



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

WEBSTER LEONARDO GUIMARÃES DA COSTA

**ESTUDO DO PAPEL DE T-BET EM MACRÓFAGOS
NO MODELO DE SEPSE**

CAMPINAS

2023

WEBSTER LEONARDO GUIMARÃES DA COSTA

**ESTUDO DO PAPEL DE T-BET EM MACRÓFAGOS
NO MODELO DE SEPSE**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular, na Área
de Imunologia.*

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
WEBSTER LEONARDO GUIMARÃES DA COSTA
E ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR
PEDRO MANOEL MENDES DE MORAES VIEIRA.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823e Costa, Webster Leonardo Guimarães da, 1999-
Estudo do papel de T-bet em macrófagos no modelo de sepse / Webster
Leonardo Guimarães da Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Gene TBX21. 2. Células mieloides. 3. Macrófagos. 4. Resposta imune -
Regulação. 5. Immunometabolismo. I. Vieira, Pedro Manoel Mendes de Moraes,
1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Study on the role of T-bet in macrophages in the sepsis model

Palavras-chave em inglês:

TBX21 Gene

Myeloid cells

Macrophages

Immune response - Regulation

Immunometabolism

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira [Orientador]

Karina Ramalho Bortoluci

Rafael Elias Marques Pereira Silva

Data de defesa: 23-02-2023

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4289-4295>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0956287697150076>

Campinas, 23 de fevereiro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Karina Ramalho Bortoluci

Prof. Dr. Rafael Elias Marques Pereira Silva

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que, de forma gratuita e incondicional, me ajudaram a manter os outros pilares da minha vida, como emocional e financeiro, sólidos, de modo que eu pudesse focar nos meus estudos e projetos profissionais. Em meio a tantos devaneios na educação, ciência e tecnologia, tanta depreciação e sucateamento por parte dos governantes, pude contar com inúmeros seres humanos excepcionais ao longo da escrita da minha história e desta dissertação. Destaco aqui minhas famílias, biológica e adotiva, e, também, aqueles que me acolheram em seus núcleos familiares, me fornecendo amor, cuidado e respeito por quem sou, em especial Adivania Moreira e o povo de Arenópolis-GO, cuja hospitalidade me subsidiou estágio para carreira e para a vida. Sem vocês, essa defesa de mestrado não seria factível. Adicionalmente, dedico minha dissertação ao governo LULA, que, com menos de 2 meses de mandato em 2023, deu ouvidos aos pós-graduandos brasileiros responsáveis por cerca de 95% da ciência brasileira, representados pela ANPG, que lutaram para que houvesse um reajuste nas bolsas de estudo, após 10 anos de negligência e descaso. Recebi minha última bolsa do mestrado já reajustada, assim como a primeira do doutorado. Com isso terei mais esperança para poder me dedicar ao meu doutoramento, com representantes políticos que se preocupam com a formação de novos talentos capazes de ajudar a sociedade com descobertas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de externar agradecimentos, primeiramente, ao meu orientador Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira, por ter aceitado ser meu supervisor de mestrado antes mesmo de eu ter finalizado minha graduação em biomedicina na UFG. Mestrado este que serviu como minha iniciação científica na área de imunologia e metabolismo, as duas áreas que escolhi seguir para a vida, após uma graduação em tempos de pandemia, em Goiás, com *expertises* discrepantes das quais trabalho hoje, focadas mais em saúde pública e parasitologia. Durante o mestrado aprendi o que é ciência e a performar diversas técnicas, por isso, agradeço a todos colegas do Laboratório de Imunometabolismo que me ensinaram teoria e prática, e aos que me acompanharam em todas as técnicas de bancada necessárias para execução desse projeto. Agradeço ao Instituto de Biologia e ao Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia da Unicamp pela infraestrutura de ponta para realização dos experimentos. Agradeço à Pós-Graduação em Imunologia da USP pelas disciplinas como aluno especial, que me acrescentaram muito. E, por último, agradeço as agências de fomento de pesquisa que subsidiam o meu laboratório, como a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“Mesmo que você se torne um astronauta e descubra galáxias desconhecidas, isso não seria tão maravilhoso quanto descobrir o seu próprio ‘Eu’ aqui mesmo, na Terra.”

Mooji, 2ª Ed. de White Fire.

RESUMO

T-bet(Tbx21) foi identificado em linfócitos T auxiliares como responsável pela transativação do gene de Interferon gamma(IFN γ) e polarização Th1. T-bet também induz expressão de IFN γ em outras células linfoides como células NK, ILC1 e T citotóxicas. Em linfócitos B, T-bet auxilia na troca de isotipo para IgG2a. T-bet tem sido descrito com um papel altamente inflamatório sistemicamente. No entanto, foi descrito que T-bet é um repressor da transcrição do gene de TNF α em células dendríticas, sugerindo um papel regulador. A literatura é rica em estudos que descrevem a função de T-bet nas células linfoides, entretanto, carece de estudos que avaliem especificamente o papel de T-bet na linhagem mieloide, como em macrófagos. Nosso objetivo foi estudar o papel de T-bet em macrófagos. Primeiramente, avaliamos a cinética do mRNA de Tbx21 em BMDMs e observamos que o LPS sozinho não é capaz de modular sua expressão gênica. No entanto, o tratamento com IFN γ induziu a expressão de Tbx21 com pico após 3h de estímulo. O estímulo conjunto de LPS+IFN γ potencializou a expressão de Tbx21 induzida por IFN γ . A polarização de macrófagos com IL-4 não modulou a expressão de Tbx21. Assim, a expressão e função de Tbx21 em macrófagos está relacionada com a polarização do perfil pró-inflamatório e não do perfil alternativo. Análise de Western Blotting revelou que macrófagos M0 expressam T-bet constitutivamente, o que aumenta com estímulo de LPS+IFN γ até 12h e decai após 24h de estímulo. Utilizando de BMDM de animais C57BL/6JTbx21^{ff}LyzM^{cre}(Tbx21^{-/-} na linhagem mieloide), observamos que macrófagos Tbx21^{-/-} tiveram maior expressão gênica e secreção de IL-12 e TNF α , independente da ativação de NF- κ B. Demonstramos que T-bet se liga no promotor de Il12 e Tnf α , sugerindo mecanismo de regulação negativa desses genes. Além disso, a deleção de Tbx21 aumentou a expressão de Nos2 e a subsequente produção de NO, com diminuição da expressão de Arg1 em BMDMs. Observamos que T-bet não se liga no promotor de Nos2. Entretanto, como os níveis de NO estavam aumentados nos macrófagos Tbx21^{-/-}, buscamos avaliar se T-bet modularia o metabolismo celular. Macrófagos Tbx21^{-/-} estimulados com LPS+IFN γ expressaram mais Slc2a1(GLUT1), Hk2(Hexocinase 2) e Ldh(Lactato Desidrogenase), bem como secretaram maiores níveis de lactato do que BMDMs Tbx21^{+/+}. Observamos também que a Taxa de Acidificação Extracelular(ECAR) está aumentada em macrófagos inflamatórios Tbx21^{-/-}, bem como acidificação não relacionada à glicólise, que pode indicar níveis aumentados de ROS. Confirmamos que macrófagos Tbx21^{-/-} apresentam maiores níveis de H₂O₂ do que os Tbx21^{+/+} e apresentam atividade microbicida aumentada, independente de Nox2. Em conjunto, nossos dados indicam que T-bet é importante para manter o tônus inflamatório dos macrófagos regulado. Animais Tbx21^{ff}LyzM^{cre} apresentam uma capacidade bactericida (fígado/baço) mais efetiva do que Tbx21^{ff} ao serem infectados com *E. coli* IP, acompanhado de maiores níveis séricos de IL-1 β , marcador de agravamento séptico. Juntos, nossos dados indicam que a deleção de Tbx21 na linhagem mieloide leva a quadros exacerbados de inflamação em camundongos, o que sugere que o T-bet regula o tônus inflamatório de macrófagos em termos de citocinas, metabolismo e função efetora.

Palavras-chave: Gene TBX21; Células mieloides; Macrófagos; Resposta imune – Regulação; Imunometabolismo.

ABSTRACT

T-bet(Tbx21) was identified in T helper lymphocytes as responsible for the transactivation of the Interferon gamma gene (IFN γ) and Th1 polarization. T-bet also induces IFN γ expression in other lymphoid cells such as NK, ILC1 and cytotoxic T lymphocytes. In B lymphocytes, T-bet assists in isotype switching to IgG2a. T-bet has been described having a highly inflammatory role systemically. However, it has been reported that T-bet is a transcriptional repressor of the Tnfa gene in dendritic cells, suggesting a regulatory role. The literature is rich in studies that describe the role of T-bet in lymphoid cells, however, there is a lack of studies that specifically assess the role of T-bet in the myeloid lineage, such as in macrophages. Our aim was to study the role of T-bet in macrophages. First, we evaluated the kinetics of Tbx21 mRNA in BMDMs and observed that LPS alone is not able to upregulate its gene expression. However, IFN γ treatment upregulated Tbx21 expression with a peak after 3h of stimulation. The joint stimulus of LPS+IFN γ potentiated the expression of Tbx21 induced by IFN γ . Polarization of macrophages with IL-4 did not modulate Tbx21 expression. Thus, the expression and function of Tbx21 in macrophages is related to the polarization to the pro-inflammatory and not to the alternative profile. Western Blotting analysis revealed that M0 macrophages constitutively express T-bet, which increases with LPS+IFN γ stimulation up to 12h and decreases after 24h of stimulation. Using BMDM from C57BL/6JTbx21^{ff}LyzM^{cre} animals (Tbx21^{-/-} in the myeloid lineage), we observed that Tbx21^{-/-} macrophages had higher gene expression and secretion of IL-12 and TNF α , regardless of NF- κ B activation. We demonstrated that T-bet binds to the IL12 and Tnfa promoter, suggesting a negative regulation mechanism for these genes. Furthermore, deletion of Tbx21 increased Nos2 expression and subsequent NO production, with decreased Arg1 expression in BMDMs. We observed that T-bet does not bind to the Nos2 promoter. However, as NO levels were increased in Tbx21^{-/-} macrophages, we sought to assess whether T-bet would modulate cell metabolism. Tbx21^{-/-} macrophages stimulated with LPS+IFN γ expressed more Slc2a1(GLUT1), Hk2(Hexokinase 2) and Ldh(Lactate Dehydrogenase), as well as secreted higher levels of lactate than Tbx21^{+/+} BMDMs. We also observed that the Extracellular Acidification Rate (ECAR) is increased in Tbx21^{-/-} inflammatory macrophages, as well as non-glycolytic acidification, which indicate increased levels of ROS. We confirmed that Tbx21^{-/-} macrophages have higher levels of H₂O₂ than Tbx21^{+/+} and have increased microbicidal activity, independent of Nox2. Taken together, our data indicate that T-bet is important for maintaining regulated macrophage inflammatory tone. Tbx21^{ff}LyzM^{cre} animals have a more effective bactericidal capacity (liver/spleen) than Tbx21^{ff} when infected with E. coli IP, accompanied by higher serum levels of IL-1 β , a marker of septic worsening. Together, our data indicate that deletion of Tbx21 in the myeloid lineage leads to exacerbated inflammation in mice, which suggests that T-bet regulates the inflammatory tonus of macrophages in terms of cytokines, metabolism, and effector function.

Keywords: TBX21 Gene; Myeloid cells; Macrophages; Immune response – Regulation; Immunometabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Ontogenia e espectro de macrófagos.....	18
Figura 2. Metabolismo de macrófagos inflamatórios.....	22
Figura 3. Metabolismo de macrófagos ativados alternativamente.....	24
Figura 4. Função de T-bet nas células imunes.....	26

RESULTADOS

Figura 1. Cinética de mRNA e proteína de Tbx21/T-bet em macrófagos.....	39
Figura 2. T-bet regula negativamente a expressão de IL-12 e TNF α de Macrófagos inflamatórios.....	40
Figura 3. Macrófagos inflamatórios deficientes em T-bet favorecem ainda mais o metabolismo de L-arginina para iNOS e produção de NO.....	42
Figura 4. O metabolismo glicolítico de macrófagos é intensificado com a deleção de Tbx21.....	43
Figura 5. Macrófagos deficientes em T-bet possuem uma capacidade microbicida aumentada <i>in vitro</i> , independente de Nox2.....	44
Figura 6. Camundongos deficientes em T-bet possuem uma capacidade microbicida aumentada e maiores níveis de IL-1 β séricos.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers para qPCR	32
Tabela 2. Pannel de citometria para caracterização de infiltrado inflamatório peritoneal.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius	ILC – célula linfoide inata
µL – microlitros	IM – intramuscular
18S – subunidade 18S do ribossomo	iNOS – sintase de NO induzível
ACLY – ATP citrato liase	IP – intraperitoneal
ACO2 – Aconitase 2	IRF – fator regulador de IFN
ACOD1 – Aconitato descarboxilase 1	IRG1 – gene imunorresponsivo 1
Arg – arginase	kDa – quilo Daltons
ATM – macrófago do tecido adiposo	KO – nocaute (deleção gênica)
ATP – adenosina tri-fosfato	LDH – lactato desidrogenase
BMDM – macrófago derivado de medula óssea	LPM – grandes macrófagos peritoneais
CD – grupamento de diferenciação	LPS – pequenos macrófagos peritoneais
cGAS – GMP-AMP cíclico	Lyz – lisozima
CoA – coenzima A	M1 – macrófago ativado classicamente (LPS+IFN γ)
CTL – linfócito T citotóxico	M2 – macrófago ativado alternativamente (IL-4)
CTLA4 – antígeno 4 do CTL	mg – miligramas
CYBB – citocromo B beta	MHC – complexo principal de histocompatibilidade
DAMP – padrão molecular associado à patogeno	mL - mililitros
DC – célula dendrítica	mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
DNA – ácido desoxirribonucleico	mtROS – espécie reativa de oxigênio mitocondrial
ECSIT – intermediário de sinalização evolutivamente conservado nas vias Toll	NAD ⁺ – Dinucleotídeo adenina nicotinamida oxidado
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	NADH NAD reduzido
Gata3 – proteína ligante de GATA	NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
H ₂ O – água	
H ₂ O ₂ – peróxido de hidrogênio	
IFN – interferon	
IL – interleucina	

NED – N-(l-naftil)etilenodiamina
NF- κ B – fator nuclear kapa B
ng - nanogramas
NK – assassina natural (célula)
NKT – assassina natural T (célula)
NLR – receptor do tipo NOD
NO – óxido nítrico
NOX2 – NADPH oxidase 2
OAT – ornitina aminotransferase
ODC – ornitina descarboxilase
OXPHOS – fosforilação oxidativa
PAMP – padrão molecular associado à patógeno
PBS – tampão fosfato-salino
PCR – reação em cadeia da polimerase
PHD – prolil-hidroxilase
PPAR γ – receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PPP – via das pentoses fosfato
PRR – receptor de reconhecimento de padrão
RET – transporte reverso de elétrons
Retn1a – resistina tipo alfa
RLR – receptor do tipo RIG
ROR γ T – Receptor nuclear órfão relacionado ao RAR gama T
ROS – espécie reativa de oxigênio
RPM – rotações por minuto
RT-qPCR – PCR quantitativa pós transcrição reversa
SDH – succinato desidrogenase

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SPM – pequenos macrófagos do peritônio
STAT – transdutor de sinal e ativador da transcrição
STING – estimulador de genes de interferon
T-bet – T-Box Expressa em células T
TBS-T – solução salina tamponada com Tris com detergente Tween20
TCA – ciclo do ácido tri-carboxílico
TGF- β – fator de crescimento transformador beta
Th – T auxiliar (linfócito)
TLR – receptor do tipo Toll
TNF α – fator de necrose tumoral alfa
TRAF – fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TRIF – Interferon- β indutor de adaptador contendo domínio TIR
TRUC – modelo de colite ulcerativa com KO de T-bet e Rag2
xG – força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. MACRÓFAGOS	17
1.1.1. Macrófagos M1	20
1.1.2. Macrófagos M2	23
1.2. O FATOR DE TRANSCRIÇÃO T-BET	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. HIPÓTESES	28
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo geral	28
4.2. Objetivos específicos	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1. Animais	29
5.2. Cultura primária de macrófagos e estímulos	30
5.3. Extração de RNA e síntese de cDNA	30
5.4. Imunoprecipitação da Cromatina	31
5.5. qPCR	31
5.6. ELISA	32
5.7. Mensuração de H ₂ O ₂	32
5.8. Mensuração de NO	33
5.9. Citometria de Fluxo (FACS)	33
5.10. <i>Western Blotting</i>	34
5.11. Ensaio metabólico com fluxo extracelular	35
5.12. Ensaio de capacidade efetora dos macrófagos	35
5.13. Modelo <i>in vivo</i> de peritonite séptica	36
5.14. Análise dos resultados	37
6. RESULTADOS	38
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

A imunologia é um campo de estudo relativamente novo comparado às outras ciências, já que seu advento se deu em 1796 com o médico franco-inglês Edward Jenner, cujos experimentos demonstraram que há um processo de melhora na resposta do corpo frente a infecção por um microrganismo quando exposto ao agente previamente (SMITH, 2011). Ele inoculou pústula de varíola bovina coletada de mulheres ordenhadoras em James Phipps, uma criança de 8 anos, a qual teve uma clínica branda e se recuperou. Posteriormente, quando desafiado com o vírus da varíola humana, a criança não desenvolveu a doença, fenômeno este que foi chamado de imunização (RIEDEL, 2005).

