

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

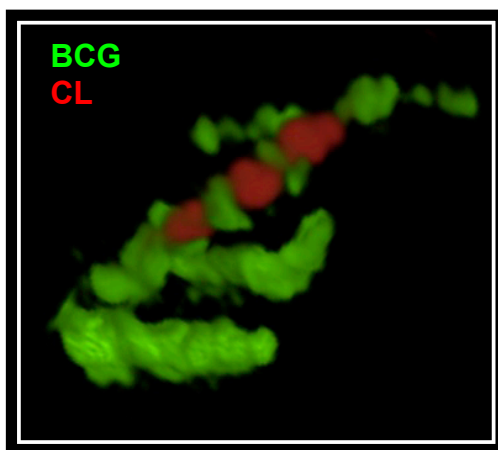
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

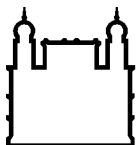
Biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção por *M. bovis* BCG e o seu papel na modulação da via endocítica em macrófagos

Natália Roberta Roque



**Orientador (es): Dra. Patrícia Torres Bozza
Dra. Heloisa D'Ávila**

**RIO DE JANEIRO
Novembro, 2015**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NATALIA ROBERTA ROQUE

Biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção por *M. bovis* BCG e o seu papel na modulação da via endocítica em macrófagos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Dra. Patrícia Torres Bozza
Dra. Heloisa D'Ávila

RIO DE JANEIRO
Novembro, 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

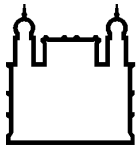
R786 Roque, Natalia Roberta

Biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção por *M. bovis* BCG e o seu papel na modulação da via endocítica em macrófagos / Natalia Roberta Roque. – Rio de Janeiro, 2015.
xix, 99 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.
Bibliografia: f. 87-99

1. Corpúsculos lipídicos. 2. Micobactéria. 3. BCG. 4. Via endocítica.
I. Título.

CDD 571.9457



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Natália Roberta Roque

Biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção por *M. bovis* BCG e o seu papel na modulação da via endocítica em macrófagos

ORIENTADOR (ES): Dra. Patrícia Torres Bozza
Dra. Heloisa D'Ávila

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Leila Mendonça Lima

Prof. Dra. Vania Luiza Deperon Bonato

Prof. Dra. Maria das Graças M. O. Henriques

Prof. Dra. Patrícia Elaine Almeida

Prof. Dra. Katherine Antunes Mattos

Rio de Janeiro, 10 de novembro de 2015

“Dedico essa tese ao Nicolas, força motriz
que me faz querer ser uma pessoa melhor
e mais dedicada a cada dia”.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Dra. Patrícia Torres Bozza, obrigada pela orientação e incentivo no desenvolvimento desse projeto. Obrigada por todo o apoio e confiança renovados durante esses anos.

À minha co-orientadora e amiga Dra. Heloísa D'Ávila, obrigada por estar disponível sempre que necessário. Obrigada por ter me iniciado na carreira científica. A sua orientação, amizade e carinho foram essenciais.

À Dra. Clarissa Maya- Monteiro, obrigado por se importar. Seu olhar atencioso foi muito importante para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Dr. Hugo Caire, Dr. Valber e Dr. Fernando pelo incentivo à carreira, pelas conversas e pela contribuição nessa tese.

A Dra. Adriana Ribeiro e ao Dr. Thiago Moreno pelas importantes discussões e colocações nesse projeto.

À Dra. Adriana Vallochi e Dra. Cecília pela conversas e troca de experiências.

À amiga Rachel e Flora por serem sempre tão positivas, pelo apoio e momentos de diversão.

Ao Dr. Jens Rietdorf obrigada pelas discussões de resultados e desenvolvimento do programa para as análises pelo ImageJ.

À Dra. Rossana C. N. Melo pelo processamento e análise das imagens de microscopia eletrônica.

À Dra. Maria Cristina da Silva Lourenço obrigada pela ajuda com as UFCs.

À pessoas muito especiais que não fazem mais parte do laboratório mas participaram de maneira significativa na minha formação Kelly, Dri Abreu, Dani e Pat Elaine. Obrigada por terem me ensinado tanto.

À amiga Rose pelo carinho e dedicação com todos. A sua ajuda foi fundamental nos momentos tensos.

Ao Edson, pelas gargalhadas, caronas e dosagens.

