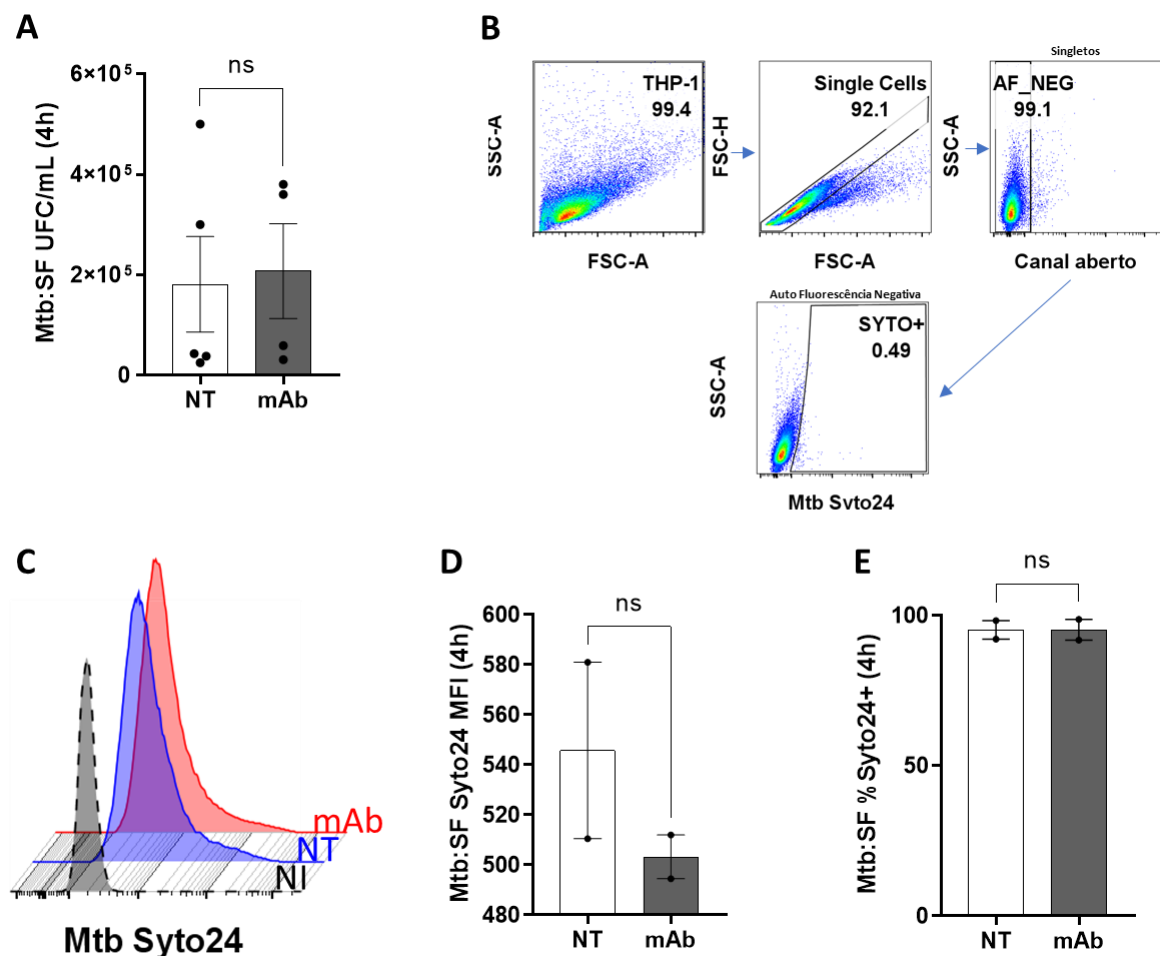
De forma a complementar os experimentos realizados até aqui, buscou-se avaliar o papel de sítios de ligação à C3b presentes em CD46 na fagocitose e viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada.

#### 4.7 O BLOQUEIO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO À C3B EM CD46 NÃO ALTERA A FAGOCITOSE DE MTB PRÉ-OPSONIZADA POR CÉLULAS THP-1

Com base nos resultados apresentados até aqui, postula-se que subprodutos de C3 depositados na parede micobacteriana interagem com receptores do complemento, como CD46, resultando em indução da internalização bacteriana. Nesse sentido, a interação entre Mtb pré-opsonizada e CD46 foi avaliada por meio da utilização de anticorpo monoclonal (mAb) neutralizante *mouse* anti-CD46 humana (clone GB24), o qual bloqueia a ligação de C3b às repetições consensuais curtas SCR3 e SCR4 de CD46 sem induzir a ativação do complemento (KARP et al., 1996; LISZEWSKI et al., 2000) e inibindo a função regulatória de CD46 (Figura Suplementar 3). Para tanto, células THP-1 foram tratadas com mAb neutralizante anti-CD46 por 1h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, e posteriormente infectadas com Mtb pré-opsonizada. Após 4h de incubação as células foram sedimentadas e a fagocitose foi avaliada pela quantificação das UFC

de Mtb no lisado celular (Figura 17A) e associação de Mtb por citometria de fluxo a partir da fluorescência emitida por Mtb previamente marcada com Syto24 (Figura 17B-E). Como resultado, observou-se que o bloqueio de CD46 não reduziu a fagocitose de Mtb por células THP-1, demonstrando que, em presença de anticorpo anti-CD46, não houve redução do MFI (Figura 17C,D) ou porcentagem de células positivas para Mtb-Syto24 (Figura 17E). Além disso, após contagem das UFC intracelulares, observou-se também que o número de bactérias não foi menor na condição tratada com mAb quando comparado a não tratada (NT) (Figura 17A). A partir de então concluiu-se que CD46 possivelmente não atua sozinho ou possua grande influência como receptor para internalização de Mtb opsonizada.

Figura 17 – Bloqueio de CD46 e fagocitose de *Mycobacterium tuberculosis* pré-opsonizada por células THP-1



Legenda: O bloqueio de CD46 não afeta a fagocitose de Mtb pré-opsonizada por células THP-1. Mtb foi incubada em SF a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI -SFB. Nos experimentos de citometria de fluxo Mtb foi marcada com o corante Syto24 previamente à exposição ao SF. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas foram tratadas com anticorpo monoclonal (mAb)

neutralizante mouse anti-CD46 humana (clone GB24) na concentração de 10 µg/mL ou meio RPMI -SFB (NT), por 1h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então infectadas com Mtb pré-opsonizada na MOI aproximada de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após infecção as células foram lavadas por duas vezes com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos. **(A)** O sedimento celular coletado após centrifugação foi lisado com Tween 0.05% e as UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. **(B-E)** As células foram fixadas com paraformaldeído 4% e a associação de Mtb a estas foi determinada por citometria de fluxo. **(B)** Gráficos de contorno representando a estratégia de *gate* utilizada para a análise da associação de Mtb marcada com Syto24. Os eventos selecionados em **(B)** foram analisados quanto ao MFI **(C-D)** e frequência **(E)** de Mtb Syto24. Os resultados apresentados correspondem à média ± EPM de dois experimentos independentes. Para a análise estatística empregou-se o teste t de *Student* pareado: ns – não significante, **(A)** p = 0,07615, **(D)** p = 0,3549, **(E)** p = 0,9097. NT – Não Tratado com mAb. mAb – tratado com mAb. NI – Não infectado e tratado com mAb.

Os achados reportados acrescentam novos dados à relação Mtb-sistema complemento-células fagocíticas, contribuindo para a elucidação do papel do receptor CD46 e a influência da opsonização neste cenário. O bloqueio dos sítios de ligação de CD46 à C3b, localizados nas regiões SCR3 e SCR4, não são determinantes para a internalização de Mtb opsonizada. No entanto, com base nos experimentos realizados, não é possível excluir a contribuição de CD46 para o processo de internalização, tendo em vista que outros sítios de ligação à C3b permanecem inexplorados. Além disso, sabe-se que os receptores CR1, CR3 e CR4 possuem grande relevância na internalização de Mtb opsonizada pelo complemento. Dessa forma, o papel de CD46 poderia estar sendo mascarado pela internalização promovida por esses receptores. Portanto, o bloqueio concomitante dos sítios de ligação à CR1, CR3 e CR4 juntamente com o bloqueio de CD46 pode vir a fornecer dados mais detalhados acerca do papel de CD46 na internalização de Mtb opsonizada.

De forma a complementar os resultados obtidos, buscou-se avaliar a influência do bloqueio dos sítios de ligação à C3b em CD46 na viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada no tempo de infecção de 24h.