A palavra imunidade advém do termo grego “*immunitas*”, conceituado como a proteção e os privilégios legais que os senadores romanos detinham ao longo do mandato (JANEWAY et al., 2020). Ao longo de muitos anos, foi atribuída ao sistema imune a função de proteção do organismo contra microrganismos como bactérias, vírus e parasitos. No entanto, hoje fica cada mais claro que o sistema imune não atua apenas como responsável pela proteção contra microrganismos, mas também é essencial para a manutenção da homeostase nos mais diferentes tecidos do corpo (OKUMURA; TAKEDA, 2016).

Os conceitos de infecção e inflamação diferem entre si. A infecção pode ser definida como o processo em que um agente patogênico transpassa as barreiras físicas, como a pele e mucosas, ganhando sítio de colonização para se proliferar. Por outro lado, a inflamação compreende a ativação de células imunes que resulta na migração de leucócitos para um sítio específico, processo este capaz de ocasionar dor, febre, vermelhidão, inchaços e perda de função dos tecidos ou órgãos (JANEWAY et al., 2020).

O sistema imune é didaticamente dividido em inato e adaptativo (HOEBE, 2004). A imunidade inata conta com células, proteínas e barreiras físico-químicas que já se encontram prontas para responder contra infecções e lesões teciduais. São células da imunidade inata os neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, mastócitos, células dendríticas, células assassinas naturais (NK), células linfóides inatas (ILCs) e macrófagos (BEUTLER, 2004).

Já a imunidade adaptativa é composta pelos linfócitos, que são capazes de identificar e lidar com as infecções de uma maneira altamente específica. Os linfócitos possuem duas populações principais, são elas os linfócitos T e os linfócitos B.

Enquanto as células T podem ser auxiliares (CD4+) ou citotóxicas (CD8+) (e até do tipo NKT – T assassinas naturais), as células B são responsáveis pela produção e secreção de anticorpos, também chamadas de imunoglobulinas (Ig), e apresentação de antígenos (BENDELAC et al., 2007; BONILLA; OETTGEN, 2010).

As células T CD4 necessitam de que células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B internalizem, processem e exponham peptídeos derivados de micróbios conjugados à molécula de MHC-II (JANEWAY et al, 2020). E em conjunto com coestimuladores, principalmente, da família B7 e das citocinas presentes no meio, os linfócitos T auxiliares polarizam para os perfis Th1, sob efeito da IL-12, os quais expressam T-bet; Th2, sob efeito de IL-4, os quais expressam Gata3; Th17, sob efeito de IL-6 e TGF- β , expressam ROR γ T; e as células T reguladoras (Treg), sob efeito de TGF β , expressam FoxP3 (GEGINAT, 2014).

Dentre os diversos espectros dos linfócitos T CD4, as células Th1 produzem IFN γ e são críticas para potencializar a defesa contra vírus e microrganismos fagocitados (LA GRUTA et al., 2018). Já as células Th2 produzem IL-4/5/13 e participam de manifestações alérgicas e na defesa anti-helmíntica. As células Th17 produzem IL-17/22/23 e participam da defesa antibacteriana e antifúngica. Já as Tregs produzem TGF- β , IL-10, IL-35 e expressam CTLA-4 (antagonista competitivo de B7), regulando negativamente a resposta inflamatória (ABBAS et al., 2021).

Quando se trata das células T CD8 (CTLs), são restritas ao reconhecimento de peptídeos apresentados na fenda do MHC-I, o qual é expresso por todas as células nucleadas (LA GRUTA et al., 2018). Todas as células nucleadas são passíveis de mutações genéticas e infecções citoplasmáticas, que culminam na apresentação de neoantígenos tumorais e antígenos virais que indicam necessidade de eliminação. É de responsabilidade das CTLs identificar essas células, e induzi-las à apoptose com a liberação de perforinas e granzimas ou por FAS/FAS-Ligante (TAKEUCHI; SAITO, 2017).

Embora o sistema imune seja uma complexidade de células, os macrófagos são as células objeto de estudo do presente trabalho por estarem relacionados com diversas desordens inflamatórias e presentes nos mais diversos tecidos, desempenhando papéis específicos (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). A modulação de seus fenótipos altera consideravelmente o desenvolvimento do

processo inflamatório em vários modelos de doenças (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

1.1. MACRÓFAGOS

Por meio de observações microscópicas que levaram ao Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1908, o zoologista russo Élie Metchnikoff foi quem descreveu pela primeira vez, em 1883, células móveis respondendo a injúrias, induzidas com uso de um espinho, em uma larva de estrela do mar (METCHNIKOFF, 1883). Posteriormente, essas células foram identificadas como macrófagos (do inglês *big eaters* – grandes comilões). Neste sentido, os macrófagos são células imunes altamente especializadas no processo de fagia, denominado fagocitose, seja de células e debris ou micróbios, sendo, portanto, considerados fagócitos profissionais (GORDON, 2007).

Os macrófagos podem ser derivados do saco vitelínico e do fígado fetal, originando os macrófagos residentes de longa vida, que colonizam tecidos e se auto renovam até a vida adulta (células de Kupfer – fígado; células de Langerhans – pele; macrófagos alveolares – pulmões; macrófagos peritoneais -peritônio; osteoclastos – ossos; micróglia - sistema nervoso; macrófagos cardíacos e do tecido adiposo, dentre outros), ou podem ser derivados a partir do estímulo de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF) sobre células mieloides pluripotentes da medula óssea em pró-monócitos, os quais se tornam monócitos circulantes e, posteriormente, se diferenciam em macrófagos nos tecidos (**Figura 1**) (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

Os macrófagos estão presentes nos mais distintos tecidos e são altamente plásticos e versáteis ao ponto de se especializarem em funções não-canônicas inerentes ao microambiente, diferentes daquela canônica de serem apenas sentinelas contra microrganismos estranhos (THERET; MOUNIER; ROSSI, 2019). Os macrófagos do fígado e baço, por exemplo, participam promovendo a limpeza de hemácias envelhecidas e reciclando ferro (DE BACK et al., 2014). Já a micróglia está relacionada com processos de neurogênese e limpeza de neurônios defeituosos (SATO et al., 2015). Macrófagos cardíacos são importantes participantes nos estímulos elétricos que resultam no ritmo cardíaco (MOSKALIK; NIDERLA-BIELINSKA; RATAJSKA, 2022). Os ATM contribuem para a regulação da termogênese e controle endócrino (CATRYSSSE; VAN LOO, 2018).

Quanto aos macrófagos peritoneais, foram descritas por Ghosn e colaboradores (2009) duas subpopulações que diferem entre si em termos de desenvolvimento e função, sendo a população de grandes macrófagos do peritônio (LPM) e a de pequenos macrófagos do peritônio (SPM). Os LPM expressam altos níveis de CD11b e F4/80, e representam grande maioria da população celular de peritônio em indivíduos saudáveis, sem infecção ou inflamação peritoneal, desaparecendo sob estímulo inflamatório. Já os SPM são infiltrantes, expressam baixos níveis de CD11b e F4/80, porém altos níveis de MHCII e aumentam a frequência com inflamação peritoneal.

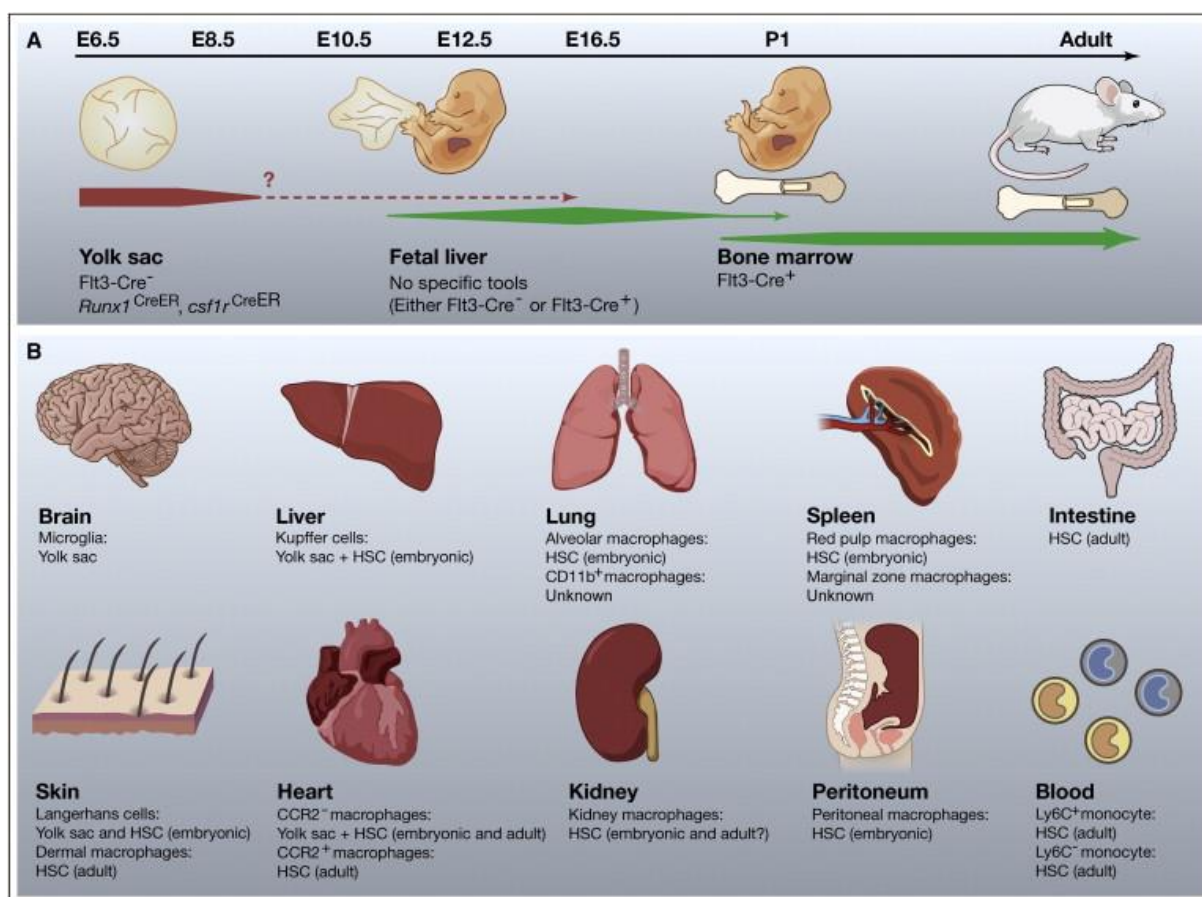


Figura 1. Ontogenia e espectro de macrófagos. Os macrófagos teciduais são primeiramente produzidos no saco vitelínico e, posteriormente, no fígado fetal. Com o desenvolvimento para a vida adulta, a ontogenia de macrófagos se dá na medula óssea, com produção de monócitos que podem se tornar macrófagos infiltrantes mediante processo inflamatório. Os macrófagos residentes sentinelas estão presentes nos mais diferentes tecidos, no cérebro temos a micróglia, no fígado células de Kupffer, nos pulmões os macrófagos alveolares, no baço os macrófagos esplênicos da polpa vermelha e da zona marginal. Na pele temos células de Langerhans, no coração os macrófagos cardíacos, no peritônio os macrófagos peritoneais e no sangue estão presentes monócitos Ly6C⁺, marcador de macrófagos infiltrantes.

Fonte: Figure 1. Macrophage Lineages, Ontogeny, and Contribution to Populations of Resident Tissue Macrophages de Epelman et al. (2014).

Os macrófagos são componentes da imunidade inata contra microrganismos passíveis de serem fagocitados, como bactérias e fungos, e atuam também no remodelamento tecidual (WU; LU, 2019). Macrófagos contam com receptores de Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) e a Dano (DAMPs). Os receptores de padrões moleculares (PRRs) podem estar presentes na face externa da membrana plasmática, na membrana do fagolisossomo ou até mesmo no citosol. A localidade do receptor ativado dita a resposta que o macrófago promoverá (TAYLOR, 2005; PLÜDDEMANN; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2011).

Dentre os PRRs de membrana plasmática destacam-se os receptores do tipo Toll (TLRs), os quais reconhecem, dentre outras moléculas, componentes da parede e da membrana bacteriana, como é o caso do TLR4 que é ativado pelo lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana externa de bactérias Gram negativas, e amplamente utilizado no presente trabalho (BEUTLER, 2000).

Além dos TLR, há os receptores de Lectina tipo C (CLEC) que reconhecem β -glucano derivado de fungos e manose, os receptores *Scavenger* que reconhecem lipoproteínas e ácido lipoteicoico, e os receptores de resíduos N-formil-metionil presentes em bactérias e proteínas derivadas da mitocôndria (THEBAULT, 2009). Quando se trata dos PRRs presentes nos endossomos, destacam-se os TLR que reconhecem material genético derivado de microrganismos fagocitados, como RNA e DNA de fita simples ou dupla (KRIEG; VOLLMER, 2007).

A ativação dos TLRs deflagra, dentre outras vias, a via de MyD88, a qual induz a ativação do Fator Nuclear (NF)- κ B responsável pela transcrição de quimiocinas que atraem outros leucócitos, e citocinas pró-inflamatórias, tais como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) α , Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-12 e IL-18. Essas citocinas podem agir de forma autócrina, parácrina e endócrina, promovendo vasodilatação, febre, síntese de mediadores agudos da inflamação no fígado e ativação de células imunes inatas e adaptativas (SERASANAMBATI; CHILAKAPATI, 2016). Além disso, a via de TRIF ativa IRF3/7/9, promovendo um estado anti-viral autócrino e parácrino, com produção de Interferon (IFN)-1 (sendo os α / β) (CHO; KELSALL, 2014).

Quanto aos PRRs localizados no citosol, temos os receptores do tipo RIG (RLR) que reconhecem RNA (REHWINKEL; GACK, 2020), e do tipo NOD (NLR) que reconhecem diversos PAMPs e DAMPs (KIM; SHIN; NAHM, 2016), além do complexo PRR sensor de DNA citosólico cGAS-STING (MA; DAMANIA, 2016). Os NLR têm ganhado destaque na última década devido o descobrimento do inflamassoma de

NLRP3 que, dentre outras funções, quando ativado cliva pró-caspase em caspase ativa, a qual cliva as citocinas imaturas pró-IL-1 β e pró-IL-18 em IL-1 β e IL-18 maduras e funcionais (PLATNICH; MURUVE, 2019).

O inflamassoma também é responsável pela clivagem da Gasdermina-D, a qual se oligomeriza na membrana celular formando poros para que a IL-1 β e a IL-18 possam ser secretadas, o que é descrito por ocorrer de forma dependente de mTORC1. Trata-se de um mecanismo altamente regulado, denominado piroptose, com intuito de sinalização celular através dessas potentes citocinas pró-inflamatórias (EVAVOLD et al, 2021).

A fim de atender às necessidades celulares de sobrevivência, desenvolvimento e proliferação ou para desempenhar suas funções efetoras como produção de citocinas, fagocitose, eliminar microrganismos no fagolisossomo ou eferocitose de células apoptóticas, os macrófagos reprogramam seu metabolismo e alteram seus fenótipos (PEARCE et al., 2013; O'NEILL; PEARCE, 2016).

Serão aqui destacados a função e o metabolismo de macrófagos clássicos inflamatórios (M1) e de macrófagos alternativos de reparo/resolução (M2), assim classificados didaticamente, embora a nomenclatura esteja obtusa, pois os macrófagos podem adotar fenótipos mistos a depender do microambiente (ARTYOMOV; SERGUSHICHEV; SCHILLING, 2016).