À amiga Sally, obrigada por toda ajuda e pelos eventuais choques de realidade sempre necessários.

À amiga Fátima, obrigada pelas conversas, troca de experiências e colaborações.

À amiga Roberta, obrigada por me dar suporte no momento mais especial da minha vida. Ter tido alguém com quem contar experimentalmente foi fundamental.

À amiga Nara, obrigada por permitir que eu participe da sua vida e por ser tão boa ouvinte. Você é uma inspiração de força e dedicação.

À amiga Gi, por proporcionar vários momentos de diversão e rir junto comigo nos momentos tensos.

À amiga Gláucia, pelas discussões de resultados e pelos eventuais helps experimentais.

À todos do laboratório de Imunofarmacologia, Carol, Lívia, Vinicius, Juliana, Ester, Léo, Jéssica, Lohana, Ana Paula, Alan, Luciana, Surrage, Eugênio, Carla, Isabel, Diogo, Mariana, Nathalia, Alessandra, Isaclaudia, André, Cassiano, Tati Maron, Pat Reis, Ligia, Cada um da sua maneira contribuiu para a minha formação durante esse período.

As secretárias do departamento e da pós-graduação Dani, Julimar, Andréa, Tati e Fernanda pela ajuda sempre que necessário.

Aos órgãos de apoio científico CNPq, FIOCRUZ, FAPERJ.

À amiga Sophie, pessoa querida que entende e compartilha as alegrias e tristezas da vida acadêmica. É sempre muito bom conversar com você.

Ao meus compadres Silvia e Eduardo, irmãos de coração. Obrigada pelas discussões de artigos e pelos conselhos, ou por simplesmente estarem sempre aqui (a distância nunca foi real).

À Dra. Maria de Fátima, obrigada por toda atenção e ajuda prestada ao Nicolas (que não foram poucas).

Aos Tios Adilson e Zeta, por estimular sempre o estudo e a carreira acadêmica. Pessoas as quais me espelho para continuar em constante evolução.

Ao Tio Wilson, pelo papel paternal tantas vezes representada. Obrigada por estar sempre disponível para mim. Conversar com você sempre faz a diferença.

À Tia Anita, por todo carinho e apoio dados a mim e ao Nicolas.

A Vânia e Luiz, obrigada pelo apoio e incentivo durante esses anos.

À minha mãe, pelo seu amor incondicional. O seu suporte foi essencial para que esse dia chegasse.

Ao Eduardo, meu companheiro nessa jornada. Sem você com certeza essa etapa não se completaria. Obrigada por compreender as minhas ausências e apoiar a minha carreira.

Ao meu filho Nicolas, obrigada por ter entrado em nossas vidas. Agora tudo faz sentido.

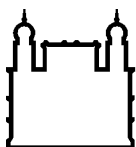
À Deus, obrigada simplesmente por tudo!

“Experience is one thing you can’t get for nothing.”
- Oscar Wilde

SUMÁRIO

1) Introdução	1
1.1) Tuberculose	2
1.1.1) Epidemiologia e aspectos gerais	2
1.1.2) Imunopatogenia: Imunidade inata e adaptativa	5
1.1.3) Mecanismos de subversão da resposta imune do hospedeiro	12
1.1.4) Corpúsculos lipídicos	20
2) Objetivos	29
2.1) Objetivo geral	30
2.2) Objetivos específicos	30
3) Metodologia	31
3.1) Animais	32
3.2) <i>Mycobacterium bovis</i> , BCG	32
3.3) Pleurisia induzida por BCG	32
3.4) Contagem de Leucócitos totais	33
3.5) Revestimento das partículas de látex fluorescentes com PIM e LAM	33
3.6) Cultura de macrófagos derivados de medula óssea e estímulo <i>in vitro</i>	34
3.7) Estimulação <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais	35
3.8) Dosagem PGE ₂ (Ensaio Imuno enzimático –EIA)	36
3.9) Dosagem IL-10 e TNF- α (Multiplex)	36
3.10) Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	37
3.11) Análises por fluorescência	37
3.11.1) Imunolocalização de Rab5, Rab7, RILP e LAM em macrófagos pleurais	37
3.11.2) Marcação de bactérias vivas e mortas	38
3.12) Contagem de Corpúsculos Lipídicos	38
3.13) Quantificação da proximidade entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos	39
3.14) Microscopia eletrônica	39
3.15) Aquisição das imagens	41
3.16) Análise Estatística	41
4) Resultados	42