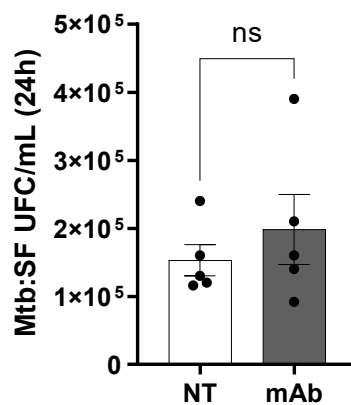
#### 4.8 O BLOQUEIO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO À C3B EM CD46 NÃO ALTERA O CRESCIMENTO INTRACELULAR DE MTB PRÉ-OPSONIZADA EM CÉLULAS THP-1

Tendo em vista que a ativação de CD46 induz sinalização celular (JOUBERT et al., 2009) e que a pré-opsonização mediada pelo complemento aumenta a sobrevivência de Mtb em fagócitos após 24h de infecção, buscou-se avaliar a influência do bloqueio de sítios de ligação à C3b na viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada, no tempo de infecção de 24h. Para tanto, células THP-1 foram tratadas com mAb como descrito anteriormente e posteriormente infectadas com Mtb pré-opsonizada pelo complemento. Após 24h de infecção as células foram



lisadas e as UFC de Mtb foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10 (Figura 18). Como resultado, observou-se que o bloqueio dos sítios de ligação à C3b de CD46 com mAb GB24 não alterou as UFC de Mtb pré-opsonizada, demonstrando que a ligação de Mtb pré-opsonizada aos sítios estudados, caso ocorra, não é responsável pelos mecanismos de facilitação da sobrevivência intracelular observados no tempo de infecção de 24h. Os resultados também indicam que CD46, por meio dos sítios de ligação estudados, não atua na regulação celular durante os estágios iniciais de infecção.

Figura 18 – Bloqueio de CD46 e crescimento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* pré-opsonizada em células THP-1 após 24h de infecção.



Legenda: **O bloqueio de CD46 não afeta o crescimento intracelular de Mtb pré-opsonizada em células THP-1 após 24h de infecção.** Mtb foi incubada em SF a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI -SFB. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas foram tratadas com anticorpo monoclonal (mAb) neutralizante mouse anti-CD46 humana (clone GB24) na concentração de 10 µg/mL ou meio RPMI -SFB (NT), por 1h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então infectadas com Mtb pré-opsonizada na MOI 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 4h, as células foram lavadas por duas vezes com solução salina, suspensas em meio RPMI completo e incubadas por 20h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então centrifugadas e o sedimento coletado foi lisado com Tween 0.05%. As UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. Os resultados apresentados correspondem à média ± EPM de dois experimentos independentes. Para a análise estatística empregou-se o teste t de *Student* pareado: ns – não significativa, p = 0,4804. NT – Não Tratado com mAb. mAb – tratado com mAb

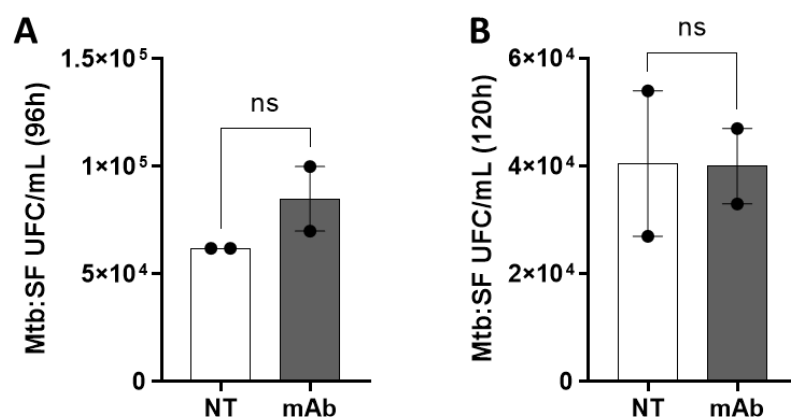
O papel dos sítios de ligação à C3b estudados, presentes em CD46, não está associado à modulação da resposta celular de forma a favorecer a viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada. No entanto, não é possível excluir o papel de CD46 nos mecanismos de evasão às defesas antimicrobianas intracelulares, uma vez que outros sítios de ligação à C3b não foram bloqueados durante infecção. Futuras investigações se fazem necessárias, com o intuito de verificar se o bloqueio de todos os sítios de ligação à C3b irá modular a resposta celular.

Não está claro se CD46 exerce papel protetor ou deletério ao hospedeiro durante infecção por Mtb. Truscott e colaboradores (2010) investigaram o papel da ativação de CD46 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> na resposta celular durante infecção por *M. bovis* BCG. Os autores observaram que a ativação de CD46 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> induz secreção de fatores solúveis que suprimem a resposta antimicrobiana de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e  $\gamma\delta_2$  TCR<sup>+</sup>, apontando para possível papel deletério de CD46 durante infecção por Mtb. No entanto, sabe-se que a sinalização decorrente da ativação de CD46 é dependente de sua cauda citoplasmática (CYT1 e CYT2) (JOUBERT et al., 2009). Dessa forma, é essencial determinar a relação das diferentes caudas de CD46 e a infecção por Mtb, sendo que o bloqueio dos sítios de ligação à C3b extracelulares pouco nos permite inferir sobre a sinalização intracelular deflagrada.

Considerando que a infecção por Mtb induz redução na expressão proteica de CD46 é possível sugerir que CD46 desempenha papel protetor ao hospedeiro. Esta hipótese é reforçada pelo fato de CD46 ser um gene estimulado por interferon, sendo relevante durante a resposta pró-inflamatória e antimicrobiana. Assim, futuros estudos são necessários visando esclarecer o papel de CD46 na infecção por Mtb.

Adicionalmente, investigou-se se o bloqueio de CD46 por mAb anti-CD46 GB24 induziria maior crescimento intracelular nos tempos de infecção mais tardios, a saber, 96h e 120h (Figura 19). Os resultados demonstraram que os sítios de ligação à C3b bloqueados não desempenham papel relevante na resposta celular antimicrobiana nos tempos de infecção tardios.

Figura 19 - Bloqueio de CD46 e crescimento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* pré-opsonizada em células THP-1 após 96h e 120h de infecção.



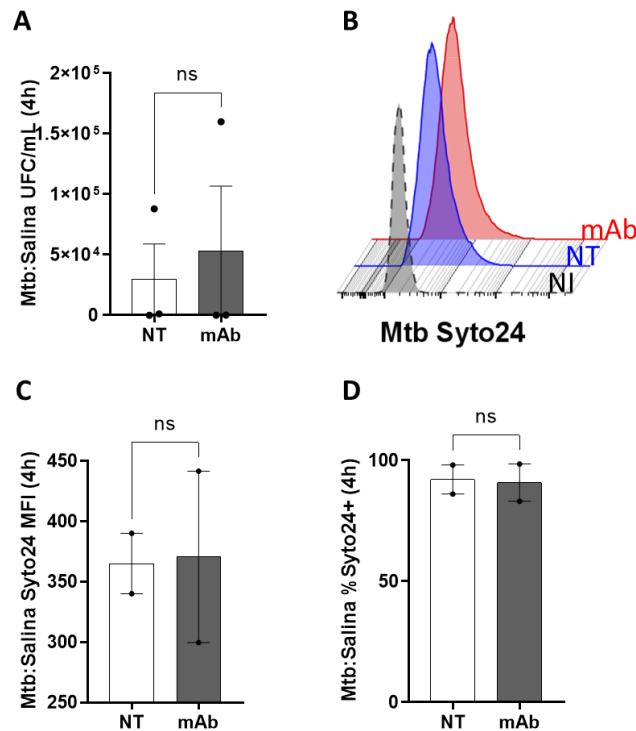
Legenda: O bloqueio de CD46 não afeta a sobrevivência intracelular de Mtb pré-opsonizada em células THP-1 após 96h e 120h de infecção. Mtb foi incubada em SF a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com

solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI -SFB. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas foram tratadas com anticorpo monoclonal (mAb) neutralizante mouse anti-CD46 humana (clone GB24) na concentração de 10 µg/mL ou meio RPMI -SFB (NT), por 1h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então infectadas com Mtb pré-opsonizada na MOI 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 4h, as células foram lavadas por duas vezes com solução salina, suspensas em meio RPMI Completo e incubadas por adicionais 92h e 116h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então centrifugadas e o sedimento coletado foi lisado com Tween 80 0.05%. As UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. Os resultados apresentados correspondem à média ± EPM de dois poços independentes, infectados por bactérias pré-opsonizadas com SF de dois doadores distintos em um experimento. Para a análise estatística empregou-se o teste t de *Student* pareado: ns – não significativo, A) p = 0,3679, B) p = 0,9511. NT – Não Tratado com mAb. mAb – tratado com mAb.