1.1.1. Macrófagos M1

Os macrófagos classicamente ativados (LPS+IFN γ), conhecidos como M1, secretam citocinas inflamatórias como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-18. São capazes de induzir respostas do perfil Th1, por meio da IL-12 e são altamente microbicidas. Macrófagos M1 expressam altos níveis de MHC-II, moléculas coestimuladoras CD80 e 86, e CD68. Secretam quimiocinas CXCL9 e 10, e expressam os receptores para quimiocinas CCR2 e 7 (JABLONSKI et al., 2015; CASTOLDI et al., 2016).

Esses macrófagos possuem o metabolismo centrado na glicólise aeróbica (**Figura 2**), com a glicose sendo convertida em piruvato, o qual é convertido em lactato pela Lactato Desidrogenase (LDH), mesmo em condições de normóxia. Esse processo é chave para a regeneração de NAD $^{+}$, o qual é necessário para sustentar a via glicolítica (CLASSEN; LLOBERAS; CELADA, 2009; O'NEILL; PEARCE, 2016). Esses macrófagos também possuem um alto fluxo da via das pentoses fosfato (PPP),

gerando NADPH, que é oxidado para a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) via CYBB, codificado pelo gene Nox2 (NADPH oxidase 2) (WEST et al., 2011).

Os macrófagos M1 apresentam o Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) com desvios, o primeiro levando ao acúmulo de Citrato, o qual é convertido pela ACOD1 (Irg1) em Itaconato, que pode atuar como agente antimicrobiano e inibidor da Succinato Desidrogenase (SDH) (MEISER et al., 2016). Isso promove o segundo desvio em que há acúmulo de Succinato (MILLS et al., 2016). O succinato pode inibir a Prolil-Hidroxilase (PHD - a qual marca HIF-1 α para degradação proteossomal), estabilizando HIF-1 α (TANAHILL et al, 2013). HIF-1 α têm como alvos gênicos a Slc2a1 (GLUT1), enzimas da via glicolítica (Hk2, Pfkfb3, Pkm2, Pdh e Ldh), além da pró-IL1 β (MCGETTRICK; O'NEILL, 2020). A glutamina alimenta o ciclo a nível de α -Cetoglutarato, uma vez que o citrato está sendo desviado (O'NEILL; ARTYOMOV, 2019).

Um terceiro desvio, a nível de malonato, foi descrito em macrófagos M1 uma vez que nesse perfil, o malonil-CoA se liga à GAPDH na lisina 213 em um processo chamado de malonilação, o qual leva à dissociação dessa enzima de diversos mRNAs como é o caso do transcrito de TNF α . Deste modo, a GAPDH deixa de reprimir a tradução de TNF α e passa a integrar o acelerado fluxo da glicólise (GALVÁN-PEÑA; O'NEILL, 2014).

Ademais, com a ativação da via de STAT1 pelo IFN γ , os macrófagos expressam Nos2 que codifica a Sintase de Óxido Nítrico Induzível (iNOS), convertendo L-arginina em NO e L-citrulina (RATH et al., 2014). O NO, além de microbicida, é metabolicamente conhecido como um importante inibidor de Piruvato Desidrogenase (PDH) e Aconitase 2 (ACO2), acentuando ainda mais o primeiro desvio do TCA (PALMIERI et al., 2020). NO também causa inibição dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (ETC), levando ao transporte reverso de elétrons (RET) e a subsequente formação de ROS mitocondrial (mtROS) (O'NEILL; PEARCE, 2016; LÍNDEZ; REITH, 2021).

As mitocôndrias de macrófagos M1 encontram-se mais fissionadas, apresentando-se mais puntiformes e com cristas menos espessas comparadas com macrófagos quiescentes (M0). A expressão dos complexos da ETC também é menor, fazendo com que a assinatura desse fenótipo de macrófago seja mais glicolítica e com menos fosforilação oxidativa (OXPHOS - que geraria ATP) (KAPETANOVIC et al., 2020). Essa disfunção mitocondrial faz com que macrófagos M1 não possam ser

1.1.2. Macrófagos M2

Os macrófagos alternativamente ativados (IL-4 ou IL-13) de fenótipo M2 secretam as citocinas anti-inflamatórias TGF- β e IL-10, e as quimiocinas CCL17, 18, 22 e 24 (JABLONSKI et al., 2015). São induzidos por respostas Th2 e podem induzir células T reguladoras (OISHI et al., 2016). Os M2 expressam altos níveis de PPAR γ que induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, além de expressarem CD163 (receptor scavenger) e CD206 (receptor de manose), entre outros marcadores (JABLONSKI et al., 2015). Essa polarização está relacionada com homeostase tecidual, reparo, fibrose, patologias alérgicas, helmínticas e tumorais (JABLONSKI et al., 2015; CASTOLDI et al., 2016). Conforme observa-se na **Figura 3**, os macrófagos M2 centram seu metabolismo em uma maior taxa de OXPHOS comparado aos macrófagos M1 e M0 (VATS et al., 2006; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; GALVÁN-PEÑA; O'NEILL, 2014).

Esses macrófagos apresentam um Ciclo de Krebs canônico e intacto. Usam como fonte de carbono não somente a glicólise, mas também ácidos graxos, glutamina e lactato extracelular (TANNAHILL et al., 2013; JHA et al., 2015; NOE et al., 2021). O lactato em especial pode ser internalizado pelos macrófagos, ser convertido em piruvato, que entra na mitocôndria e é transformado em Acetil-CoA, e posteriormente em Citrato. O citrato intramitocondrial pode ser transportado para o citosol e transformado em Acetil-CoA pela ATP Citrato Liase (ACLY) para síntese de lipídios e para a acetilação de histonas na região de genes relacionados ao perfil M2, como Arg1, Retnla, Ccl22 e Il10, facilitando a transcrição desses genes (NOE et al., 2021).

Os macrófagos M2 expressam altos níveis de Arg1, que é induzida pelas citocinas IL4/13 via STAT6, e, com isso, deslocam a utilização de L-arginina para produção de ureia e L-ornitina (RATH et al., 2014). A L-ornitina serve como precursora para produção de L-prolina através da Ornitina Aminotransferase (OAT), promovendo a produção de fibras colágenas críticas para reparo tecidual e também para produção de poliaminas através da Ornitina Descarboxilase (ODC), a qual é importante em processos de proliferação celular (LÍNDEZ; REITH, 2021).

A morfologia mitocondrial neste perfil é predominantemente caracterizada por mitocôndrias fusionadas, alongadas, inúmeras ramificações, cristas espessas,

E o T-bet é um forte candidato para modulação do fenótipo dos macrófagos no contexto inflamatório, uma vez que já se foi provado por Garret e colaboradores (2007) que “células dendríticas” CD11c+ expressam T-bet com uma função regulatória na colite e, de modo preliminar, nosso grupo identificou a expressão de T-bet por

macrófagos peritoneais, cujo papel foi por nós estudado no presente trabalho (dado não demonstrado).

1.2. O FATOR DE TRANSCRIÇÃO T-BET

Codificado pelo gene Tbx21, T-bet é um fator de transcrição da família de proteínas com domínio T (T-Box) que regula a diferenciação e a função das células do sistema imune, podendo regular positiva ou negativamente a transcrição de genes alvos (MISHAL; LUNA-ARIAS, 2022).

T-bet foi originariamente descoberto como importante fator de transcrição para polarização de linfócitos T CD4 naíve sob estímulo de IL-12 via STAT4 em células efectoras e pró-inflamatórias do perfil Th1, e com isso, recebeu o nome de **T-Box** expressa em células **T** (SZABO et al., 2000). O mecanismo se baseia na transativação do gene de IFN γ que, dentre outras funções, essa citocina polariza classicamente os macrófagos, potencializando seu poder de fagocitose e ação microbicida (ZHANG; YANG, 2000). O IFN γ também atua autocrinamente em linfócitos Th1 via STAT1, aumentando ainda mais a expressão de Tbx21 (LIGHVANI et al., 2001).

Assim como ilustrado na **Figura 4**, a literatura contempla diversos estudos da função de T-bet nas células imunes (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013), principalmente linfóides, como a repressão da expressão de Gata3 e Ror γ t, genes relacionados à polarização Th2 e Th17 (SZABO et al., 2000); produção de granzima B e IFN γ por linfócitos T CD8 (citotóxicos) (TAKEMOTO et al., 2006), produção de IFN γ por células assassinas naturais (NK) e células linfóides inatas (ILCs) tipo 1 (TOWNSEND et al., 2004); e mudança de classe de imunoglobulinas para IgG2 em linfócitos B (NGUYEN et al., 2012; HÄGGLÖF et al., 2022).

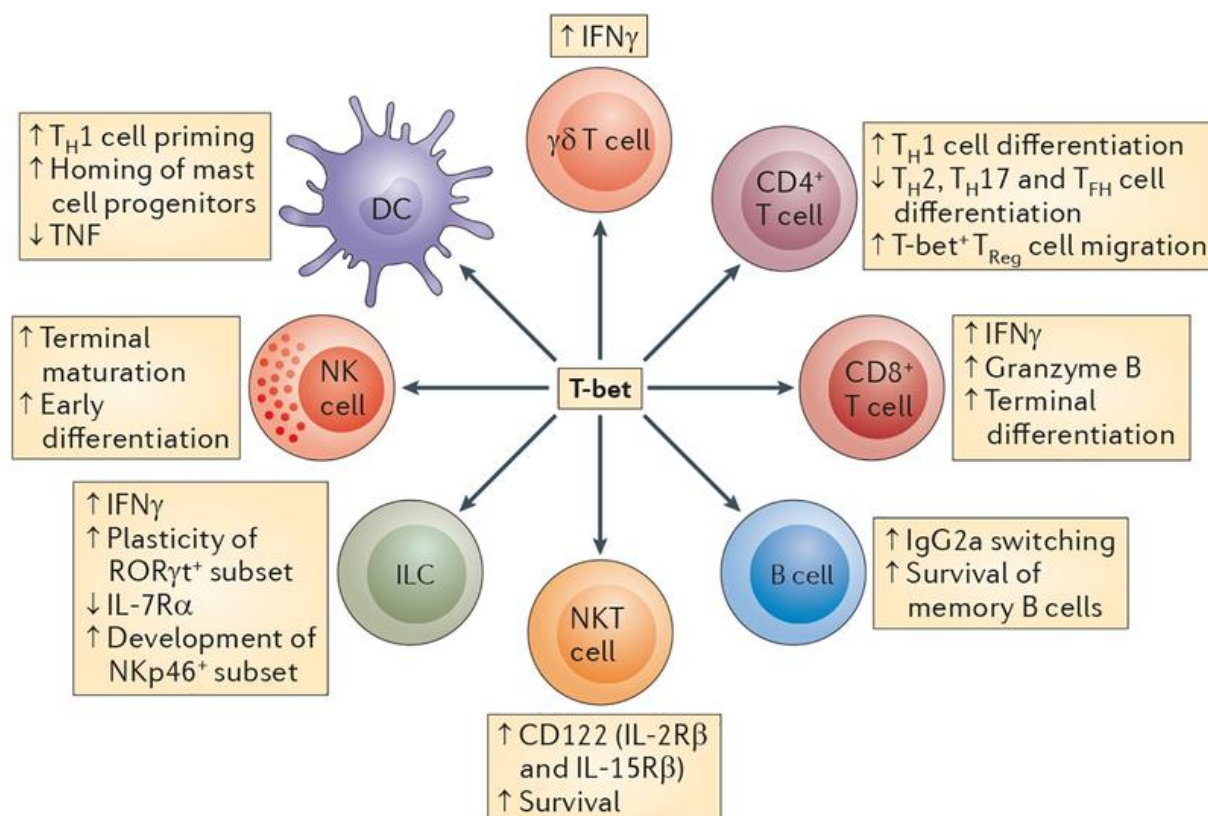


Figura 4. Função de T-bet nas células imunes. T-bet foi identificado em células T CD4 como responsável pela transativação de IFN γ . Posteriormente, a mesma função foi dada para células T CD8, T $\gamma\delta$, NKT, ILC1 e NK. Em células B, promove a mudança de isotipo para IgG2a. Em células dendríticas é um regulador negativo da expressão de TNF α . Não há função descrita para macrófagos.

Fonte: Figure 1. Expression and functions of T-bet in immune cells de Lazarevic, Glimcher e Lord (2013).

Estudos com a deleção de T-bet em camundongos demonstraram maior susceptibilidade a infecções de bactérias e protozoários (RAVINDRAN et al., 2019; LÓPEZ-YGLESÍAS et al., 2021). Isso se deve à incapacidade da produção de IFN γ , o qual é necessário para potencializar a função efetora de macrófagos (PRITCHARD; KEDL; HUNTER, 2019).

Camundongos C57BL/6 inoculados com *Leishmania major* são resistentes à infecção em comparação a camundongos BALB/c e animais C57BL/6 deficientes em Tbx21, e se tornam mais susceptíveis ao agravo da leishmaniose (SZABO et al., 2002). A resposta contra infecções com *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* entérica, *Herpes simplex Virus 2*, *Trypanosoma cruzi*, *Listeria monocytogenes* e *Toxoplasma gondii* também dependem da produção de IFN γ derivado de T-bet por células do perfil Th1 (PRITCHARD; KEDL; HUNTER, 2019).

Em contraste, há estudos que demonstram o papel deletério de T-bet na condição de sepse. Animais induzidos à sepse, sepse severa e choque séptico apresentam níveis elevados de mRNA de Tbx21 e IFN γ (PRITCHARD; KEDL;

HUNTER, 2019). Sendo assim, T-bet é importante para lidar com as infecções, porém níveis descontrolados podem comprometer a homeostase no processo inflamatório.

É notório que o T-bet possui um papel chave no processo inflamatório, devido ao papel na modulação de diversas células imunes, mas por mecanismos ainda não completamente elucidados em todas as células, especialmente mieloides (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013). Em células dendríticas (DCs), o T-bet foi descrito por Garrett et al. (2007) como um importante modulador negativo da expressão de TNF α . Um papel regulador (anti-inflamatório) totalmente contrário ao presente em células da linhagem linfóide (inflamatório) foi proposto a esse fator de transcrição em células dendríticas (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

A deficiência de T-bet em animais Rag2KO leva a produção exacerbada de TNF α por DCs intestinais (CD11c+), agravando a colite. Em contrapartida, a superexpressão de T-bet nas DCs fez com que a produção de TNF α diminua de maneira dose-dependente (GARRET et al., 2007).

Dentre as limitações do estudo de Garrett et al. (2007), destaca-se a utilização do modelo TRUC (*T-bet*^{-/-}*RAG2*^{-/-} *Ulcerative Colitis*) de deleção total. Também não houve estudo de KO condicional de Tbx21 em DCs ou linhagem mieloide. Por citometria, os autores isolaram células CD11c+ como sendo DCs, contudo, sabe-se que CD11c é altamente expresso em macrófagos teciduais e inflamatórios (LU et al., 2022) e, dessa forma, os fenótipos observados pelos autores podem ser remetidos a macrófagos também.

Sendo assim, apesar de sua função bem elucidada na linhagem linfóide, a literatura ainda é incerta a respeito do papel de T-bet em células da linhagem mieloide, sobretudo em macrófagos. O nosso trabalho foi centrado em entender o que a deficiência em T-bet modula nos macrófagos, para subsidiar futuros estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos.

2. JUSTIFICATIVA

A literatura carece de estudos que avaliem especificamente o papel do fator de transcrição T-bet em macrófagos. Como o T-bet regula diversas células imunes, inclusive células “DCs CD11C+” (GARRET et al., 2007), é possível que esse fator de transcrição também possa modular o perfil e o metabolismo de macrófagos e a subsequente homeostase sistêmica em contexto de saúde/doença.

Esse potencial eixo de regulação de macrófagos pode ser utilizado para desvendar mecanismos para atenuação da inflamação. Isso pode fornecer achados que auxiliarão na identificação de novas vias regulatórias, levantando-se a possíveis novas propostas de estratégias terapêuticas para prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias em que o macrófago juntamente com seus mediadores inflamatórios tenha um papel importante.

3. HIPÓTESES

Temos como a principal hipótese de que a deficiência de T-bet na linhagem mieloide de camundongos será responsável por um fenótipo de maior inflamação frente ao estímulo de infecção bacteriana. Hipotetizamos que T-bet seja um fator de transcrição regulatório em macrófagos e células mieloides, diferentemente de seu papel pró-inflamatório em células da linhagem linfóide.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estudar o papel de T-bet na modulação de macrófagos.

4.2. Objetivos específicos

- a) Determinar a cinética de Tbx21 e T-bet em macrófagos;
- b) Estudar o impacto da deleção de Tbx21 sobre citocinas, metabolismo e função efetora dos macrófagos;
- c) Avaliar o enriquecimento da ligação de T-bet no promotor de alguns genes modulados nos macrófagos;
- d) Analisar aspectos inflamatórios de animais suficientes e deficientes em T-bet na linhagem mieloide frente desafio de infecção bacteriana peritoneal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Os camundongos foram mantidos no biotério de animais do DGEMI e DBBT/IB/Unicamp, na área de Imunologia. Eles foram acondicionados em microisoladores coletivos, com maravalha, contendo no máximo cinco animais do mesmo sexo por caixa, com ciclo artificial claro/escuro de 12/12 horas, a uma temperatura constante de 22°C e com suprimento de água (filtrada) e alimento (ração padrão-CHOW) autoclavados à vontade.

Os animais foram acondicionados com sistema de exaustão e enriquecimento de microambiente para evitar estresse, além da limpeza semanal. O projeto de pesquisa referente a essa dissertação intitulado “Estudo do papel de T-bet em Macrófagos no modelo de sepse” foi aprovado junto ao Comitê de Ética de Uso de Animais do Instituto de Biologia da UNICAMP (Protocolo nº 6039-1/2022 – **ANEXO I**).

Os animais [B6.129P2-Lyz2^{tm1\(cre\)lfo/J}](#), ou simplesmente LyzMcre, apresentam o alelo de *Cre recombinase* localizado na primeira codificação ATG do gene da lisozima 2 (Lyz2) para *knockout* condicional (KOc) em células mieloides. Eles foram cruzados com os animais [B6.129-Tbx21^{tm2Srnrl/J}](#), ou Tbx21^{ff} que possuem sítios loxP flanqueando os éxons 2-6 do gene Tbx21, para deleção condicional de Tbx21 apenas na linhagem mielóide, a qual pertencem os macrófagos. Para o KO de Tbx21, é necessário genótipo homozigoto para Tbx21^{ff} e pelo menos heterozigoto para LyzM^{cre}.

Esses animais foram submetidos à genotipagem por [PCR convencional](#) do DNA extraído de 2mm de cauda de acordo com protocolo da *The Jackson Laboratory*®. Os animais foram eutanasiados com deslocamento cervical para coleta de medula óssea para cultura primária de Macrófagos Derivados de Medula Óssea (BMDM). Alguns animais participaram do grupo de experimentos *in vivo* de infecção peritoneal com *E. coli* e tiveram sangue e seus órgãos como fígado, baço, e lavado peritoneal coletados para análises de citometria de fluxo e ELISA (soro).

5.2. Cultura primária de macrófagos e estímulos

Com auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril coletamos fêmures e tíbias de animais devidamente eutanasiados para tubos Falcon estéreis de 15 mL com 5 mL de álcool etílico 70%. Dentro do fluxo laminar, cortamos as espículas dos ossos e lavamos a medula óssea (com PBS 1X gelado estéril usando seringa e agulha hipodérmica) para um novo tubo Falcon de 50 mL estéril.

Centrifugamos 300xG por 5 minutos, desprezamos o PBS, as células foram ressuspensas com 5mL de tampão de lise de hemácias por 5 minutos, o qual é neutralizado com mesmo volume de PBS. Centrifugamos e desprezamos o líquido. As células foram ressuspensas em 1×10^6 /mL e cultivadas durante 5 dias em meio [RPMI-1640](#) da *Sigma Aldrich*® suplementado com 10% do sobrenadante de L929 (que contem M-CSF para diferenciação de macrófagos *in vitro*) conforme descrito previamente por nosso grupo (MONTEIRO *et al.*, 2020).

O meio foi trocado no 6º dia, e os estímulos realizados no 7º dia. Assim, a cultura ficou livre de células mortas e células não aderentes, restando ~98% de Células vivas CD11b+ F4/80+ (macrófagos). Para mimetizar *in vitro* o ambiente de infecção bacteriana, BMDMs foram polarizados para M1 com LPS (Cat L4391-1MG *Sigma Aldrich*) 100ng/mL e IFN γ (Cat 315-05 *PeptoTech*) 20ng/mL. Já para polarização M2, foram estimulados com 20ng/mL de IL-4 (Cat 214-14 *PeptoTech*).

5.3. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído de cultura de células e purificado conforme o protocolo padrão de [Tri-Reagent](#) da *Sigma Aldrich*® (Cat. T9424-200ML), Fenol Clorofórmio, Isopropanol e Etanol 75% com sucessivas etapas de centrifugação. O RNA foi ressuspensado em 20 μ L de [H₂O Ultrapura](#) e quantificado no Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader da *BioTek/Agilent*®. Para a reação de transcrição reversa e produção de cDNA, o kit [High-Capacity RNA-to-cDNA](#)™ da *Thermo Fischer*® foi utilizado (Cat 4387406) e o transcrito reverso diluído 10X (Add 180 μ L de H₂O Ultrapura aos 20 μ L de cDNA).

5.4. Imunoprecipitação da Cromatina

A Imunoprecipitação da cromatina foi realizada com o kit [MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System \(Cat 492024\)](#) da Thermo Fischer® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O anticorpo [T-bet/TBX21 \(E4I2K\) Rabbit mAb #97135](#) foi utilizado para imunoprecipitar T-bet. Ao final do protocolo, o DNA que estava ligado à T-bet foi purificado com os reagentes do kit. Para verificar se T-bet se ligava nos promotores dos genes que foram modulados, realizamos qPCR com primers que flanqueiam a região TATA-box que T-bet possivelmente interagiria.

5.5. qPCR

Para realização da qPCR, o kit [QuantiNova® SYBR® Green PCR](#) da Qiagen® foi usado conforme instruções do fabricante com otimização de 3 µL de Sybr Green para 0,3 µL de uma solução de Primers Forward+Reverse a 10 µM, por poço. 3µL de cDNA foi utilizado. A corrida foi realizada no equipamento *CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System* da Bio-Rad.

A análise da expressão gênica foi realizada com auxílio do programa *CFX Manager Software* versão 2.0, por meio de $2^{\Delta\Delta Ct}$ versus o Controle experimental, em que não há perda ou ganho de função e não há estímulos, exemplo Flox M0. O gene que codifica a subunidade 18S do ribossomo de camundongos foi utilizado para referência na análise por não alterar Ct conforme estímulos são administrados em nossas células (não utilizamos GAPDH por ser uma enzima modulada metabolicamente e padronizamos o 18S que é amplamente utilizado em artigos de imunometabolismo nas revistas Cell, Nature e Science).

Já para análise de ChIP por qPCR, utilizamos do $2^{\Delta\Delta Ct}$ versus input, ou seja, a amostra que não sofreu processo de Imunoprecipitação com anticorpo de T-bet.

Os primers utilizados foram desenhados no [Primer-BLAST da NCBI](#) a partir da sequência de interesse para se amplificar, e adquiridos pela *Sigma-Aldrich®*. As sequências dos primers estão na **Tabela 1**, a seguir:

TABELA 1. Sequência de primers para qPCR.

GENE	Forward	Reverse
<i>18s</i>	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'
<i>Tbx21</i>	5'-AGCAAGGACGGCGAATGTT-3'	5'-CCACCTGGGAATTCAACATC-3'
<i>Tnfa</i>	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	5'-AGATAGCAAATCGGCTGACG-3'
<i>Nos2</i>	5'-TGGTGAAGGGACTGAGCTGT-3'	5'-CCAACGTTCTCCGTTCTCTTG-3'
<i>Arg1</i>	5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3'	5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3'
<i>Il1b</i>	5'-GGCAGCTACCTGTGTGTCTTTCCC-3'	5'-ATATGGGTCCGACAGCACGAG-3'
<i>Il6</i>	5'-TGCTTCCCCTCTCTCATGC-3'	5'-TGTCTGGAAAAAGTGCCGCT-3'
<i>Il12b</i>	5'-GTGCAAGCTCAGGATCGCTA-3'	5'-CCTCACAAGCCTCCTGTTGT-3'
<i>Slc2a1</i>	5'-GCTGTGCTTATGGGCTTCTC-3'	5'-CACATACATGGGCACAAAGC-3'
<i>Hk2</i>	5'-ATTGTCCAGTGCATCGCGGA-3'	5'-AGGTCAAACCTCTCTCGCCG-3'
<i>Pkm2</i>	5'-GCCGCCTGGACATTGACT-3'	5'-CCATGAGAGAAATTCAGCCGA-3'
<i>Ldha</i>	5'-ACGCAGACAAGGAGCAGTGGAA-3'	5'-ATGCTCTCAGCCAAGTCTGCCA-3'
PROMOTOR	Forward	Reverse
<i>Tnfa</i>	5'-CACAGAATCCTGGTGGGGAC-3'	5'-CCCTACACCTCTGTCTCGGT-3'
<i>Il12b</i>	5'-TGAACCTCGGTTTGGGGCAAG-3'	5'-AATAGAGGCGGCAATGGCTA-3'
<i>Nos2</i>	5'-CAGGAAGAGATGGCCTTGCA-3'	5'-TCCCAGTTGGGTGTGCAAG-3'

Primers para avaliar expressão gênica através do cDNA foram desenhados a partir do *Refseq mRNA* de *Mus musculus*. Já os primers para detecção de regiões do DNA foram desenhados a partir da base de dados *Refseq Representative Genomes* de *M. musculus* utilizando-se da sequência promotora obtida no [Eukaryotic Promoter Database](#). **Fonte:** Próprio autor.

5.6. ELISA

Os ensaios de imunoabsorção enzimática foram realizados com os *kits* da BD OptEIA™: *Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set* (Cat 555268), *Mouse IL-1β ELISA Set* (Cat DB559603), *Mouse IL-6 ELISA Set* (Cat 555240) e *Mouse IL12 (p40/70) ELISA Set* (Cat 555256). Foram utilizados com a finalidade de dosagem das citocinas liberadas pelos BMDMs no meio de cultura, mediante estímulos nos experimentos. A técnica usada se baseia no ELISA de captura ou sanduiche conforme instruções do fabricante. As absorbâncias de 450nm e 570nm foram aferidas pelo Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader da *BioTek/Agilent*®. Os resultados foram obtidos com a equação da reta proveniente da curva padrão.

5.7. Mensuração de H₂O₂

A fim de determinar a quantidade de H₂O₂ da cultura celular, contamos com o *kit Amplex™ Red Reagent* da *Thermo Fischer*® (Cat A12222) e seguimos as recomendações e protocolos do fabricante. Trata-se de uma probe altamente sensível para dosagem dessa espécie reativa de oxigênio por meio da detecção de

fluorescência no nosso *Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader* da *BioTek/Agilent®*.

5.8. Mensuração de NO

Com a finalidade de estimativa de NO (um gás) produzido pela iNOS, a Reação de Griess é o padrão ouro a ser realizado com o *kit Invitrogen™ Griess Reagent Kit, for nitrite quantitation* (Cat G7921), como feito por Palmieri *et al* 2020. Esse teste é capaz de dosar nitrito que reage com sulfanilamida em condições ácidas formando diazo. Este último reage com N-(l-naftil)etilenodiamina (NED) mudando a cor para um vermelho/violeta intenso.

Para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato, foi utilizado 50 µL da mistura de Sulfa 1% (2X) e NED 0,1% (2X) na proporção 1:1, e 50 µL de amostra. A curva padrão de nitrito teve concentração inicial de 200 µM e foram feitas diluições seriadas até 0. Realizamos a leitura após 5 minutos de reação no *Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader* da *BioTek/Agilent®* do LIM, com método de absorbância de ponto final à 540nm. O resultado de abs foi analisado com equação da reta da curva padrão.

5.9. Citometria de Fluxo (FACS)

O protocolo padronizado para Citometria de Fluxo com marcação para T-bet, envolve anticorpos conjugados à fluoróforos de comprimento de ondas diferentes para excitação e emissão adquiridos pelas empresas *Biolegend®* e *BD Biosciences®*. Para marcação de citocinas intracelulares, o *kit Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop™* foi utilizado, tudo conforme instruções dos fabricantes. Painel de anticorpos/fluoróforos pode ser consultado na **Tabela 2**. Os painéis de fluoróforos foram elaborados com auxílio da ferramenta [BD Spectrum Viewer](#).

Além da marcação de viabilidade (*Live and Dead*), foram preparados poços com um pool de amostras que não foram marcadas com nenhum anticorpo de fluorescência (*Unstained*), bem como FMOs (*Fluorescence Minus One*) e marcações de cor única (*Single Color*). Deste modo, os limites (*Threshold*) de negativo e positivo puderam ser melhor determinados para as fluorescências. Bloqueador de FcR foi utilizado para eliminar a possibilidade de ligações inespecíficas de nossos anticorpos.

Tabela 2. Painel de citometria para caracterização de infiltrado inflamatório peritoneal.

Marcador	Canal utilizado	Empresa - Catálogo
Zombie aqua	BV480	BioLegend - 423101
CD45	BV750	BioLegend - 103157
CD11b	APC-Cy7	BioLegend - 101226
CD11c	BUV737	BD - 612797
F4/80	BB515	BioLegend - 123108
Ly6G	BB700	BioLegend - 127616
Ly6C	BV605	BioLegend - 128035
CD206	BV786	BioLegend - 141729
MHCII	BUV395	BD - 743876
TNF- α	PE-Cy7	BioLegend - 506324
IL-1 β	PE	Invitrogen - 12-7114-82
IL-12	APC	BioLegend - 505206

Fonte: Próprio autor.

O equipamento *BD FACSymphony™ A5 | High-Parameter Cell Analyzer* foi utilizado para citometria multiparamétrica. Após a aquisição, os eventos foram analisados no *Software FlowJo™ v10* da BD.

5.10. Western Blotting

As amostras proteicas foram coletadas com [RIPA](#) + Inibidores de protease e fosfatase da *Cell Signaling®* (Cat 5872S) para tubos de 1,5mL, sonicadas por 20s e quantificadas pelo método de BCA da *Thermo Fischer®*, sempre mantidas em gelo ao manusear ou Freezer -80°C.

O gel *Resolving SDS-PAGE Bis-Acrilamida 12%* e o gel *Stacking 6%* foram padronizados para T-bet (65kDa). 30 μ g é a concentração proteica a ser depositada por poço para eletroforese em 120v em cuba da BioRad®. A *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa* (Cat 26619) será utilizada para referência de peso molecular. A transferência para membrana de [PVDF](#) foi realizada à 400mAh por 90 min em cuba da BioRad®. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com solução de Leite livre de gorduras 5% em TBS-T (TBS-Tween 0,1%) por 1h com posterior lavagem em TBS-T.

Os anticorpos primários anti *T-bet/TBX21 (E4I2K) Rabbit mAb #97135*, anti *Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAb #3033*, anti *NF- κ B p65 (D14E12) XP® Rabbit mAb #8242* da *Cell Signaling®* e *Anti-NOX2/gp91phox (ab129068)* da

Abcam® foram utilizados 1:1000 overnight e posteriormente incubados por 1h com o anticorpo secundário *Anti Rabbit IgG, HRP linked #7074* 1:10000.

Utilizamos o *kit Thermo Fischer® SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Cat 34095) para revelação da membrana no aparelho Chemidoc da BioRAD® com 8 capturas em 120 segundos. A densidade óptica foi aferida pelo Image LAB e/ou Image J, para quantificação das bandas, versus controle endógeno que pode ser Vinculina ou β -actina. Caso seja proteína fosforilada, foi comparada com sua fração total.

5.11. Ensaios metabólicos com fluxo extracelular

Contamos com os aparelhos *Seahorse XFe24 Analyzers - Cell Analysis* da *Agilent*®, que são capazes de mensurar em tempo real dois parâmetros principais: ECAR (*Extracellular Acidification Rate* – Taxa de acidificação extracelular) e OCR (*Oxygen Consumption Rate* – Taxa de consumo de oxigênio), para revelar como estão moduladas a glicólise e a OXPHOS, respectivamente, dentre outros parâmetros, mediante aplicação de drogas durante a corrida. Os macrófagos foram plaqueados em placas próprias de 24 poços (*Seahorse FluxPaks*) e os testes realizados conforme recomendações do fabricante e trabalho de Van de Bossche, Baardman e de Winther (2015). O *kit Seahorse XF Glycolysis Stress Test* da *Agilent*® foi utilizado conforme instruções do fabricante. A normalização foi realizada no próprio software *Wave* fornecendo-se a quantificação de proteínas de cada poço. O ensaio de MitoStress será realizado tão cedo chegue o novo Seahorse XFe96 que foi comprado por importação para o nosso laboratório, a fim de conhecermos o perfil de respiração dos nossos macrófagos.