#### 4.9 O BLOQUEIO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO À C3B EM CD46 NÃO ALTERA A FAGOCITOSE DE MTB NÃO OPSONIZADA EM CÉLULAS THP-1

Interessantemente, ao relatar a ligação de diferentes patógenos à CD46, Cattaneo (2004) descreveu tal receptor como sendo um “ímã de patógenos” (*Pathogens Magnet*). CD46 atua como receptor para o vírus sarampo, vírus herpes humano 6, diferentes sorotipos de adenovírus, *Streptococcus pyogenes* e espécies patogênicas de *Neisseria* (ASTIER, 2008; CATTANEO, 2004b; KÄLLSTRÖM et al., 1997; SAKURAI et al., 2007; SCHNEIDER-SCHAULIES et al., 1996). Os atributos de CD46 que o torna tão atrativo como via de internalização de diversos patógenos despertam interesse no meio científico, sendo que a interação direta entre Mtb e CD46 permanece inexplorada. Nesse sentido, buscou-se avaliar o papel de CD46 na fagocitose de Mtb não opsonizada (não exposta ao soro, porém lavada com solução salina) mediante bloqueio de CD46 por meio de anticorpo neutralizante anti-CD46 clone GB24. Para tanto, monócitos THP-1 foram tratados com mAb anti-CD46 por 1h e posteriormente infectados com Mtb. Após 4h de incubação as células foram coletadas por centrifugação e a fagocitose foi avaliada pela quantificação das UFC de Mtb no lisado celular (Figura 20A) e associação de Mtb à monócitos por citometria de fluxo, a partir da fluorescência emitida por Mtb previamente marcada com Syto24 (Figura 20B-D). Os resultados demonstram que o bloqueio do sítios de ligação à C3b situados nas regiões SCR3 e SCR4 de CD46 não inibiu a fagocitose de Mtb por monócitos THP-1, pois não houve alteração nas contagens de UFC do lisado celular na condição tratada com mAb (Figura 20A) e não houve redução da associação de Mtb Syto24 à monócitos THP-1, evidenciada pela frequência de células positivas para Mtb Syto24 (Figura 20D) e MFI de Mtb Syto24 (Figura 20B-C). Assim, sugere-se que Mtb não utiliza os sítios de ligação à C3b situados nas regiões SCR3 e SCR4 de CD46 como principal via de internalização.

Figura 20 - Bloqueio de CD46 e fagocitose de *Mycobacterium tuberculosis* não opsonizada por células THP-1.

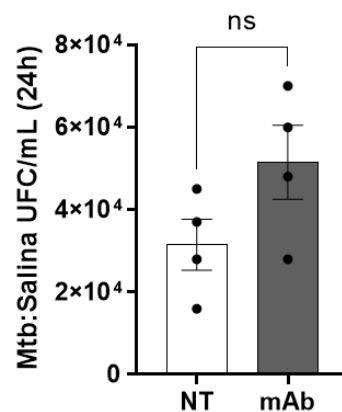


Legenda: **O bloqueio de CD46 não afeta a fagocitose de Mtb não opsonizada por células THP-1.** Mtb foi lavada com solução salina e suspensa em meio RPMI -SFB. Nos experimentos de citometria de fluxo Mtb foi marcada com o corante Syto24 previamente à exposição a solução salina. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas foram tratadas com anticorpo monoclonal (mAb) neutralizante mouse anti-CD46 humana (clone GB24) na concentração de 10 µg/mL ou meio RPMI -SFB (NT), por 1 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então infectadas com Mtb não opsonizada na MOI aproximada de 0.1 (1 bactéria/10 células) por 4 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após infecção as células foram lavadas por duas vezes com solução salina para remoção dos bacilos extracelulares. **(A)** O sedimento celular coletado após centrifugação foi lisado com Tween 0.05% e as UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. **(B-D)** As células foram fixadas com paraformaldeído 4% e a associação de Mtb a estas foi determinada por citometria de fluxo. A estratégia de *gate* utilizada para a análise da associação de Mtb marcada com Syto24 foi a mesma representada na Figura 17B. Os eventos selecionados foram analisados quanto ao MFI **(B-C)** e frequência **(D)** de Mtb Syto24. Os resultados apresentados correspondem à média ± EPM de dois experimentos independentes. Para a análise estatística empregou-se em **(A)** o teste Mann-Whitney U com  $p > 0,9999$ ; em **(C e D)** empregou-se o teste t de *Student* pareado: ns – não significante, **(C)**  $p = 0,9242$ , **(D)**  $p = 0,5844$ . NT – Não Tratado com mAb. mAb – tratado com mAb. NI – Não infectado e tratado com mAb.

O reconhecimento de Mtb não opsonizada por CD46 pode ocorrer por diversos sítios de interação em CD46 e a utilização de anticorpos bloqueadores é uma ferramenta amplamente utilizada na identificação de tais sítios. Os resultados apresentados permitem inferir que não ocorre interação direta entre Mtb e CD46 nos sítios de ligação à C3b contidos nas regiões SCR3 e SCR4 de CD46. No entanto, não é possível excluir o papel de CD46 na internalização de Mtb, uma vez que diversos outros sítios não foram bloqueados.

De forma a complementar os experimentos realizados, avaliou-se também a influência dos sítios de bloqueio do anticorpo anti-CD46 clone GB24 na viabilidade intracelular bacteriana no tempo de infecção de 24h, tendo em vista que a ativação de CD46 pela ligação direta à Mtb pode induzir modulação da resposta celular (Figura 21). A partir dos resultados, observou-se que o bloqueio dos epítomos reconhecidos por anti-CD46 clone GB24 não altera a resposta celular frente a infecção por Mtb, uma vez que não houve alteração significativa da viabilidade intracelular em 24h de infecção.

Figura 21 - Bloqueio de CD46 e crescimento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* não opsonizada em células THP-1 após 24 h de infecção.



**Legenda: O bloqueio de CD46 não afeta a sobrevivência intracelular de Mtb não opsonizada em células THP-1 após 24 h de infecção.** Mtb foi lavada com salina e suspensa em meio RPMI -SFB. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas foram tratadas com anticorpo monoclonal (mAb) neutralizante mouse anti-CD46 humana (clone GB24) na concentração de 10 ug/mL ou meio RPMI -SFB (NT), por 1 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então infectadas com Mtb não opsonizada na MOI 0.1 (1 bactéria/10 célula) por 4 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 4h, as células foram lavadas por duas vezes com solução salina, suspensas em meio RPMI completo e incubadas por adicionais 20 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então centrifugadas e o sedimento coletado foi lisado com Tween 0.05%. As UFC do lisado celular foram quantificadas em ágar Middlebrook 7H10. Os resultados apresentados correspondem à média ± EPM de dois experimentos independentes. Para a análise estatística empregou-se o teste t de *Student* pareado: ns – não significativo, p = 0,1341. NT – Não Tratado com mAb. mAb – tratado com mAb.

Os resultados apresentados sugerem que a interação direta de Mtb com os sítios de ligação à C3b contidos nas regiões SCR3 e SCR4 de CD46 não induzem sinalização celular que interfira com as repostas antimicobacterianas. Tendo em vista que o bloqueio dos sítios mencionados não alterou a fagocitose de Mtb, é plausível que tais sítios não sejam relevantes na regulação a resposta celular, uma vez que não ocorre interação de Mtb com eles.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram a relevância do sistema complemento na interação Mtb-células fagocíticas, tendo sido confirmada a promoção da ativação do sistema complemento por Mtb, que, no entanto, não resultou em lise bacteriana. Os mecanismos de evasão ao sistema complemento adotados por Mtb ainda são desconhecidos.

Observou-se também que a pré-opsonização mediada pelo complemento induziu a aderência, fagocitose e crescimento intracelular de Mtb em monócitos primários e de linhagem, demonstrando o protagonismo do sistema complemento nos estágios iniciais da interação patógeno-célula hospedeira.