5.12. Ensaios de capacidade efetora dos macrófagos

A cepa BL21 da bactéria *Escherichia coli* (DH5 α) GFP clonada com o vetor pET28a (resistente a canamicina; expressão induzida por adição de IPTG; promotor T7) foi utilizada para o ensaio de capacidade efetora dos macrófagos. O genótipo da BL21 é F- ompT hsdSb (Rb- mb-) gal dcm (DE3) pLysS (resistência a cloranfenicol). Neste sentido, a bactéria foi cultivada um dia anterior em meio LB Ágar para seleção de colônias verdes resistentes à canamicina 50 μ g/mL.

Cultivamos as bactérias em meio LB líquido com o antibiótico de seleção, e preparamos o meio de interação com macrófagos (T-bet^{+/+} e ^{-/-}), em sextuplicata na placa de 96 poços, numa proporção de 10 bactérias para 1 macrófago. Plaqueamos 2×10^5 BMDM e os desafiamos com 2×10^6 bactérias. Após tempo indicado, lavamos os poços 2x com PBS estéril filtrado e lisamos os macrófagos com solução de 1% de Triton em PBS por 5 minutos. Após isso, diluições seriadas foram realizadas a fim de determinar a quantidade de CFU/mL das bactérias no interior dos macrófagos. As amostras diluídas foram semeadas em placas de Petri com meio LB Ágar, e a contagem de colônias no dia seguinte foi realizada, com multiplicação pelo fator de diluição e correção para 1 mL.

5.13. Modelo *in vivo* de peritonite séptica

As bactérias BL1 sem GFP (para utilização de FITC na citometria de fluxo) foram cultivadas com dois dias de antecedência (à infecção) por 24h em 5 tubos de meio LB, sob agitação constante de 180RPM a uma temperatura de 37°C. As bactérias foram colocadas dentro de um tubo Falcon de 50mL e centrifugadas a 1800RPM por 10 minutos para eliminar o meio LB e foram ressuspensas em 5mL de PBS estéril. A quantificação de CFU/mL foi realizada em placa de Petri com meio LB ágar, com diluições seriadas.

A quantidade de bactéria utilizada foi de 7×10^8 CFU, em cerca de 120µL de solução em seringas de insulina estéreis, por ser uma carga bacteriana subletal previamente padronizada pelo laboratório com camundongos C57BL/6J.

Com a finalidade de avaliar o fenótipo inflamatório de animais na condição de suficiência ou deficiência de T-bet na linhagem mieloide frente a um modelo de peritonite séptica, foram utilizados 6 animais por grupo experimental, conforme cálculo amostral aprovado junto ao comitê de ética:

- (6) Tbx21^{ff} com injeção intraperitoneal de PBS estéril;
- (6) Tbx21^{ff} com injeção intraperitoneal de *E. coli*;
- (6) Tbx21^{ff}LyzM^{cre} com injeção intraperitoneal de PBS estéril;
- (6) Tbx21^{ff}LyzM^{cre} com injeção intraperitoneal de *E. coli*.

Após 24 horas, os animais receberam Cetamina (100 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) intramuscular, tiveram seus sangues coletados por punção cardíaca, e posteriormente, foi coletado o lavado peritoneal, baço e fígado. O sangue coagulado foi centrifugado a 5000 RPM por 25 minutos para obtenção do soro para quantificação de citocinas por ELISA. Já o lavado peritoneal seguiu para marcação de citometria de fluxo. O baço e o fígado foram pesados, processados em Cell Strainers, e semeamos 10 μ L para contagem de CFU normalizando por grama do órgão.

5.14. Análise dos resultados

Os resultados brutos foram tabulados em planilhas do Excel e analisados por meio do software GraphPad Prism 8®, com ressalva de deposição no Google Drive. Foram realizados dois ou três experimentos independentes, e foi evidenciado na figura um gráfico representativo com média $\pm$ SEM. Para análise de dois grupos foi utilizado o Teste T student. Para análise de mais de três grupos, foi utilizado o Teste Anova one-way. Para o experimento de Seahorse, em que as mesmas células são analisadas em temporalmente, foi utilizado o Teste Anova two-way. Consideramos significância nas diferenças dos grupos experimentais quando o P resultou em menor ou igual a 0.05, com marcação de asterisco (*). Não foram utilizados mais asteriscos para evidenciar valores de P menores, visto que 0.01 e 0.001 são menores que 0.05, ou seja (*).

Para os ensaios de RT-qPCR, utilizamos o software CFX384 Manager da BioRad, e analisamos a expressão gênica relativa ao gene 18S do controle experimental sem deleção e sem tratamento (Tbx21^{fl/fl} M0) por meio de 2^{^-DDCT}. Para análise de ChIP qPCR foi utilizado 2^{^-DDCT} das amostras imunoprecipitadas comparadas ao input. Para os ensaios de ELISA, quantificação de lactato, proteínas e nitrito utilizamos da curva padrão que apresenta concentrações conhecidas que forneceram absorbâncias específicas em cada experimento; deste modo, subtração do branco e equação da reta, quantificamos as amostras. A quantificação de H₂O₂ foi realizada com o delta da cinética de fluorescência, conforme determinado pelo fabricante (Amplex). Já para citometria de fluxo, utilizamos o software FlowJoV10. As quantificações de bandas de Western Blotting foram realizadas com o software ImageJ dividindo os pixels obtidos pela banda da proteína pelo seu endógeno, ou da fração fosforilada dividida pela fração total.

6. RESULTADOS

A fim de conhecer a cinética de expressão gênica e proteica de Tbx21/T-bet em macrófagos, derivamos macrófagos da medula óssea (BMDM) de camundongos C57BL/6J e tratamos essas células com estímulos inflamatórios como LPS, IFN γ , LPS + IFN γ (M1) e o estímulo de IL-4 que polariza os macrófagos para o perfil alternativo, ou de reparo. Fizemos as análises após 1h, 3h, 6h, 12h e 24h. Observamos que o LPS sozinho não modulou a expressão gênica de Tbx21 (**Figura 1a**). No entanto, o tratamento apenas com IFN γ foi suficiente para suprarregular a expressão de Tbx21, com pico após 3 horas de estímulo (aumento médio de 7.13 em relação ao M0, SEM=0.2) (**Figura 1a**). O estímulo concomitante de LPS+IFN γ foi responsável por intensificar a expressão de Tbx21 (aumento médio de 15.82 em relação ao M0, SEM=1.4), frente ao aumento observado com IFN γ (**Figura 1a**). A IL-4 também não foi capaz de induzir a expressão de Tbx21 (**Figura 1a**). Juntos, estes dados sugerem que a expressão e função de Tbx21 está mais relacionada com o perfil inflamatório de macrófagos (M1) do que com o perfil de homeostase (M0) ou reparo (M2).

Com o intuito de avaliar a cinética proteica de T-bet em macrófagos, utilizamos de 2 abordagens, sendo elas citometria de fluxo e Western Blotting. Utilizamos do estímulo que mais aumentou a expressão gênica (LPS+IFN γ) para fazer a avaliação da cinética proteica. Na citometria, observamos um aumento na expressão dessa proteína após 6 horas de tratamento LPS+IFN γ (MFI média=1449, SEM=117.5), com diminuição da intensidade chegando ao basal após 24h (MFI média=1128, SEM=30.95) (**Figura 1b**). Por Western Blotting, observamos um aumento na expressão da proteína de 1h até 12h após estímulo com LPS+IFN γ , o qual decaiu a níveis inferiores aos basais após 24h (**Figura 1c**). Assim, macrófagos não estimulados (M0) expressam baixos níveis de T-bet, o que é aumentado frente a estímulo com LPS+IFN γ .

Considerando que o estímulo de IFN γ foi suficiente para induzir o aumento da expressão de Tbx21 nos BMDMs, e STAT1 é uma via deflagrada quando há a ligação de IFN γ em seu receptor, decidimos avaliar se o fenótipo de aumento da expressão de Tbx21 em resposta ao estímulo de IFN γ é dependente de STAT1. Para isso, construímos um sistema de silenciamento da expressão gênica de Stat1, com uso de shRNA (**Figura 1d**). Observamos que com o silenciamento de STAT1, houve

diminuição da expressão de Tbx21 induzida por LPS+IFN γ (**Figura 1e**), evidenciando participação desta via.

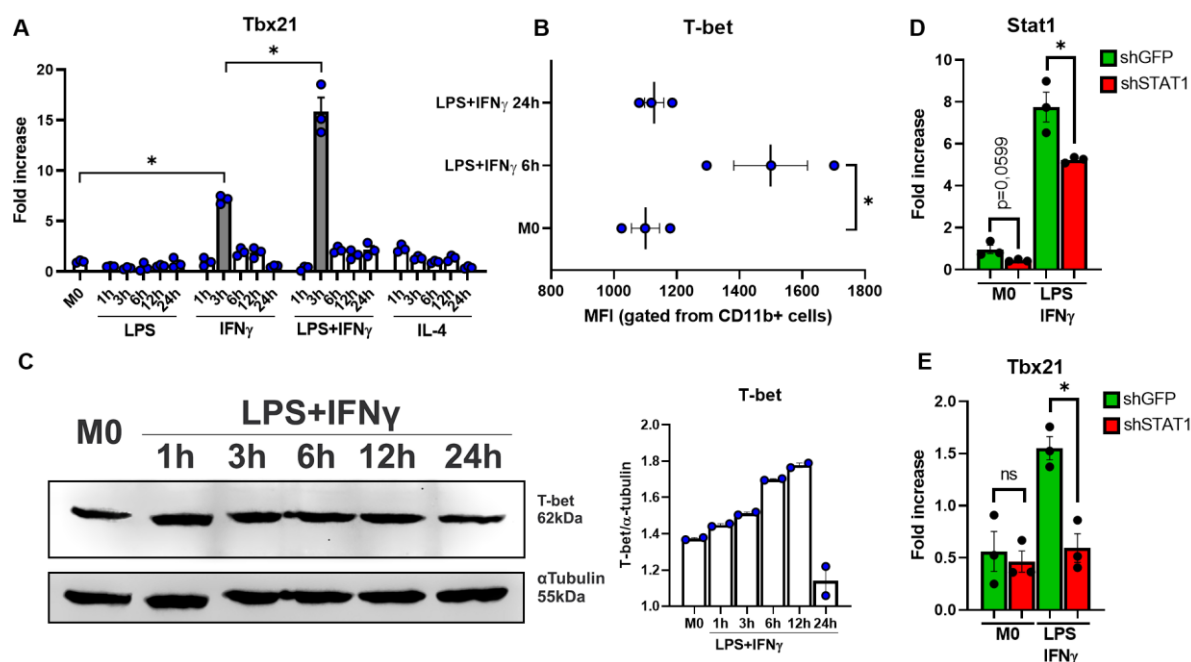


Figura 1. Cinética de mRNA e proteína de Tbx21/T-bet em macrófagos.

- RTqPCR de Tbx21 de BMDM, 1×10^6 células por poço;
- Citometria de fluxo de T-bet (APC) expresso em BMDM CD11b+, 1×10^6 células por poço;
- Western Blotting de T-bet proveniente de cultura de BMDM, 2×10^6 células por poço;
- RTqPCR de Stat1 de BMDM, 1×10^6 células por poço;
- RTqPCR de Tbx21 de BMDM com silenciamento de Stat1, 1×10^6 células por poço.

Gráficos são representativos de 2 ou 3 experimentos independentes, analisados com teste ANOVA one-way e demonstrados como média $\pm$ SEM.

Sabendo que os macrófagos expressam T-bet, hipotetizamos que sua função estaria relacionada com a regulação de citocinas nessas células, devido ao seu papel em outras células imunes. Para constatar isso, utilizamos da abordagem de perda de função de T-bet na linhagem mieloide com o uso de camundongos C57BL/6J Tbx21^{ff} cruzados com LyzM^{cre}. Cultivamos BMDMs de animais Tbx21^{ff} e Tbx21^{ff}LyzM^{cre}, prosseguimos com estímulo de LPS+IFN γ , extraímos RNA para qPCR e sobrenadante para ELISA, avaliando as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF α .

Quanto à expressão gênica de Il1b (Pró-IL-1 β) e Il6, não observamos diferença na quantidade transcrita, já Il12 e Tnf α foram mais transcritos em macrófagos Tbx21^{-/-} do que Tbx21^{+/+}, frete a estímulo com LPS+IFN γ (**Figura 2a**), fenótipo confirmado também pela quantificação dessas proteínas secretadas no meio (**Figura 2b**). Uma vez que a via de NF- κ B está relacionada com a transcrição dessas citocinas pró-inflamatórias, decidimos avaliar por Western Blotting se a deficiência de T-bet impacta na fosforilação de p-65, a qual denota atividade de NF- κ B. Observamos que

macrófagos deficientes em T-bet possuem uma ligeira redução na quantidade de p-p65, o que não estaria contribuindo para a maior quantidade de IL-12 e TNF α nos macrófagos Tbx21^{-/-} (**Figura 2c**). Hipotetizamos que T-bet se ligue nos promotores de IL-12 e TNF α regulando negativamente a transcrição, para atestar essa hipótese, realizamos a imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com anticorpo anti T-bet, purificamos o DNA que encontrava-se ligado ao T-bet nos BMDMs e realizamos qPCR para os promotores de Il12 e Tnf α . Com isso, observamos que T-bet se liga no promotor desses genes, pois é possível observar o enriquecimento (**Figura 2d**), e, em conjunto com os dados da **Figura 2**, podemos sugerir o mecanismo de repressão da transcrição como forma de modular negativamente a expressão dessas citocinas e controlar o tônus inflamatório dos macrófagos.

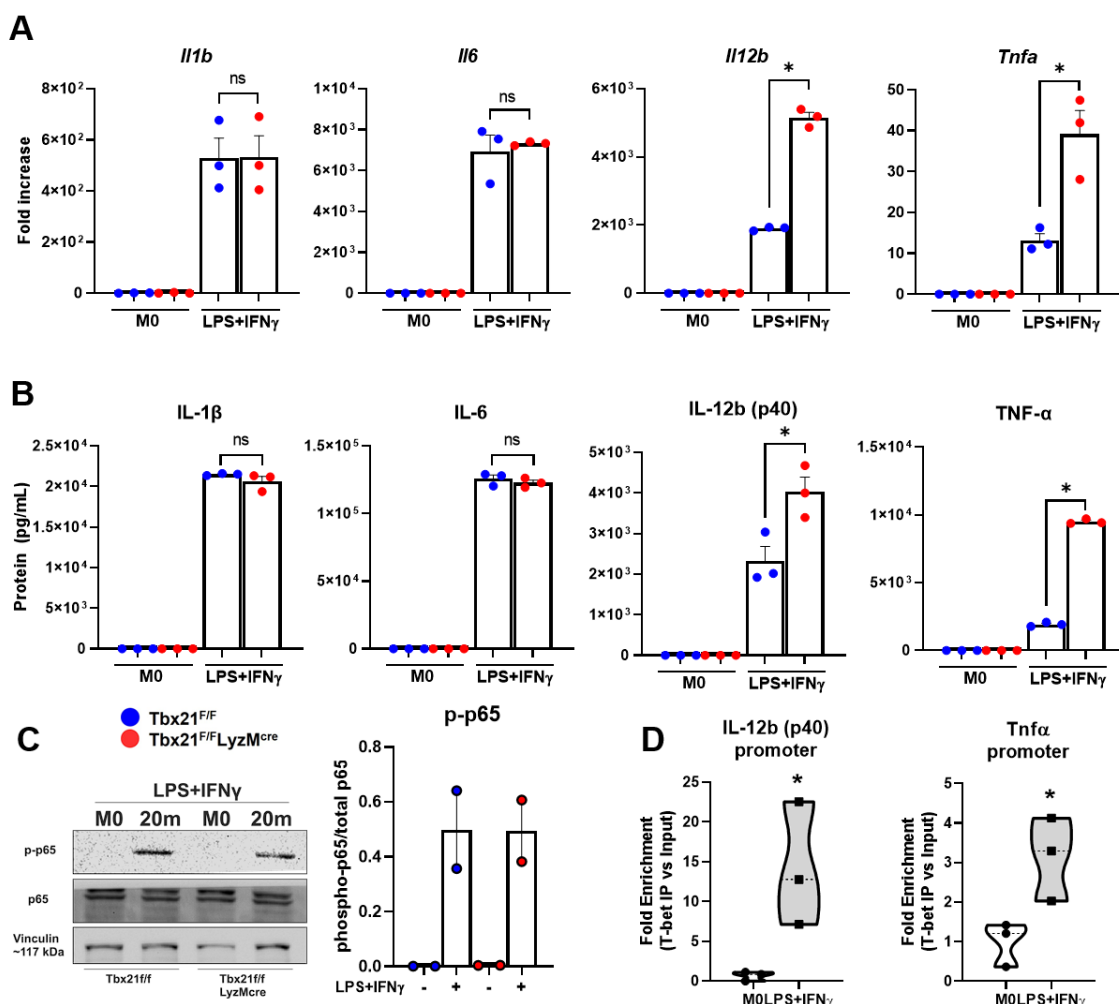


Figura 2. T-bet regula negativamente a expressão de IL-12 e TNF α de Macrófagos inflamatórios.

a) RTqPCR de das citocinas dos BMDM após 6h de estímulo, 1x10⁶ células por poço;
b) ELISA do sobrenadante dos BMDM após 6h de estímulo, 1x10⁶ células por poço;
c) Western Blotting de fosfo-p65, subunidade ativa de NF- κ B, de BMDM, 2x10⁶ células por poço;
d) qPCR dos promotores de IL-12b e Tnf α em BMDM que passaram por ChIP de T-bet, 1x10⁷ células.
Gráficos são representativos de 2 ou 3 experimentos independentes, analisados com teste ANOVA one-way e demonstrados como média $\pm$ SEM.

Tendo em vista que a deficiência de T-bet nos macrófagos fez com que secretassem mais citocinas pró-inflamatórias, buscamos avaliar qual o impacto da deleção de Tbx21 no metabolismo de arginina, o qual dita o balanço pró-inflamatório e reparo. Macrófagos inflamatórios expressam altos níveis de Nos2 e baixos níveis de Arg1 (em prol da produção de NO) (RATH et al., 2014). Neste sentido, cultivamos BMDMs Tbx21^{+/+} e Tbx21^{-/-} e estimulamos com LPS+IFN γ para avaliar a expressão gênica de Nos2 e Arg1.

Observamos que os macrófagos Tbx21^{+/+} expressaram altos níveis de Nos2 sob estímulo inflamatório (Média=5770, SEM=927) comparados com os M0, como esperado. No entanto, macrófagos Tbx21^{-/-} expressaram ainda mais (Média=8964, SEM=479) (**Figura 3a**). A mensuração de NO, através da dosagem de nitrito no sobrenadante corroborou com a maior expressão de Nos2 (Flox Média=15.03, SEM=1.217 / KO Média=45.71, SEM=1.973), com um detalhe para o fato de que LPS sozinho foi capaz de induzir produção de NO em BMDMs Tbx21^{-/-} (Média=6.102, SEM=0.3740) mas não em Tbx21^{+/+} (**Figura 3b**). A Arg1 em macrófagos inflamatórios Tbx21^{+/+} teve uma expressão gênica relativa ao M0 com média de 607 e SEM=146, enquanto os Tbx21^{-/-} tiveram uma expressão ainda menor (Média=272, SEM=9) (**Figura 3c**). Sendo assim, hipotetizamos que fosse possível que T-bet também se ligasse no promotor desses genes, promovendo uma regulação negativa da transcrição de Nos2, assim como de Il12 e Tnf α . No entanto, realizamos ChIP qPCR para o promotor de Nos2, e não observamos enriquecimento da ligação de T-bet (**Figura 3d**). Esses dados demonstram que a deficiência de T-bet em macrófagos resulta em uma maior produção NO, mas com algum mecanismo independente da regulação da expressão de Nos2 ainda a serem desvendados.

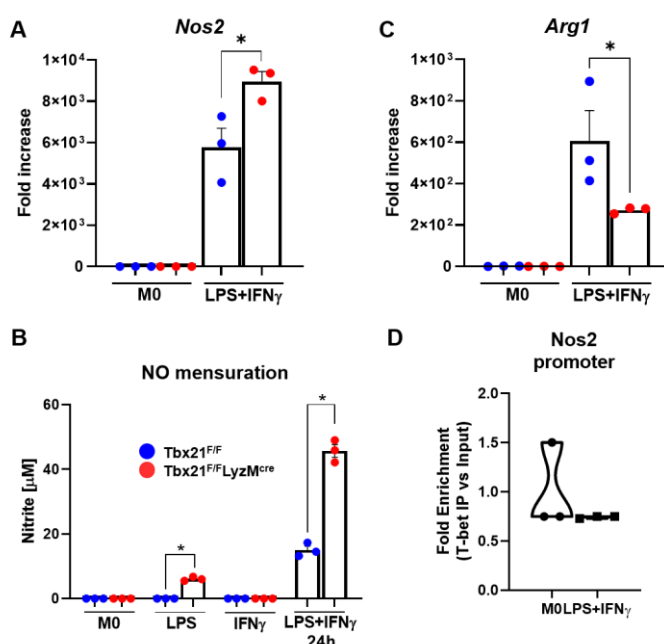


Figura 3. Macrófagos inflamatórios deficientes em T-bet favorecem ainda mais o metabolismo de L-arginina para iNOS e produção de NO.

a) RTqPCR de *Nos2* dos BMDM após 6h de estímulo, 1×10^6 células por poço;

b) Reação de Griess para quantificação de nitrito no sobrenadante dos BMDM, 1×10^6 células/poço;

c) RTqPCR de *Arg1* dos BMDM após 24h de estímulo, 1×10^6 células por poço;

d) ChIP de T-bet em BMDM e qPCR para o promotor de *Nos2*, 1×10^7 células;

Gráficos são representativos de 3 experimentos independentes, analisados com teste ANOVA one-way e demonstrados como média $\pm$ SEM.

Os altos níveis de NO em macrófagos inflamatórios estão relacionados com um perfil mais glicolítico e menos respiratório, modulando o metabolismo celular para assinatura do perfil pró-inflamatório (M1) (PALMIERI et al., 2020). Sendo assim, buscamos avaliar como estava a expressão de genes relacionados à via glicolítica por qPCR, tais como *Slc1a2* (que codifica GLUT1), *Hk2* (que codifica a Hexoquinase2) e *Ldh* (que codifica a Lactato desidrogenase). Observamos que há o aumento da expressão de genes glicolíticos nos macrófagos sob estímulo de LPS+IFN γ , sendo esse aumento ainda maior nos e macrófagos *Tbx21*^{-/-} (Figura 4a).

Ao dosarmos lactato, constatamos quantitativamente que há um aumento no fluxo glicolítico ainda maior nos macrófagos *Tbx21*^{-/-} (Figura 4b). Com isso, decidimos realizar o ensaio glicolítico no Seahorse XFe comparando BMDM *Tbx21*^{+/+} e ^{-/-} sob estímulo de LPS+IFN γ quanto à Taxa de Acidificação Extracelular (ECAR). Observamos que a deficiência de *Tbx21* levou a um aumento na glicólise, na capacidade glicolítica, na reserva glicolítica e na acidificação não relacionada à glicólise (Figura 4c) ao compararmos com os macrófagos *Tbx21*^{+/+}. Juntos, esses dados nos permitem concluir que a deficiência de T-bet em macrófagos não leva

apenas ao aumento desregulado da produção de mediadores inflamatórios como também exacerba o metabolismo glicolítico relacionado ao perfil inflamatório descrito nessas células.

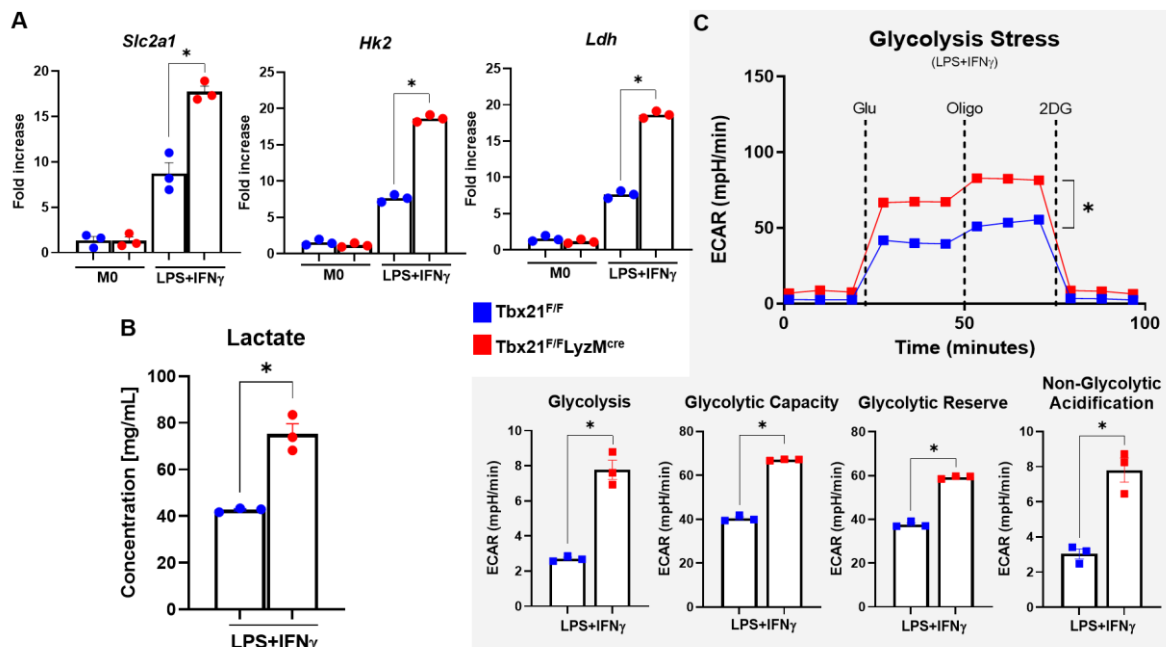


Figura 4. O metabolismo glicolítico de macrófagos é intensificado com a deleção de Tbx21.

a) RT-qPCR do genes que codificam Glut1, Hexoquinase e Lactato desidrogenase em BMDM, 1×10^6 células por poço;
 b) Dosagem de lactato por kit no sobrenadante dos BMDM, 1×10^6 células por poço;
 c) Glyco-Stress Assay no Seahorse XFe, $1,5 \times 10^5$ células por poço na placa de 24 poços.
 Gráficos são representativos de 3 experimentos independentes, analisados com teste ANOVA one-way e demonstrados como média $\pm$ SEM.

Quando observamos o aumento na acidificação não relacionada à glicólise em macrófagos Tbx21^{-/-}, nos questionamos se estes produziram mais espécies reativas de oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), as quais são descritas por acidificar o meio. Neste sentido, cultivamos BMDM Tbx21^{+/+} e ^{-/-}, e mensuramos a produção de H₂O₂ por meio da probe Amplex®, que emite fluorescência para quantificação. Observamos que mesmo em macrófagos M0, a deficiência de Tbx21 aumenta a produção de H₂O₂, sendo essa produção maior frente a estímulo com LPS+IFN γ nos tempos de 1h, 3h ou por 6h (**Figura 5a**).

Nossos dados sugerem que macrófagos deficientes em Tbx21 são mais inflamatórios e possivelmente mais eficazes na destruição de microrganismos fagocitados, devido aos maiores níveis de H₂O₂. Para atestar essa hipótese, realizamos um ensaio de desafio com *Escherichia coli* na proporção 10 bactérias para 1 macrófago por 90 minutos. No final, lavamos os poços 3x com PBS para eliminar

bactérias que não foram fagocitadas, lisamos os macrófagos com Solução Triton 1%, e plaqueamos as bactérias provenientes do interior dos macrófagos em ágar Luria-Bertani (LB), com diluições seriadas para melhor contagem. Observamos que havia menor quantidade de unidades formadoras de colônia no interior de macrófagos *Tbx21*^{-/-} (**Figura 5b**), o que confirma a hipótese de que eles têm a capacidade efetora mais potente *in vitro*. Em busca do mecanismo que responde o aumento de H₂O₂ em macrófagos deficientes em T-bet, iniciamos pela análise da CYBB (NADPH-Oxidase). Cultivamos BMDMs *Tbx21*^{+/+} e *Tbx21*^{-/-} e estimulamos com LPS+IFN γ por 1h, 3h e 6h. Não observamos diferenças na expressão de Nox2/gp91phox entre os grupos Flox e KO (**Figura 5c**). Deste modo, outras fontes de ROS deve contribuir para a elevação de ROS em macrófagos deficientes em *Tbx21*, tais como ROS oriundo dos complexos I e III da mitocôndria, o que merece ser futuramente estudado.

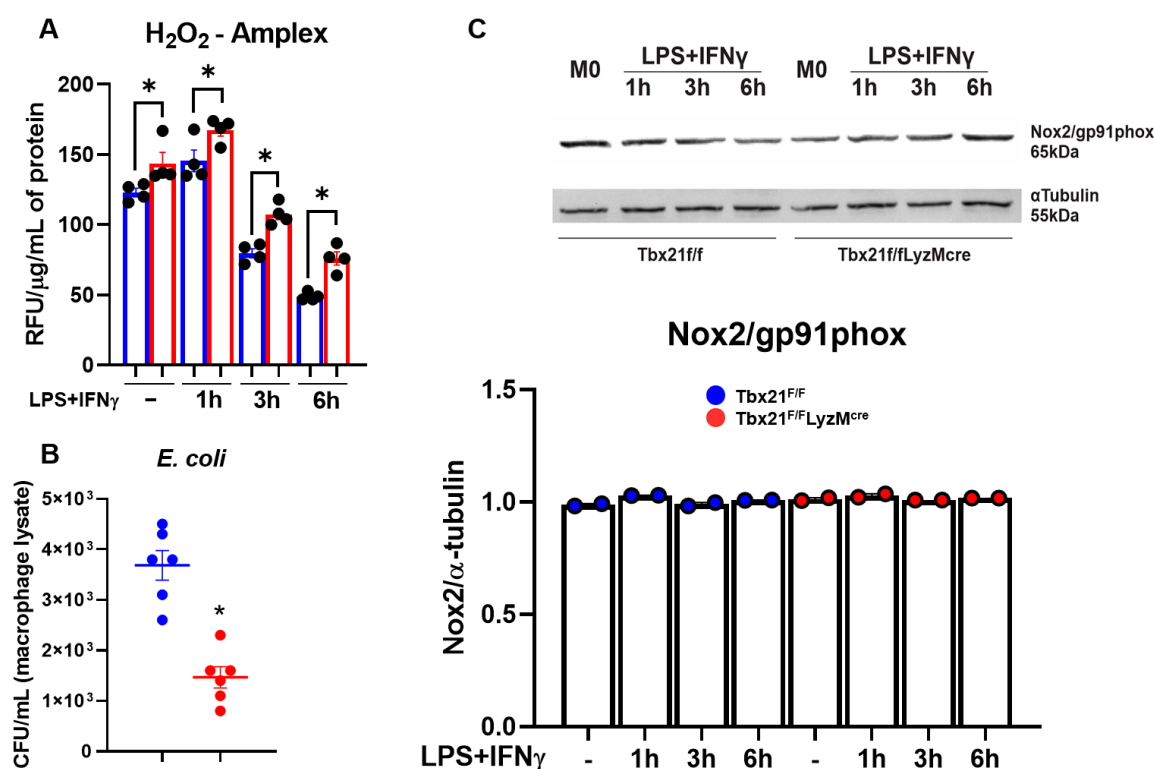


Figura 5. Macrófagos deficientes em T-bet possuem uma capacidade microbicida aumentada *in vitro*, independente de Nox2.

- Ensaio de Amplex para mensuração de H₂O₂ da cultura de BMDM com 3h de estímulo clássico, 2x10⁵ células por poço em placa escura para aferição de fluorescência;
- Ensaio de capacidade microbicida com desafio de *Escherichia coli* sobre os BMDM, 2x10⁵ células por poço, proporção de 10 Bactérias para 1 Macrófago;
- Western Blotting para a subunidade gp91phox da NADPH-Oxidase.