Os resultados mostraram que a infecção por Mtb altera a expressão de moléculas do complemento, sendo observada a superexpressão do receptor do sistema complemento CD46 durante infecção *in vivo*. Similarmente, a infecção *in vitro* por Mtb pré-opsonizada alterou a expressão gênica e proteica de CD46, indicando possível *crossstalk* entre as vias ativadas por Mtb e as vias ativadas por opsoninas. Observou-se que a infecção por Mtb pré-opsonizada resultou em redução dos níveis proteicos de CD46 na superfície celular nos tempos de infecção de 24h e 48h, ao passo que induziu a expressão gênica de CD46 no tempo de infecção de 96h, demonstrando que a redução da expressão proteica é independente da expressão gênica.

Por fim, foi demonstrado que o bloqueio dos sítios de ligação à C3b contidos nas regiões SCR3 e SCR4 de CD46, por meio da utilização de anticorpo monoclonal neutralizante anti-CD46 (clone GB24), não alterou a fagocitose e viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada, sugerindo que os sítios estudados não possuem alta relevância nos processos de fagocitose e crescimento intracelular de Mtb pré-opsonizada. Adicionalmente, foi observado que os mesmos sítios não medeiam a fagocitose de Mtb não opsonizada, demonstrando que não ocorre ligação direta em Mtb e CD46.

Interessantemente, os resultados apresentados pelo presente trabalho em conjunto com os relatos encontrados na literatura permitem sugerir que a ativação do sistema complemento, promovida por Mtb, possui duplo papel benéfico ao estabelecimento da infecção, pois a opsonização bacteriana aumenta a fagocitose de Mtb no seu principal nicho de infecção e aumenta a viabilidade intracelular nos estágios iniciais da infecção. A partir dos resultados apresentados, diversas novas perguntas científicas foram geradas, como: por quais mecanismos Mtb é resistente à lise mediada pelo complemento? quais vias de sinalização estão relacionadas

a maior viabilidade intracelular de Mtb pré-opsonizada? por quais mecanismos Mtb promove a redução da expressão proteica de CD46? qual o papel das diferentes caudas citoplasmáticas de CD46 durante infecção por Mtb? Entre outras.

Futuras investigações se fazem necessárias no intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos na interação Mtb-sistema complemento-monócito humano.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012.
- ABDUL-AZIZ, M. et al. Complement factor H interferes with *Mycobacterium bovis* BCG entry into macrophages and modulates the pro-inflammatory cytokine response. **Immunobiology**, v. 221, n. 9, p. 944–952, 2016.
- ABREU, A. G.; BARBOSA, A. S. How *Escherichia coli* circumvent complement-mediated killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. APR, p. 1–6, 2017.
- ACHARYA, D. et al. Complement Receptor-Mediated Phagocytosis Induces Proinflammatory Cytokine Production in Murine Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. January, p. 1–15, 2020.
- ADAMS, E. M. et al. Contribution of the repeating domains of membrane cofactor protein (CD46) of the complement system to ligand binding and cofactor activity. **Journal of immunology**, v. 147, n. 23, p. 3005–3011, 1991.
- ALITALO, A. et al. Expression of complement factor H binding immunoevasion proteins in *Borrelia garinii* isolated from patients with neuroborreliosis. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 10, p. 3043–3053, 2005.
- AMBRUS, G. et al. Natural Substrates and Inhibitors of Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease-1 and -2: A Study on Recombinant Catalytic Fragments. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1374–1382, 2003.
- ANDRÉ, C.; COTA, D. Coupling nutrient sensing to metabolic homeostasis: The role of the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 502–510, 2012.
- ARBORE, G.; KEMPER, C. A novel “complement–metabolism–inflammasome axis” as a key regulator of immune cell effector function. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 7, p. 1563–1573, 2016.
- ASGARI, E. et al. C3a modulates IL-1 $\beta$  secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3473–3482, 2013.
- ASTIER, A. L. T-cell regulation by CD46 and its relevance in multiple sclerosis. **Immunology**, v. 124, n. 2, p. 149–154, 2008.
- AUTISSIER, P. et al. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 5, p. 410–419, 2010.
- BARILLA-LABARCA, M. L. et al. Role of Membrane Cofactor Protein (CD46) in Regulation of C4b and C3b Deposited on Cells. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6298–6304, 2002.



- BARNUM, S. R. C4a: An Anaphylatoxin in Name only. **Journal of Innate Immunity**, v. 7, n. 4, p. 333–339, 2015.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–55, 2009.
- BARTLOMIEJCZYK, M. A. et al. Interaction of lectin pathway of complement-activating pattern recognition molecules with Mycobacteria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 178, n. 2, p. 310–319, 2014.
- BENSA, J. C.; REBOUL, A.; COLOMB, M. G. Biosynthesis in vitro of complement subcomponents C1q, C1s and C1 inhibitor by resting and stimulated human monocytes. **Biochem.J.**, v. 216, n. 0264-6021 (Print), p. 385–392, 1983.
- BERRY, M. P. R. et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 973–977, 2010.
- BESTE, D. J. V. et al. The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.
- BILTOFT, M.; HANSEN, A. S.; HÖLLSBERG, P. **CD46 activation on monocyte-derived dendritic cells**. *Anais J Immunol. Anais...The American Association of Immunologists, Inc.*, 2017
- BLOM, A. M.; KASK, L.; DAHLBÄCK, B. CCP1-4 of the C4b-binding protein  $\alpha$ -chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 10, p. 547–556, 2003.
- BLOM, A. M.; VILLOUTREIX, B. O.; DAHLBÄCK, B. Complement inhibitor C4b-binding protein - Friend or foe in the innate immune system? **Molecular Immunology**, v. 40, n. 18, p. 1333–1346, 2004.
- BODDINGHAUS, B. et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1751–1759, 1990.
- BOHLSON, S. S. et al. Role of Complement in Mycobacterium avium Pathogenesis: In Vivo and In Vitro Analyses of the Host Response to Infection in the Absence of Complement Component C3. **Society**, v. 69, n. 12, p. 7729–7735, 2001.
- BRANDT, L. et al. Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: Some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 672–678, 2002.
- BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684–3689, 2002.
- CACCAMO, A. E. et al. Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin. **The Biochemical journal**, v. 382, n. Pt 1, p. 157–68, 2004.
- CAI, Y. et al. Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis.

**PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

CARDONE, J. et al. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 862–871, 2010.

CARDONE, J.; LE FRIEC, G.; KEMPER, C. CD46 in innate and adaptive immunity: An update. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 164, n. 3, p. 301–311, 2011.

CARROLL, M. V. et al. Multiple routes of complement activation by *Mycobacterium bovis* BCG. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 16, p. 3367–3378, 2009.

CATTANEO, R. Four Viruses, Two Bacteria, and One Receptor: Membrane Cofactor Protein (CD46) as Pathogens' Magnet. **Journal of Virology**, v. 78, n. 9, p. 4385–4388, 2004a.

CATTANEO, R. Four Viruses, Two Bacteria, and One Receptor: Membrane Cofactor Protein (CD46) as Pathogens' Magnet. **Journal of Virology**, v. 78, n. 9, p. 4385–4388, 2004b.

CDC, C. FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Core Curriculum on Tuberculosis, Chapter 2: Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis**. Atlanta: [s.n.].

CHIRCO, K. R.; POTEMPA, L. A. C-reactive protein as a mediator of complement activation and inflammatory signaling in age-related macular degeneration. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–7, 2018.

CHRISTMAS, S. E. et al. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. **Immunology**, v. 119, n. 4, p. 522–528, 2006.

COLE, S. T. ET AL. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 396, n. NOVEMBER, p. 190–198, 1998.

COLE, F. S. et al. Complement Biosynthesis by Human Bronchoalveolar Macrophages. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 27, n. 2, p. 153–159, 1983.

COUSSENS, A. et al.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunology**, v. 127, n. 4, p. 539–548, 2009.

DAGENAIS, M. et al. Sugar Coating: Utilisation of Host Serum Sialoglycoproteins by *Schistosoma mansoni* as a Potential Immune Evasion Mechanism. **Pathogens**, v. 11, n. 4, 2022.

DAVIS-III, A. E.; MEJIA, P.; LU, F. Biological Activities of C1 Inhibitor. **Mol Immunol**, v. 45, n. 16, p. 4057–4063, 2008.

DELGOBO, M. et al. An evolutionary recent IFN/IL-6/CEBP axis is linked to monocyte expansion and tuberculosis severity in humans. **eLife**, v. 8, p. 1–32, 2019.

DENG, J. et al. Inhibition of the Complement Membrane Attack Complex by *Schistosoma mansoni* Paramyosin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6402–6410, 2003.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive

immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010.

EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, C. H. The immunology of Mycobacterial Diseases. **American Review of Respiratory Disease**, v. 134, p. 1062–1071, 1986.

ELVINGTON, M. et al. Development and optimization of an ELISA to quantitate C3(H<sub>2</sub>O) as a marker of human disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, p. 1–12, 2019.

EMBER, J. A.; HUGLI, T. E. Complement factors and their receptors. **Immunopharmacology**, v. 38, n. 1–2, p. 3–15, 1997.

FERGUSON, J. S. et al. Complement Protein C3 Binding to Mycobacterium tuberculosis Is Initiated by the Classical Pathway in Human Bronchoalveolar Lavage Fluid. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2564–2573, 2004.

FERNÁNDEZ, J. A. et al. Involvement of amino acid residues 423–429 of human protein S in binding to C4b-binding protein. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 24, n. 2, p. 101–113, 1998.

FRIEC, G. LE; KEMPER, C. Complement: Coming full circle. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 6, p. 393–407, 2009.

FUJITA, T. et al. The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. November, p. 1221–1228, 1987.

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7877–7882, 2003.

GHEBREHIWET, B. et al. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular “heads” of C1q. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 6, p. 1809–1821, 1994.

GHIRAN, I. et al. Complement Receptor 1/Cd35 Is a Receptor for Mannan-Binding Lectin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, p. 1797–1808, 2000.

GICLAS, P. C. et al. Complement activity in normal rabbit bronchoalveolar fluid. Description of an inhibitor of C3 activation. **The American review of respiratory disease**, v. 135, n. 2, p. 403–11, 1987.

GIDEON, H. P.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: what the host “sees”? **Immunologic research**, v. 50, n. 2–3, p. 202–12, 2011.

GILL, D. B. et al. Down-regulation of CD46 by piliated Neisseria gonorrhoeae. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 9, p. 1313–22, 2003.

GOICOECHEA DE JORGE, E. et al. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 12, p. 4685–4690, 2013.

GRALINSKI, L. E. et al. Complement activation contributes to severe acute respiratory

syndrome coronavirus pathogenesis. **mBio**, v. 9, n. 5, p. 1–15, 2018.

GUIRADO, E.; SCHLESINGER, L. S.; KAPLAN, G. **Macrophages in tuberculosis: Friend or foe**. [s.l: s.n.]. v. 35

GUPTA, A. et al. Mycobacterium tuberculosis: Immune evasion, latency and reactivation. **Immunobiology**, v. 217, n. 3, p. 363–374, 2012.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 753–766, 2004.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 4, p. 154–163, 2010.

HAKULINEN, J. et al. Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble form. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 9, p. 2620–2629, 2004.

HANSEN, A. S. et al. Non-random pairing of CD46 isoforms with skewing towards BC2 and C2 in activated and memory/effector T cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–13, 2016.

HANSEN, A. S. et al. CD46 activation induces distinct CXCL-10 response in monocytes and monocyte-derived dendritic cells. **Cytokine**, n. June, p. 0–1, 2018.

HARRIS, C. L. et al. Decay-Accelerating Factor Must Bind Both Components of the Complement Alternative Pathway C3 Convertase to Mediate Efficient Decay. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 352–359, 2007.

HARTUNG, H. P.; HADDING, U. Synthesis of complement by macrophages and modulation of their functions through complement activation. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 6, n. 4, p. 283–326, 1983.

HE, J. Q.; WIESMANN, C.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M. A role of macrophage complement receptor crig in immune clearance and inflammation. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 16, p. 4041–4047, 2008.

HEESTERBEEK, D. A. C. et al. Complement and Bacterial Infections: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Applications. **Journal of Innate Immunity**, v. 10, n. 5–6, p. 455–464, 2018.

HEINEN, S. et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. **Blood**, v. 114, n. 12, p. 2439–2447, 2009.

HERBERT, D. et al. IgG antibodies against antigens of various mycobacterial species in children and in pre- and post-BCG young adults. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 42, n. 15, 1995.

HETLAND, G. et al. Synthesis of Complement Components C5, C6, C7, C8 and C9 in Vitro by Human Monocytes and Assembly of the Terminal Complement Complex. **Scandinavian**

**Journal of Immunology**, v. 24, n. 4, p. 421–428, 1986.

HIRANO, A. et al. Human CD46 enhances nitric oxide production in mouse macrophages in response to measles virus infection in the presence of gamma interferon: dependence on the CD46 cytoplasmic domains. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4776–4785, 1999.

HIRSCH, C. S. et al. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 2, p. 743–53, 1994.

HOLERS, V. M. Complement and Its Receptors: New Insights into Human Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 433–459, 2014.

HOLMQUIST, E. et al. Sushi domain-containing protein 4 (SUSD4) inhibits complement by disrupting the formation of the classical C3 convertase. **FASEB Journal**, v. 27, n. 6, p. 2355–2366, 2013.

HORSBURGH, C. R.; RUBIN, E. Latent tuberculosis infection in the United States. **New England Journal of Medicine**, p. 1441–1448, 2011.

HOURCADE, D.; ATKINSON, J. P. The Regulators of Complement Activation (RCA) Gene Cluster. **Advances in Immunology**, v. 45, n. C, p. 381–416, 1989.

HU, C. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Complement Receptor 3-Deficient Mice. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2596–2602, 2000.

HUANG, J.; BRUMELL, AND J. H. Bacteria-autophagy interplay: A battle for survival. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 101–114, 2014.

IRANI, V. R.; MASLOW, J. N. Induction of murine macrophage TNF- $\alpha$  synthesis by *Mycobacterium avium* is modulated through complement-dependent interaction via complement receptors 3 and 4 in relation to *M. avium* glycopeptidolipid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 2, p. 221–228, 2005.

IWATA, K. et al. Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 25, p. 15148–15152, 1995.

JAGATIA, H.; TSOLAKI, A. G. The Role of Complement System and the Immune Response to Tuberculosis Infection. **Medicina**, v. 57, n. 84, p. 18, 2021.

JENNE, D. E.; TSCHOPP, J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma : Identity to sulfated glycoprotein 2 , a constituent of rat testis fluid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. September, p. 7123–7127, 1989.

JIANG, H. et al. Complement 1 Inhibitor Is a Regulator of the Alternative Complement Pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 11, p. 1609–1616, 2001.

JIANG, T. T. et al. Serum amyloid A, protein Z, and C4b-binding protein  $\beta$  chain as new potential biomarkers for pulmonary tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–20, 2017.

- JOUBERT, P. E. et al. Autophagy Induction by the Pathogen Receptor CD46. **Cell Host and Microbe**, v. 6, n. 4, p. 354–366, 2009.
- JÓZSI, M.; ZIPFEL, P. F. Factor H family proteins and human diseases. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 8, p. 380–387, 2008.
- KÄLLSTRÖM, H. et al. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. **Molecular Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 639–647, 1997.
- KANG, P. B. et al. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 7, p. 987–999, 2005.
- KARP, C. L. et al. Mechanism of Suppression of Cell-Mediated Immunity by Measles Virus. **Science**, v. 273, n. July, p. 228–231, 1996.
- KHATUA, B. et al. Sialic acids acquired by *Pseudomonas aeruginosa* are involved in reduced complement deposition and siglec mediated host-cell recognition. **FEBS Letters**, v. 584, n. 3, p. 555–561, 2010.
- KHERA, R.; DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 5, p. 761–772, 2009.
- KILLICK, K. E. et al. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 1484–1495, 2013.
- KIM, D. D.; SONG, W. C. Membrane complement regulatory proteins. **Clinical Immunology**, v. 118, n. 2–3, p. 127–136, 2006.
- KIM, K. H. et al. Extracellular stimulation of VSIG4/complement receptor Ig suppresses intracellular bacterial infection by inducing autophagy. **Autophagy**, v. 12, n. 9, p. 1647–1659, 2016.
- KIM, W. J. et al. *Neisseria gonorrhoeae* evades autophagic killing by downregulating CD46-cyt1 and remodeling lysosomes. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 2, p. 1–18, 2019.
- KIMBERLEY, F. C.; SIVASANKAR, B.; PAUL MORGAN, B. Alternative roles for CD59. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 1–3, p. 73–81, 2007.
- KLICKSTEIN, L. B. et al. Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. **J Exp Med.**, v. 168, n. 5, p. 1699–717, 1988.
- KOHL, J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 2–3, p. 175–187, 2001.
- KOLEV, M. et al. Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reprogramming during Th1 Cell Responses. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 1033–1047, 2015.
- KOLEV, M.; FRIEC, G. LE; KEMPER, C. Complement-tapping into new sites and effector systems. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 12, p. 811–820, 2014.