Gráficos são representativos de 2 experimentos independentes, analisados com teste ANOVA one-way e demonstrados como média $\pm$ SEM.

A fim de averiguar o fenótipo *in vivo* de camundongos suficientes e deficientes em T-bet na linhagem mieloide, que os macrófagos fazem parte, utilizamos de um modelo de peritonite séptica com a bactéria *E. coli*. Após 1 dia de infecção, realizamos a citometria de fluxo do lavado peritoneal e não observamos diferenças nas populações de células CD45+ vivas, as quais remetem-se aos leucócitos em geral, bem como células Ly6G+, marcador de neutrófilos, e de células CD11b+ F4/80+, que denotam macrófagos residentes / LPM (**Figura 6a**). Houve o aumento na frequência dessas células no grupo que recebeu *E. coli* intraperitonealmente, no entanto, sem diferenças entre os genótipos de $Tbx21^{ff}$ e $Tbx21^{ff}LyzM^{cre}$ (**Figura 6a**). Também decidimos avaliar a capacidade microbicida dos genótipos *in vivo*, e, para isso, coletamos o baço e o fígado desses animais para semear e analisar o crescimento de CFUs em ágar LB. Com isso, notamos que os animais com a deficiência condicional de T-bet na linhagem mieloide apresentam menores quantidades de bactérias nos dois órgãos analisados, o que significa que foram capazes de eliminar mais bactérias do que o grupo controle $Tbx21^{ff}$ (**Figura 6b**). Esse dado está alinhado com a capacidade microbicida dos macrófagos aumentados quando são deficientes em T-bet e desafiados com *E. coli in vitro*, apresentando maiores níveis de H_2O_2 e NO (**Figuras 3b, 5a, 5b**). Como a carga bacteriana IP de 7×10^8 CFUs é capaz de induzir sepse, buscamos avaliar um marcador sensível de detecção nessa condição patológica. Neste sentido, coletamos o sangue dos animais que foram submetidos ao experimento *in vivo* de peritonite séptica, fracionamos o soro, e realizamos ELISA para IL-1 β , um mediador primário na síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (JIMÉNEZ-SOUSA et al., 2017). Nosso resultado demonstra que não houve detecção de IL-1 β no soro dos animais PBS IP, e no que diz respeito do grupo *E. coli* IP (n=4), os animais $Tbx21^{ff}LyzM^{cre}$ apresentaram níveis mais elevados (Média=219.70, SEM=63.92) do que o grupo sem deleção (Média=362.50, SEM=56.09), $p < 0.0001$.

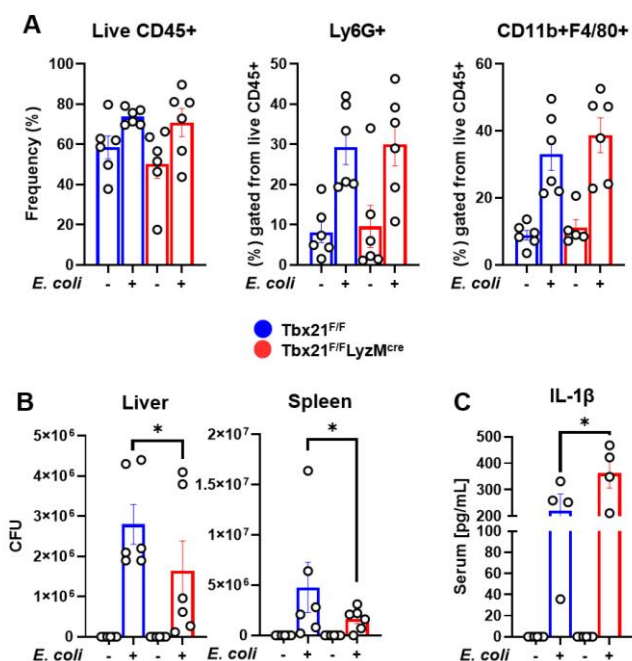


Figura 6. Camundongos deficientes em T-bet possuem uma capacidade microbicida aumentada e maiores níveis de IL-1 β séricos.

- FACS de lavado peritoneal;
- Contagem de CFUs do fígado e do baço;
- ELISA de IL-1 β do soro.

Gráficos são provenientes de um experimento de peritonite séptica com replicatas biológicas n=6 por grupo, exceto c que o n=4(motivo na discussão), analisados com teste ANOVA one-way e demonstrados como média $\pm$ SEM. (artigo cassado plos1 2011)

Juntos, esses resultados sustentam o fato de que a deleção de T-bet na linhagem mieloide causa uma inflamação exacerbada devido o tônus inflamatório aumentados dos macrófagos e das células mieloides em si. Com isso, através do nosso estudo do fenótipo da deleção de Tbx21 em mielócitos, temos a fortes indícios de que T-bet é um fator de transcrição importante para induzir o tônus inflamatório na linhagem linfóide, como vários autores já publicaram, no entanto, quando se trata da linhagem mieloide, T-bet aparenta ter um papel antagônico e protetor contra o agravamento de doenças inflamatórias, de modo a promover o controle da inflamação. Desta maneira, estamos no caminho de uma descoberta que alimentará a literatura acerca do papel de T-bet em macrófagos, haja vista que se tratando de células mieloides, apenas as células dendríticas têm seu papel evidenciado. Descoberta esta que será realizada durante o doutoramento do aluno com a mesma linha de pesquisa em busca dos mecanismos moleculares.

7. DISCUSSÃO

Nosso trabalho é pioneiro em realizar o estudo do papel de T-bet na linhagem mieloide após mais de uma década, e o primeiro a estudar seu papel em macrófagos especificamente. Nossos resultados demonstraram um possível papel para o fator de transcrição T-bet em macrófagos semelhante ao observado em células dendríticas (GARRET et al., 2007) e antagônico ao descrito em células linfoides (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013), que deverá ser melhor explorado quanto aos mecanismos moleculares. Em células T auxiliares, citotóxicas, linfoides inatas e NK, o T-bet tem um papel altamente pró-inflamatório ao promover a transativação do gene de IFN- γ , reprimindo a transcrição de outros fatores como Gata3 e Ror γ T (LIGHVANI et al., 2001). No entanto, quando se trata da linhagem mieloide, um dos poucos estudos que motivou nosso trabalho (GARRET et al., 2007), o qual foi realizado com células dendríticas, demonstrou um papel imunorregulador, trazendo novos olhares para a função de T-bet, diferindo daquela no contexto em que foi descoberto (SZABO et al., 2000).

Demonstramos que a expressão de Tbx21 é aumentada em macrófagos em resposta ao estímulo de IFN γ e intensificado com LPS. O LPS é um agonista de TLR4 que deflagra, dentre outras vias, a cascata de sinalização via Myd88 e TRIF com subsequente ativação de NF- κ B e IRFs (JANEWAY et al., 2020). Entretanto, o LPS individualmente não foi capaz de suprarregular a expressão gênica de Tbx21, tão pouco IL-4, a qual induz a via de JAK/STAT6 (WAQAS et al., 2019). O receptor de IFN γ (IFN γ R), quando recebe seu ligante, ativa a via de JAK/STAT1 (TOLOMEO et al., 2022). Com isso, observamos que o aumento da expressão de Tbx21 em BMDMs depende de STAT1, e futuros estudos deverão se esforçar para averiguar se esse fenótipo também depende de outras STATs, como a 4, induzida pela própria IL-12 secretada pelo macrófago, ou outros fatores. Há um estudo que demonstra que T-bet é rapidamente expresso em células linfoides e mieloides sob estímulo de IFN- γ (LIGHVANI et al., 2001) e outro que demonstra que monócitos e células dendríticas tratados com LPS+IFN γ ativam a via de STAT4 em microambientes Th1 (FRUCTH et al., 2000). Nas células Th1, é bem descrito que a expressão de Tbx21/T-bet ocorre mediante estímulo de IL-12 que induz a via de STAT4 (ABBAS et al., 2021). Com a expressão de T-bet STAT4-dependente, há a transcrição de IFN γ , o qual é secretado e age autocrinamente, ativando a via de STAT1 que causa uma alça de alimentação

positiva na transcrição de Tbx21, sendo o T-bet STAT1 e 4-dependente em células do perfil Th1 (JANEWAY et al., 2020).

Nosso trabalho revelou que macrófagos deficientes em T-bet expressam mais das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- α , sugerindo uma função repressora a nível transcricional que foi confirmada por Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP) e qPCR dos promotores. Não existe dados na literatura descrevendo um potencial supressor de T-bet em IL-12, com isso, somos os primeiros a descrever. Se tratando de TNF α , um estudo que baseou nosso projeto (GARRET et al., 2007) demonstrou que T-bet se liga no promotor de Tnf α em células CD11c⁺ intestinais (denominando-as células dendríticas), reprimindo a transcrição desse gene. Sabe-se que macrófagos também expressam CD11c, não apenas DCs (LUMENG et al., 2007; LU et al., 2022). Garret et al (2007) utilizaram de vetores de superexpressão dose-dependente em RAW264.7, como prova de conceito de que quanto mais T-bet por meio de transdução, menos TNF α expressavam. É importante destacar que a linhagem RAW264.7 não é um modelo para estudo de células dendríticas e sim de macrófagos, pois se trata de uma linhagem tumoral isolada de camundongos BALB/c machos infectados com o vírus da leucemia murina Abelson (TACIAK et al., 2018). Além disso, Garret et al. (2007) usaram um modelo animal para avaliar colite, como experimento *in vivo*, consistindo de animais Rag2^{-/-} comparados com TRUC, os quais possuem dupla deleção sistêmica de Tbx21 (Animal deficiente em T-bet em todas as células do corpo) e Rag2 (Animal não desenvolve linfócitos por falta de recombinação somática dos BCRs e TCRs, não passando pela seleção no baço e no timo, sofrendo apoptose). Neste sentido, a limitação do estudo desses autores está em não haver um estudo com knockout condicional de Tbx21 apenas em células dendríticas, com alguma Cre recombinase específica juntamente com o Tbx21^{fl/fl} com indução alternativa de colite, por exemplo medicamentosa ou séptica. O animal TRUC não apresenta todas as células imunes funcionais, e os resultados apresentam esse viés, já nosso estudo conta com um sistema imune funcional, com a deleção de Tbx21 apenas em células mieloides, as quais estudamos o papel desse fator de transcrição.

A primeira hipótese que tivemos acerca do mecanismo por trás da regulação negativa das citocinas IL-12 e TNF α , seria que na condição de deficiência de T-bet, os macrófagos tivessem a via de NF- κ B com maior atividade. Contudo, não houve alteração na ativação dessa via entre os macrófagos Tbx21^{+/+} e Tbx21^{-/-} sugerindo que a regulação pode ser diretamente transcricional. Conseguimos, então, demonstrar

que T-bet se liga no promotor desses genes dessas citocinas pró-inflamatórias, e, em conjunto com nossos dados de qPCR e ELISA do nível das citocinas, contamos com sólidos fundamentos para sugerir que T-bet reprime a transcrição de *Il12* e *Tnf α* em BMDMs estimulados com LPS+IFN γ .

Determinamos que T-bet modula a expressão gênica de *Nos2* e *Arg1*, favorecendo maior produção de NO nos macrófagos deficientes em *Tbx21* comparado com os controles. É descrito que a expressão de *Nos2* é controlada por STAT1 e a de *Arg1* por STAT6 (TUGAL et al., 2013). Nosso dado nos permite especular que T-bet poderia se ligar no promotor de *Nos2* reprimindo sua transcrição para controlar os níveis de NO, e o tônus inflamatório dessas células, ao passo que se ligam no promotor de *Arg1* favorecendo sua transcrição. Através de CHIP e qPCR constatamos que T-bet não modula os níveis de NO em BMDMs através da ligação direta ao promotor de *Nos2*, mas sim por outro mecanismo que ainda será estudado, como algum feedback de regulação da via de STAT1, por exemplo.

Macrófagos inflamatórios com deleção de *Tbx21* apresentaram um fluxo pela via glicolítica mais acelerado (GALVÁN-PEÑA; O'NEILL, 2014). Linfócitos T auxiliares que expressam T-bet, polarizam-se para o perfil Th1 e adotam um metabolismo mais glicolítico (O'NEILL et al. 2016; KONO et al., 2019). Na condição de suficiência de T-bet, os macrófagos aparentam regular negativamente o fluxo glicolítico, -que é diretamente proporcional ao tônus inflamatório descrito para essas células (TANAHILL et al., 2013; GALVÁN-PEÑA; O'NEILL, 2014)-, comparado aos macrófagos *Tbx21*^{-/-}. Neste sentido, experimentos mais aprofundados são necessários para explicar o mecanismo pelo qual T-bet regula negativamente o metabolismo glicolítico dos macrófagos. A subunidade α do fator induzível por hipóxia (HIF-1 α) é um fator de transcrição conhecido por transcrever genes da via glicolítica e IL-1 β , em ação conjunta com a PKM2 (piruvato kinase M2) (CHENG, 2014; TANAHILL et al., 2013; PALSSON-MCDERMOTT et al., 2015). Uma vez que notamos modulação na expressão de genes glicolíticos alvos de HIF-1 α com em macrófagos *Tbx21*^{-/-}, mas não de IL-1 β , T-bet pode controlar o fluxo glicolítico de maneira HIF1 α -independente, podendo ser através do nível de NO.

Pelo fato de termos observado um aumento de NO nos macrófagos inflamatórios *Tbx21*^{-/-}, isso pode levar a maior envenenamento dos complexos mitocondriais que compõem a cadeia transportadora de elétrons, além da inibição da isocitrato desidrogenase e da piruvato desidrogenase, o que necessita de futuras

investigações (PALMIERI et al., 2020). Sendo assim, a fosforilação oxidativa e respiração mitocondrial ficariam comprometidas, obrigando os macrófagos a adotarem maior perfil glicolítico para sustentar suas necessidades energéticas. Futuros estudos avaliando as mitocôndrias de macrófagos *Tbx21*^{-/-} deverão ser realizados a fim de comprovar a hipótese de que T-bet controla o metabolismo celular dos macrófagos via regulação dos níveis de NO, reprimindo o fluxo exacerbado da glicólise ao diminuir os danos no ciclo de Krebs e nos complexos da ETC. Desta maneira, T-bet será descrito não apenas pela regulação de citocinas e outros fatores de transcrição, mas também a nível metabólico.

A função efetora de células T auxiliares é de orquestrar o perfil de resposta adaptativa mediante estímulo inato (ABBAS et al., 2021). Função parecida é descrita para as ILCs, que possuem similaridade no fenótipo de resposta (Th1-ILC1, Th2-ILC2 e Th17-ILC3, por exemplo) (JANEWAY et al., 2020). Já as células T citotóxicas, NKT e NK possuem função efetora relacionada à vigilância de infecções intracelulares e tumores (MATSUDA et al., 2006; SUTHERLAND et al., 2013; ZHANG et al., 2018). T-bet participa da função efetora de cada uma dessas células, e no presente trabalho, nós observamos que T-bet é importante para regular a capacidade microbida dos macrófagos, uma vez que BMDMs *Tbx21*^{-/-} produzem mais H₂O₂ e matam mais bactérias *in vitro* do que células controle sem deleção pareadas. Essa regulação aparenta ser independente de NADPH-Oxidase (CYBB), o que nos leva a crer que T-bet pode estar modulando os níveis de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (mtROS), o que necessita de comprovação.

Dentro do contexto regulatório de T-bet em macrófagos, é possível inferir que a deleção de *Tbx21* na linhagem mieloide possa potencializar o tônus inflamatório dos macrófagos por aumentar produção de citocinas inflamatórias, NO, metabolismo glicolítico, H₂O₂ e função microbida, o que acarreta em uma inflamação exacerbada. Esse fenótipo é condizente com o descrito por Garret et al (2007) e diferente do encontrado quando há deleção sistêmica de *Tbx21*, pois, neste segundo caso, as células linfoides são incapazes de se polarizar para o perfil Th1 e secretar IFN γ para promover inflamação (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

Nós demonstramos que animais infectados com bactérias intraperitonealmente, no tempo e condições descritos, embora não tenha sido tempo suficiente (seria 2 dias ou mais) para analisar a mudança de populações de LPM para SPM (GHOSH et al., 2009), ainda assim comprovou os nossos achados *in vitro* pelo

fato dos animais $Tbx21^{ff}/LyzM^{cre}$ estarem mais inflamados do que os controles sem deleção. Cabe mencionar que os animais estavam abatidos e com temperatura temporal baixa, o que denota febre nos camundongos, e o agravamento séptico foi confirmado com os níveis de IL-1 β séricos aumentados nos animais KO. Em contraste, quando autores realizam a deleção total de $Tbx21$ em camundongos, os níveis de inflamação e citocinas inflamatórias circulantes diminuem (PRITCHARD; KEDL; HUNTER, 2019). Aliás, nossos animais com KO condicional de $Tbx21$ na linhagem mieloide demonstraram mais resistentes contra as bactérias, o que é observado de forma contrária quando se observa camundongos $Tbx21$ null, que são mais susceptíveis e eliminam menos bactérias, protozoários e fungos (SZABO et al, 2002; PRITCHARD; KEDL; HUNTER, 2019).

As citocinas não foram bem marcadas para o experimento de citometria de fluxo do lavado peritoneal, com isso, será necessário repetição (Além de diminuir a quantidade de CFUs IP para que os camundongos superem 2 ou mais dias infectados para observarmos as populações de macrófagos peritoneais, LPM e SPM sendo moduladas). Porém, é crítico mencionar a dificuldade do nascimento de animais $Tbx21^{ff}/LyzM^{cre}$. As ninhadas têm em média 2 ou 3 animais, enquanto os $Tbx21^{ff}$ apresentam ninhadas normais, com média de 8 filhotes. As fêmeas não são usadas por apresentarem viés hormonal perante inflamação. Neste sentido, a reunião de camundongos machos de mesma idade é prejudicada para montagem dos quatro grupos experimentais com N=6. Contudo entendemos a necessidade de repetir o modelo *in vivo* para futura publicação. Adicionalmente, buscaremos cruzar nossos animais ($Tbx21^{ff}/LyzM^{cre}$) com $Nos2$ -null para explicar o link entre T-bet e o metabolismo de macrófagos modulado via NO. Hipotetizamos que com a deleção adicional de $Nos2$, o fenótipo de aumento do fluxo glicolítico em macrófagos $Tbx21^{-/-}$ será perdido, como prova de conceito. E a inflamação exacerbada *in vivo*, bem como a capacidade microbicida poderão ser prejudicadas, denotando modulação por parte do T-bet nestes aspectos metabólicos, de forma dependente de NO.

Um último ponto a ser mencionado, é o fato de que o papel antagônico de T-bet na linhagem linfóide comparado com o seu papel na linhagem mieloide sugere que houve um momento na evolução do sistema imune em que a mesma proteína (T-bet) foi selecionada para exercer papéis contrastantes a depender do tipo celular, a fim de manter o equilíbrio na resposta imune. Se houvesse deleção de $Tbx21$ na linhagem linfóide, o sistema resultaria em incapacidade de inflamação necessária para lidar com

alguns patógenos fagocitados e se houvesse deleção de Tbx21 na linhagem mieloide, a inflamação seria exacerbada em um contexto patológico. O IFN γ proveniente do T-bet de células linfoides não apenas polariza os macrófagos para o perfil pró-inflamatório (M1), mas também induz a expressão de Tbx21 nessas células mieloides. Nos macrófagos, T-bet regulando os níveis de IL-12 (que induz Tbx21 na linhagem linfóide), o que denota a existência de um eixo de regulação da resposta Th1 muito importante para induzir o processo inflamatório ao mesmo tempo que previne a inflamação aberrante.

8. CONCLUSÕES

- Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) aumentam a expressão de Tbx21 em resposta a IFN γ com pico após 3h de estímulo;
- LPS e IL-4 individualmente não são capazes de aumentar a expressão de Tbx21 em BMDMs;
- BMDMs M0 expressam níveis basais da proteína T-bet, e, quando estimulados classicamente, aumentam gradualmente a expressão proteica até 12h após estímulo, o que decai após 24h;
- T-bet não modula os níveis de IL-1 β e IL-6 em BMDMs sob estímulo de LPS+IFN γ ;
- BMDMs deficientes para o fator de transcrição T-bet apresentam maiores níveis de IL-12, TNF α , Nos2, NO e H₂O₂;
- T-bet se liga nos promotores dos genes de IL-12 e TNF α para regular a transcrição;
- A deficiência de T-bet aumenta o fluxo glicolítico de BMDMs estimulados com LPS+IFN γ ;
- A capacidade microbicida dos BMDMs é aumentada *in vitro* na condição de knockout de Tbx21.
- Animais com deleção condicional de Tbx21 na linhagem mieloide apresentam maior capacidade microbicida, no entanto, encontram-se mais inflamados, com níveis elevados de IL-1 β séricos ao se comparar com animais sem deleção em modelo de peritonite séptica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K. et al. **Cellular and molecular immunology**. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2021.
- ARANGO DUQUE, Guillermo; DESCOTEAUX, Albert. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 491, 2014.
- ARTYOMOV, Maxim N.; SERGUSHICHEV, Alexey; SCHILLING, Joel D. Integrating immunometabolism and macrophage diversity. **Academic Press**, 2016. p. 417-424.
- BENDELAC, Albert et al. The biology of NKT cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 297-336, 2007.
- BEUTLER, Bruce. Innate immunity: an overview. **Molecular immunology**, v. 40, n. 12, p. 845-859, 2004.
- BEUTLER, Bruce. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 1, p. 20-26, 2000.
- BONILLA, Francisco A.; OETTGEN, Hans C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S33-S40, 2010.
- CASTOLDI, A. et al. The macrophage switch in obesity development. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 637, 2016.
- CATRYSSSE, Leen; VAN LOO, Geert. Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. **Cellular immunology**, v. 330, p. 114-119, 2018.
- CHENG, Shih-Chin. mediated aerobic glycolysis as metabolic basis- α mTOR-and HIF-1. **Science**, v. 1250684, p. 345, 2014.
- CHO, Hyeseon; KELSALL, Brian L. The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis, and inflammation. **Immunological reviews**, v. 260, n. 1, p. 145-167, 2014.
- CLASSEN, A.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Macrophage Activation: Classical Vs.

Alternative. **Methods in Molecular Biology**, v. 531, n. 1, p. 29–43, 2009.

DE BACK, Djuna Z. et al. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 9, 2014.

EPELMAN, Slava; LAVINE, Kory J.; RANDOLPH, Gwendalyn J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 2014.

EVAVOLD, Charles L. et al. Control of gasdermin D oligomerization and pyroptosis by the Regulator-Rag-mTORC1 pathway. **Cell**, v. 184, n. 17, p. 4495-4511. e19, 2021.

FRUCHT, David M. et al. Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4659-4664, 2000.

GALVÁN-PEÑA, S.; O'NEILL, L. A. J. Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 420, p. 1–6, 2 set. 2014.

GARRETT, Wendy S. et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. **Cell**, v. 131, n. 1, p. 33-45, 2007.

EGINAT, Jens et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 630, 2014.

GENG, Jing *et al.* Kinases Mst1 and Mst2 positively regulate phagocytic induction of reactive oxygen species and bactericidal activity. **Nature immunology**, v. 16, n. 11, p. 1142-1152, 2015.

GORDON, Siamon. The macrophage: past, present and future. *European journal of immunology*, v. 37, n. S1, p. S9-S17, 2007.

HOEBE, et al. The interface between innate and adaptive immunity. **Nature immunology**, v. 5, n. 10, p. 971-974, 2004.

JABLONSKI, K. A. *et al.* Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145342, 2015.

JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 9th ed. New York: Garland Science, 2020.

JHA, A. K. *et al.* Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 419–430, mar. 2015.

JIMÉNEZ-SOUSA, María Ángeles *et al.* IL-1B rs16944 polymorphism is related to septic shock and death. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 1, p. 53-62, 2017.

KANHERE, A. *et al.* T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 1268, 11 jan. 2012.

KAPETANOVIC, R. *et al.* Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages. **Immunology and cell biology**, v. 98, n. 7, p. 528-539, 2020.

KIM, Young Keun; SHIN, Jeon-Soo; NAHM, Moon H. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. **Yonsei medical journal**, v. 57, n. 1, p. 5-14, 2016.

KONO, Michihito *et al.* Pyruvate kinase M2 is requisite for Th1 and Th17 differentiation. **JCI insight**, v. 4, n. 12, 2019.

KRIEG, Arthur M.; VOLLMER, Jörg. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. **Immunological reviews**, v. 220, n. 1, p. 251-269, 2007.

LA GRUTA, Nicole L. *et al.* Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 7, p. 467-478, 2018.

LAZAREVIC, Vanja; GLIMCHER, Laurie H.; LORD, Graham M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 11, p. 777-789, 2013.

LIGHVANI, Andre A. *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. **PNAS**, v. 98, n. 26, p. 15137-15142, 2001.

LÍNDEZ, A. I.; REITH, W. Arginine-dependent immune responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 13, p. 5303-5324, 2021.

LÓPEZ-YGLESÍAS, Américo H. et al. T-bet-dependent ILC1-and NK cell-derived IFN- γ mediates cDC1-dependent host resistance against *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1008299, 2021.

LU, Lu et al. Differential expression of CD11c defines two types of tissue-resident macrophages with different origins in steady-state salivary glands. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2022.

MA, Zhe; DAMANIA, Blossom. The cGAS-STING defense pathway and its counteraction by viruses. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 2, p. 150-158, 2016.

MARSHALL, Jean S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. 2, p. 1-10, 2018.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 451–483, abr. 2009.

MATSUDA, Jennifer L. et al. T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of V α 14i NKT cells. **Blood**, v. 107, n. 7, p. 2797-2805, 2006.

MCGETTRICK, Anne F.; O'NEILL, Luke AJ. The role of HIF in immunity and inflammation. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 524-536, 2020.

MEISER, J. *et al.* Pro-inflammatory Macrophages Sustain Pyruvate Oxidation through Pyruvate Dehydrogenase for the Synthesis of Itaconate and to Enable Cytokine Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 8, p. 3932–3946, fev. 2016.

METCHNIKOFF, Elie. **Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren**. A. Hölder, 1883.

MILLS, E. L. *et al.* Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 457–470, out. 2016.

MISHAL, Rabia; LUNA-ARIAS, Juan Pedro. Role of the TATA-box binding protein (TBP) and associated family members in transcription regulation. **Gene**, p. 146581,

2022.

MOSKALIK, Aneta; NIDERLA-BIELIŃSKA, Justyna; RATAJSKA, Anna. Multiple roles of cardiac macrophages in heart homeostasis and failure. **Heart Failure Reviews**, v. 27, n. 4, p. 1413-1430, 2022.

NOE, J. T. *et al.* Lactate supports a metabolic-epigenetic link in macrophage polarization. **Science advances**, v. 7, n. 46, p. eabi8602, 2021.

O'NEILL, L. A. J.; ARTYOMOV, M. N. Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 5, p. 273–281, 31 maio 2019.

O'NEILL, L. A. J.; PEARCE, E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 1, p. 15–23, 11 jan. 2016.

OISHI, Shinji *et al.* M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. **Immunology**, v. 149, n. 3, p. 320-328, 2016.

OKUMURA, Ryu; TAKEDA, Kiyoshi. Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 92, n. 9, p. 423-435, 2016.

O'NEILL, Luke AJ; KISHTON, Rigel J.; RATHMELL, Jeff. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553-565, 2016.

PALSSON-MCDERMOTT, Eva M. *et al.* Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. **Cell metabolism**, v. 21, n. 1, p. 65-80, 2015.

PEARCE, E. L. *et al.* Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. **Science**, v. 342, n. 6155, p. 12424541–124245411, 11 out. 2013.

PLATNICH, Jaye M.; MURUVE, Daniel A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 670, p. 4-14, 2019.

PLÜDDEMANN, Annette; MUKHOPADHYAY, Subhankar; GORDON, Siamon. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 11-24, 2011.

PRITCHARD, Gretchen Harms; KEDL, Ross M.; HUNTER, Christopher A. The evolving role of T-bet in resistance to infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 6, p. 398-410, 2019.

PRITCHARD, Gretchen Harms; KEDL, Ross M.; HUNTER, Christopher A. The evolving role of T-bet in resistance to infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 6, p. 398-410, 2019.

RATH, M. *et al.* Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 532, p. 1–10, 27 out. 2014.

RAVINDRAN, Rajesh et al. Expression of T-bet by CD4 T cells is essential for resistance to Salmonella infection. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 7, p. 4603-4610, 2005.

REHWINKEL, Jan; GACK, Michaela U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 537-551, 2020.

RIEDEL, Stefan. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. In: **Baylor University Medical Center Proceedings**. Taylor & Francis, 2005. p. 21-25.

SATO, Kaoru. Effects of microglia on neurogenesis. **Glia**, v. 63, n. 8, p. 1394-1405, 2015.

SERASANAMBATI, Mamatha; CHILAKAPATI, Shanmuga Reddy. Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases-a review. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 368-87, 2016.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.

SMITH, Kendall A. Edward Jenner and the small pox vaccine. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 21, 2011.

SUTHERLAND, Andrew PR et al. IL-21 promotes CD8⁺ CTL activity via the transcription factor T-bet. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 3977-3984, 2013.

SZABO, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-669, 2000.

SZABO, Susanne J. et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. **Science**, v. 295, n. 5553, p. 338-342, 2002.

TACIAK, Bartłomiej et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198943, 2018.

TAKEMOTO, Naofumi et al. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 11, p. 7515-7519, 2006.

TAKEUCHI, Arata; SAITO, Takashi. CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4⁺ T cells, their differentiation and function. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 194, 2017.

TANNAHILL, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 24 abr. 2013.

TAYLOR, Philip R. et al. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 23, n. 1, p. 901-944, 2005.

THEBAULT, Pamela et al. The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 5, p. 3099-3108, 2009.

THERET, Marine; MOUNIER, Remi; ROSSI, Fabio. The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration. **Development**, v. 146, n. 9, p. dev156000, 2019.

TOLOMEO, Manlio; CAVALLI, Andrea; CASCIO, Antonio. STAT1 and its crucial role in the control of viral infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4095, 2022.

TOWNSEND, Michael J. et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and V α 14i NKT cells. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 477-494, 2004.

VAN DEN BOSSCHE, Jan et al. Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages. **Cell reports**, v. 17, n. 3, p. 684-696, 2016.

VATS, D. *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 13–24, jul. 2006.

WAQAS, Syed F. Hassnain; AMPEM, Grace; RÖSZER, Tamás. Analysis of IL-4/STAT6 signaling in macrophages. **Nuclear Receptors: Methods and Experimental Protocols**, p. 211-224, 2019.

WEST, A. P. *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 476–480, 27 abr. 2011.

WU, Ming-Yue; LU, Jia-Hong. Autophagy and macrophage functions: inflammatory response and phagocytosis. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 70, 2019.

ZHANG, Jiang et al. T-bet and Eomes govern differentiation and function of mouse and human NK cells and ILC1. **European journal of immunology**, v. 48, n. 5, p. 738-750, 2018.

ZHANG, W.; YANG, S. Y. Cloning and characterization of a new member of the T-box gene family. **Genomics**, v. 70, n. 1, p. 41-48, 2000.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação Ética para realização da presente pesquisa.

CERTEUA n° 214/2022

INTRANET IB



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo do papel de T-bet em macrófagos no modelo de sepse**, registrada com o n° **6039-1/2022**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira e Webster Leonardo Guimarães da Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI N° 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO N° 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/06/2022**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2022 a 31/07/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/06/2022 a 31/07/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129P2-Lyz2tm1(cre)lfo/J
No. de animais:	2
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	1 Machos 1 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129-Tbx21tm2Srnrl/J
No. de animais:	2
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	1 Machos 1 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / T-bet KO condicional em células mielóides
No. de animais:	38
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	28 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129-Tbx21tm2Srnrl/J
No. de animais:	38
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	28 Machos 10 Fêmeas
Origem:	Biotério de Camundongos do DGEMI e DBBT/IB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Camundongos do DGEMI e DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **28 de julho de 2022**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 29/07/2022, às 14:26 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 29/07/2022, às 08:42 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
C499B274 7C7440DA 8D5BEB6C 2EFA2D6F



Anexo 2. Declaração dos direitos autorais.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos à publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam em minha Dissertação de Mestrado, intitulada **Estudo do papel de T-bet em macrófagos no modelo de sepse**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de fevereiro de 2023.

Assinatura: Webster L. G. Costa

Nome do Autor: Webster Leonardo Guimarães da Costa

RG n.º: 671711672 SSP SP

Assinatura: Pedro Manoel Mendes de M. Vieira

Nome do Orientador: Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

RG n.º: 2087924 SSP DF