KOPP, A. et al. Factor H: A complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. **Biomolecules**, v. 2, n. 1, p. 46–75, 2012.

KURITA-TANIGUCHI, M. et al. Functional Modulation of Human Macrophages Through CD46 (Measles Virus Receptor): Production of IL-12 p40 and Nitric Oxide in Association with Recruitment of Protein-Tyrosine Phosphatase SHP-1 to CD46. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 9, p. 5143–5152, 2000.

KURITA-TANIGUCHI, M. et al. Molecular assembly of CD46 with CD9, alpha3-beta1 integrin and protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human macrophages through differentiation by GM-CSF. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 9, p. 689–700, 2002.

LAPPIN, D. F. et al. Effect of interferon-gamma on complement gene expression in different cell types. **The Biochemical journal**, v. 281 ( Pt 2, p. 437–42, 1992.

LAPPIN, D. F.; WHALEY, K. Interferon-induced transcriptional and post-transcriptional modulation of factor H and C4 binding-protein synthesis in human monocytes. **The Biochemical Journal**, v. 271, n. 3, p. 767–772, 1990.

LE FRIEC, G. et al. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human Th1 immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 12, p. 1213–1221, 2012.

LEW, J. M. et al. TubercuList – 10 years after. **Tuberculosis**, v. 91, n. 1, p. 1–7, jan. 2011.

LI, K. et al. CD46 (Membrane Cofactor Protein) Acts as a Human Epithelial Cell Receptor for Internalization of Opsonized Uropathogenic Escherichia coli. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 4, p. 2543–2551, 2006.

LISZEWSKI, M. K. et al. Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37692–37701, 2000.

LISZEWSKI, M. K. et al. Emerging roles and new functions of CD46. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 27, n. 3, p. 345–358, 2005.

LISZEWSKI, M. K. et al. Intracellular Complement Activation Sustains T Cell Homeostasis and Mediates Effector Differentiation. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1143–1157, 2013.

LISZEWSKI, M. K.; POST, T. W.; ATKINSON, J. P. Membrane Cofactor Protein (MCP or CD46): Newest Member of the Regulators of Complement Activation Gene Cluster. **Annual Review of Immunology**, v. 9, n. 1, p. 431–455, 1991.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPEZ, C. M. et al. Candida albicans uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

LUBBERS, R. et al. Production of complement components by cells of the immune system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 188, n. 2, p. 183–194, 2017.

LUBLIN, D. M.; ATKINSON, J. P. Decay-accelerating Factor: Biochemistry, Molecular Biology, and Function. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 35–58, 1989.

MAILLARD, N. et al. Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 7, p. 1503–1512, 2015.

MALIK, Z. A.; DENNING, G. M.; KUSNER, D. J. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling by Mycobacterium tuberculosis is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 2, p. 287–302, 2000.

MANCHESTER, M. et al. Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2303–2307, 1995.

MANIVANNAN, S.; NARAYAN RAO, V.; RAMANATHAN, V. D. Role of complement activation and antibody in the interaction between Mycobacterium tuberculosis and human macrophages. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, n. 8, p. 542–550, 2012.

MANIVANNAN, S.; RAO, N. V.; RAMANATHAN, V. D. Role of complement activation and antibody in the interaction between Mycobacterium tuberculosis and human macrophages. **Indian journal of experimental biology**, v. 50, n. 8, p. 542–50, 2012.

MATSUSHITA, M. et al. Proteolytic Activities of Two Types of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2637–2642, 2000.

MERI, T. et al. The Yeast Candida albicans Binds Complement Regulators Factor H and FHL-1 The Yeast Candida albicans Binds Complement Regulators Factor H and FHL-1. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5185–5192, 2002.

MERLE, N. S. et al. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUN, p. 1–30, 2015.

MORGAN, B. P.; GASQUE, P. Extrahepatic complement biosynthesis: Where, when and why? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 107, n. 1, p. 1–7, 1997.

MUELLER-ORTIZ, S. L. et al. Targeted Disruption of the Gene Encoding the Murine Small Subunit of Carboxypeptidase N (CPN1) Causes Susceptibility to C5a Anaphylatoxin-Mediated Shock. **J Immunol**, v. 182, n. 10, p. 6533–6539, 2009.

MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway's Immunobiology**. 9. ed. New York: Garland Science/Taylor & Francis, 2017.

NI CHOILEAIN, S. et al. The dynamic processing of CD46 intracellular domains provides a molecular rheostat for T cell activation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

NI CHOILEAIN, S.; ASTIER, A. L. CD46 processing: A means of expression. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 169–175, 2012.

NUNES-ALVES, C. et al. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–99, 2014.



OERLEMANS, M. M. P. et al. Uptake of sialic acid by nontypeable haemophilus influenzae increases complement resistance through decreasing IgM-dependent complement activation. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 6, p. 1–11, 2019.

PANDOLFI, J. R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 251–257, 2007.

PARKASH, O. et al. A study on viability of Mycobacteria after treating them with complement system. **Acta Leprologica**, v. 8, n. 1, p. 29–33, 1992.

PEDDIREDDY, V.; DODDAM, S. N.; AHMED, N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–19, 2017.

PERSSON, B. D. et al. Structure of the extracellular portion of CD46 provides insights into its interactions with complement proteins and pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, 2010.

POLTERMANN, S. et al. Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 52, p. 37537–37544, 2007.

POST, T. W. et al. Membrane Cofactor Protein of the Complement System: Alternative Splicing of Serine/Threonine/Proline-rich Exons and Cytoplasmic Tails Produces Multiple Isoforms that Correlate with Protein Phenotype. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. July, p. 93–102, 1991.

PREISSNER, K. T.; SEIFFERT, D. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. **Thrombosis Research**, v. 89, n. 1, p. 1–21, 1998.

PURCELL, D. F. J. et al. Alternatively spliced RNAs encode several isoforms of CD46 (MCP), a regulator of complement activation. **Immunogenetics**, v. 33, n. 5–6, p. 335–344, 1991.

QUIDING-JÄRBRINK, M.; SMITH, D. A.; BANCROFT, G. J. Production of Matrix Metalloproteinases in Response to Mycobacterial Infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5661–5670, 2001.

RAM, S. et al. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 386, 1997.

RAM, S. et al. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 671–680, 1998.

RAO, S. P. et al. Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytolysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–12, 2012.

RICKLIN, D. et al. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2010.

RILEY-VARGAS, R. C. et al. CD46: Expanding beyond complement regulation. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 9, p. 496–503, 2004.

- RITCHIE, M. E. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47, 2015.
- ROSS, G. D. et al. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. **J Immunol**, v. 129, n. 5, p. 2051–2060, 1982.
- ROSS, G. D.; LAMBRIS, J. D. Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes. **J Exp Med**, v. 155, n. January, p. 96–110, 1982.
- RUSINOVA, I. et al. **INTERFEROME v2. 0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. Nucleic Acids Research. 2013 January; 41 (database issue): D1040-D1046.** Disponível em: <<http://www.interferome.org/interferome/home.jsp>>. Acesso em: 3 jul. 2022.
- RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2007.
- SAKURAI, F. et al. Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors. **Gene Therapy**, v. 14, n. 11, p. 912–919, 2007.
- SCHLESINGER, L. S. et al. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 7, p. 2771–2780, 1990.
- SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **Journal of immunology**, v. 150, n. 7, p. 2920–30, 1993.
- SCHLESINGER, L. S. Mycobacterium tuberculosis and the complement system. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 47–49, 1998.
- SCHMIDT, C. Q.; LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D. Protection of host cells by complement regulators. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 152–171, 2016.
- SCHNEIDER-SCHAULIES, J. et al. Receptor (CD46) modulation and complement-mediated lysis of uninfected cells after contact with measles virus-infected cells. **Journal of virology**, v. 70, n. 1, p. 255–63, 1996.
- SCHWARZ, M. et al. Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: Binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 100, n. 1, p. 110–118, 2008.
- SCRIBA, T. J. et al. Sequential inflammatory processes define human progression from M. tuberculosis infection to tuberculosis disease. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 11, p. 1–24, 2017.
- SEYA, T. et al. Human factor H and C4b-binding protein serve as factor I-cofactors both encompassing inactivation of C3b and C4b. **Molecular Immunology**, v. 32, n. 5, p. 355–360, 1995.
- SEYA, T.; ATKINSON, J. P. Functional properties of membrane cofactor protein of

complement. **The Biochemical journal**, v. 264, n. 2, p. 581–8, 1989.

SHWAYAT, S. N. **Investigating the Interaction of Soluble Host Proteins ( SP-D , C1q and Fibronectin ) with Mycobacteria**. [s.l.] Brunel University London, 2017.

SIM, R. B.; DISCIPIO, R. G. Purification and structural studies on the complement-system control protein beta 1H (Factor H). **Biochem J**, v. 205, n. 2, p. 285–293, 1982.

SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inhibitor. **In Immunopharmacol**, v. 7, n. 14, p. 1888–1899, 2007.

SOAMES, C. J.; SIM, R. B. Interactions between human complement components factor H, factor I and C3b. **The Biochemical journal**, v. 326 ( Pt 2, p. 553–561, 1997.

STRUNK, R. C.; EIDLEN, D. M.; MASON, R. J. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 5, p. 1419–1426, 1988.

TRAUNER, A. et al. The dormancy regulator DosR controls ribosome stability in hypoxic mycobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 28, p. 24053–24063, 2012.

TRUSCOTT, S. M. et al. CD46 engagement on human CD4+ T cells produces T regulatory type 1-like regulation of antimycobacterial T cell responses. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5295–5306, 2010.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. **Public Health Service**, v. 5th Editio, n. April, p. 1–250, 1999.

VAN INGEN, J. et al. Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 653–655, 2012.

VAN KOOTEN, C. et al. Complement production and regulation by dendritic cells: Molecular switches between tolerance and immunity. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 16, p. 4064–4072, 2008.

VEGH, Z. et al. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 9, p. 1402–1407, 2006.

WALPORT, M. J. Complement. First of Two Parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058–1066, 2001a.

WALPORT, M. J. Complement. Second of Two Parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 15, p. 1140–1144, 2001b.

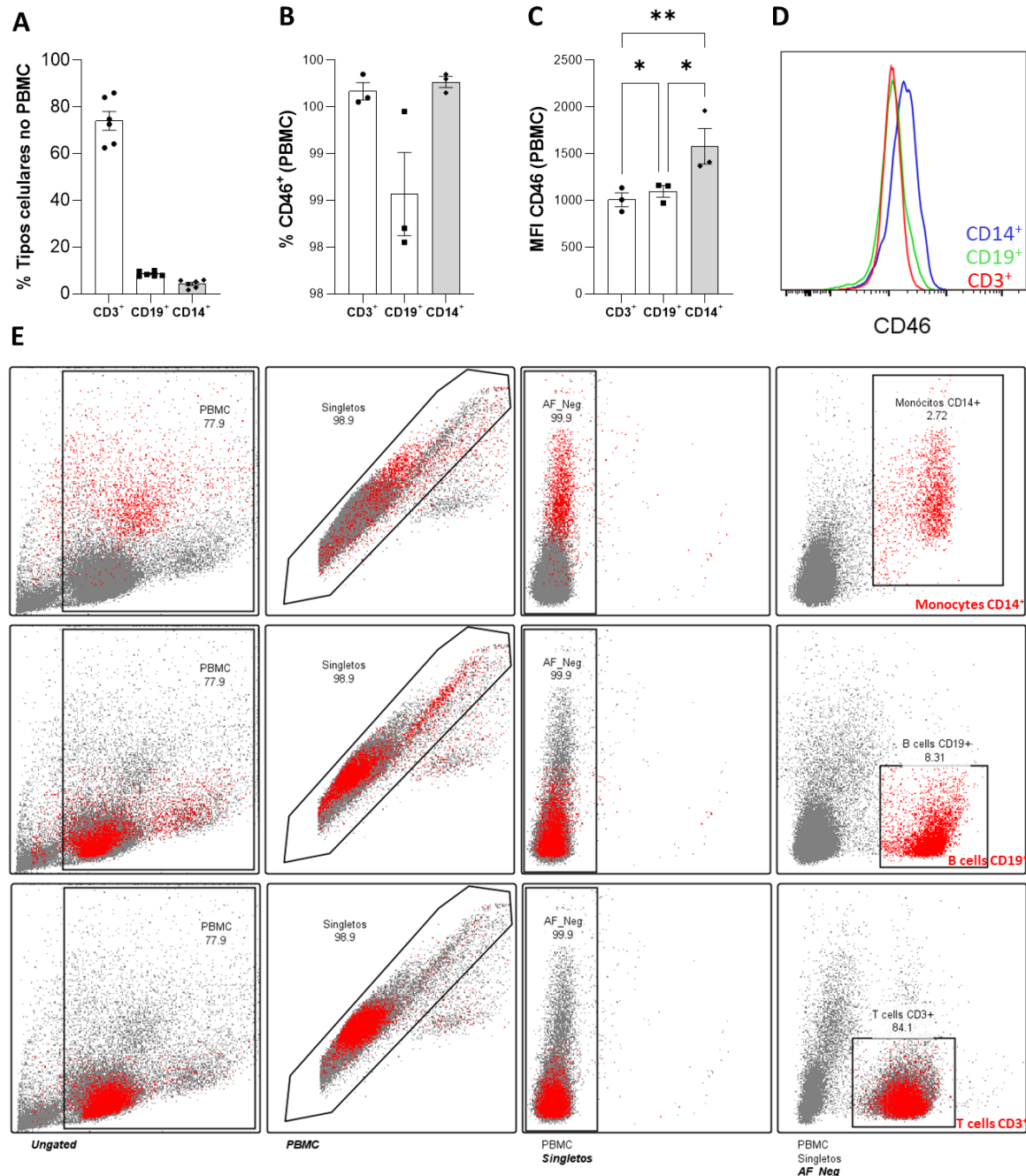
WANG, X. et al. CD46 accelerates macrophage-mediated host susceptibility to meningococcal sepsis in a murine model. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 1, p. 119–130, 2017.

WATFORD, W. T.; GHIO, A. J.; WRIGHT, J. R. Complement-mediated host defense in the lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 5, p. 790–798, 2000.

- WEBB, J. H.; BLOM, A. M.; DAHLBACK, B. Vitamin K-Dependent Protein S Localizing Complement Regulator C4b-Binding Protein to the Surface of Apoptotic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 5, p. 2580–2586, 2002.
- WELSH, K. J. et al. Complement factor C7 contributes to lung immunopathology caused by mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, n. di, 2012.
- WHALEY, K. Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 151, n. 3, p. 501–16, 1980.
- WHO, W. H. O. **Global tuberculosis report 2021**. Geneva: [s.n.].
- WIESMANN, C. et al. Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 217–220, 2006.
- YAMAMOTO, H. et al. CD46: The “multitasker” of complement proteins. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 12, p. 2808–2820, 2013.
- YANT, S.; HIRANO, A; WONG, T. C. Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. **Journal of virology**, v. 71, n. 1, p. 766–770, 1997.
- ZIMMERLI, S.; EDWARDS, S.; ERNST, J. D. Selective Receptor Blockade during Phagocytosis Does Not Alter the Survival and Growth of Mycobacterium tuberculosis in Human Macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 15, n. 6, p. 760–770, 1996.
- ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C. FHL-1/reconnectin: A human complement and immune regulator with cell- adhesive function. **Immunology Today**, v. 20, n. 3, p. 135–140, 1999.
- ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C. Complement regulators and inhibitory proteins. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 10, p. 729–740, 2009.

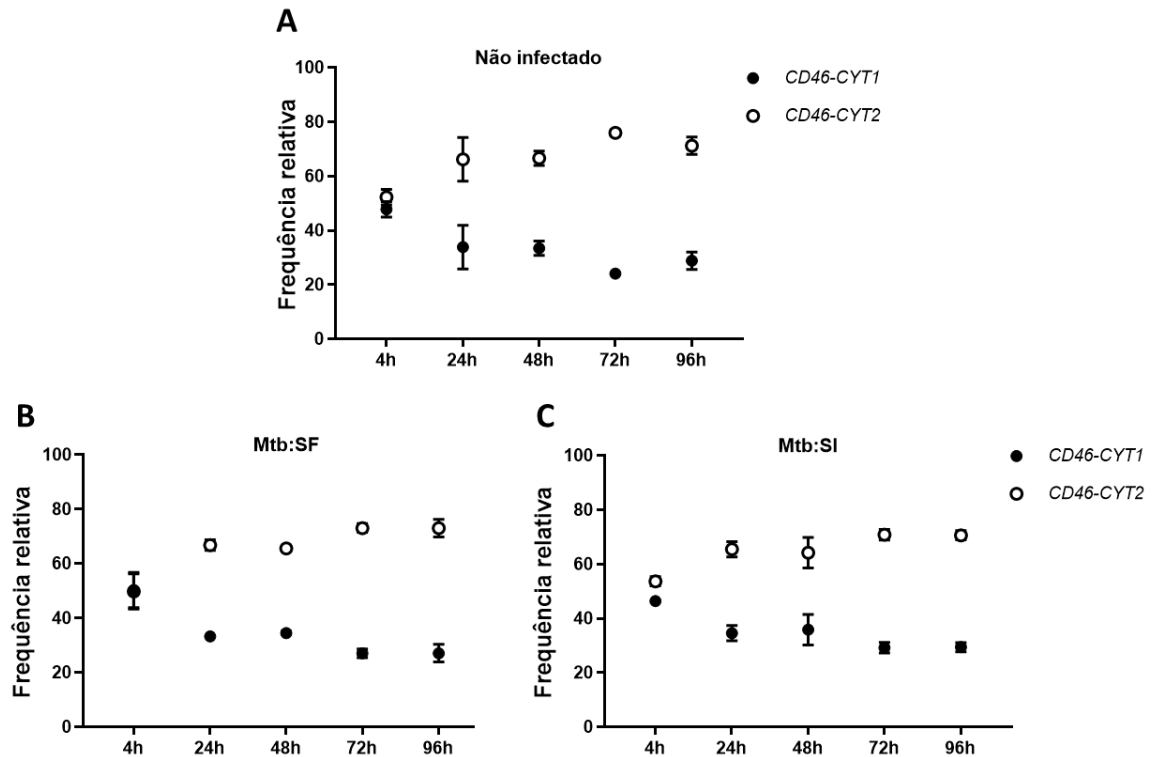
## APÊNDICE A – Figuras suplementares

Figura Suplementar 1 – Tipos celulares presentes no PBMC humano e expressão proteica de CD46 nos tipos celulares



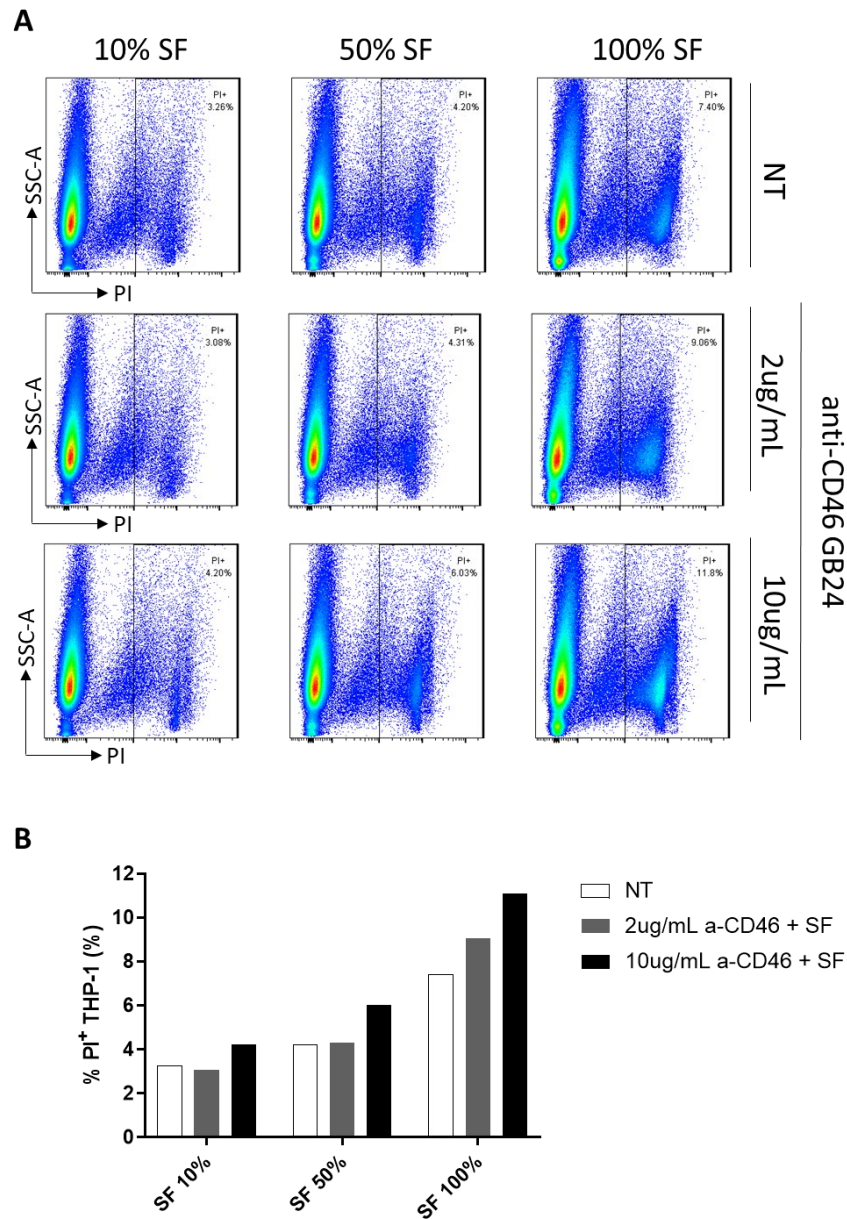
Legenda: Os níveis de expressão de CD46 são superiores em monócitos de PBMC humano quando comparado a linfócitos B e T. 99% das células do PBMC expressam CD46. Células do PBMC humano não infectadas foram marcadas com anticorpos ligados a fluoróforos e fixados com paraformaldeído a 4%. Os seguintes anticorpos conjugados a fluoróforos foram utilizados: anti-CD3-FITC (1:100), anti-CD19-PECy7 (1:200), anti-CD14-PerCPCy5.5 (1:50) e anti-CD46-APC (1:50). (A) Frequência de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos B CD19<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup>. (B) Frequência de células positivas para CD46 em linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos B CD19<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup>. (C-D) MFI de CD46 em linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos B CD19<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup>. (E) Gráficos de contorno representando a estratégia de *gate* utilizada para a análise dos diferentes tipos celulares.

Figura Suplementar 2 - Proporção da expressão gênica das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* durante infecção por *Mycobacterium tuberculosis*



Legenda: Mudanças na proporção da expressão das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* ocorrem ao longo do tempo de forma independente da infecção por *Mtb*. *Mtb* H37Rv foi incubada em SF ou SI de doadores distintos a 37°C; após 30min as bactérias foram lavadas com solução salina, centrifugadas e suspensas em meio RPMI -SFB. Células do PBMC humano de doadores distintos foram infectadas com *Mtb* pré-exposta ao soro na MOI de 1 (1 bactéria/1 célula) por 4h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram lavadas com solução salina para remoção dos bacilos não aderidos, suspensas em meio RPMI Completo e incubadas por adicionais 20h, 44h, 68h e 92h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Nos tempos de infecção determinados o mRNA foi extraído e procedeu-se com as reações de RT-qPCR. A expressão relativa das isoformas *CD46-CYT1* e *CD46-CYT2* foi calculada de acordo com o método  $2^{-\Delta C_t}$  utilizando o gene 18S como gene de referência. Os valores de expressão das diferentes isoformas foram somados e a proporção de cada isoforma em relação ao total foi calculada. Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  EPM de PBMC de três doadores distintos em um experimento. SF – Soro Fresco. SI – Soro Inativado.

Figura Suplementar 3 – Testagem do anticorpo anti-CD46 clone GB24.



Legenda: O anticorpo anti-CD46 clone GB24 inibe a função regulatória de CD46, aumentando a lise mediada pelo sistema complemento. Células da linhagem THP-1 não diferenciadas foram tratadas com anticorpo monoclonal (mAb) neutralizante mouse anti-CD46 humana (clone GB24) na concentração de 2 ug/mL ou 10 ug/mL ou meio RPMI -SFB (NT), por 1h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então tratadas com SF em diferentes concentrações e a morte celular foi mensurada por citometria de fluxo, por meio do percentual de células positivas para iodeto de propídio (PI), o qual marca seletivamente as células mortas. (A) Gráficos de contorno representando a frequência de células positivas para PI. (B) Frequência de células positivas para PI. Os resultados apresentados correspondem um experimento. NT – Não Tratado com mAb.