4.1) A infecção pleural por BCG induz aproximação de fagossomas com os corpúsculos lipídicos de macrófagos após 24 h de infecção	43
4.2) A viabilidade bacteriana não é importante para que haja a associação do fagossoma com os corpúsculos lipídicos	46
4.3) Fagossomas contendo partículas de látex revestidas com lipídios micobacterianos, LAM e PIM, foram observadas próximas dos corpúsculos lipídicos.....	47
4.4) A proteína Rab7, mas não a Rab5 está co-localizada com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção in vivo.....	53
4.5) A proteína Rab7 presente nos corpúsculos lipídicos está na sua forma ativa..	56
4.6) Inibidor da proteína Rab7, CID 1067700, inibe a aproximação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos	58
4.7) Durante a infecção por ocorre o tráfego de lipídios bacterianos e do hospedeiro entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas	61
4.8) Indução da formação dos corpúsculos lipídicos é um fenômeno altamente regulado e não depende da fagocitose	64
4.9) O inibidor de ácido graxo sintase (C75), inibe a formação de corpúsculos lipídicos e está envolvido na modulação de mediadores inflamatórios e citocinas	66
4.10) A inibição da formação dos corpúsculos lipídicos pelo C75, está envolvida com a sobrevivência bacteriana.....	69
5) Discussão	71
6) Conclusões.....	84
7) Referências Bibliográficas.....	86



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção por *M. bovis* BCG e o seu papel na modulação da via endocítica em macrófagos

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Natália Roberta Roque

Os corpúsculos lipídicos (CL), também chamados de gotas lipídicas, são organelas ricas em lipídios que tem sido frequentemente associadas às condições inflamatórias e infecciosas. O aumento no número e tamanho dessas organelas é um fenômeno bem regulado que tem sido associado com a persistência bacteriana. Nesse trabalho, nós investigamos os mecanismos pelos quais os CL induzidos pela micobactéria podem atuar em favor da infecção. Por microscopia eletrônica de transmissão (MET), nós mostramos que os CLs marcados com ADRP interagem com fagossomas durante a infecção por *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin, (BCG) *in vivo*. Por microscopia de fluorescência, nós observamos que a interação entre os CL e os fagossomas não é dependente da viabilidade bacteriana. Nós mostramos uma maior frequência de CLs em proximidade com os fagossomas contendo partículas de látex revestidas com Lipoarabinomanana (LAM) ou Fosfatidilinositol manosídeo (PIM) de *M. tuberculosis* (*M.tb*), mas não com as partículas de látex não revestidas, sugerindo um mecanismo de recrutamento de CL para próximo dos fagossomas. Partículas de látex revestidas com LAM interagem com os CL, 102,60% mais do que as partículas de látex não revestidas em macrófagos carregados com ácido oleico. Além disso, nós observamos que a Rab7, uma importante GTPase endocítica e, marcador de endossoma tardio, assim como seu efetor RILP, mas não a Rab5 co-localizou com os CL marcados por Bodipy[®] induzidos pela infecção com BCG em 24 h. Por MET, nós observamos a imunolocalização da Rab7 co-localizada com os CL no local de interação com um fagossoma infectado durante a infecção experimental por BCG *in vivo*. De maneira interessante, nós observamos uma diminuição na aproximação das partículas revestidas com LAM e os CL após os macrófagos terem sido tratados com CID1067700, um inibidor competitivo da Rab7. Nós observamos que o BCG e o LAM, mas não, a micobactéria não patogênica *M. smegmatis*, ou partículas de látex não revestidas, foram capazes de induzir a formação de CL em macrófagos *in vitro*. O papel dos CL na modulação da infecção micobacterianas foi avaliado pelo tratamento com C75 (inibidor de ácido graxo sintase) que modulou negativamente a formação dos CL e a síntese de PGE₂ induzidos por BCG. Além disso, esse tratamento foi capaz de aumentar o TNF- α enquanto inibiu a produção de IL-10 e a sobrevivência micobacteriana, determinado por contagens de UFC. Esses resultados sugerem que a interação dos CL-fagossomas é um fenômeno bem regulado e modulado pelo componente da parede micobacteriana, LAM e dependente de Rab7. O sequestro da Rab7 ativa para os CL pode permitir a interação com o fagossomas e favorecer a troca de lipídios atuando como nutrientes para sobrevivência micobacteriana. Além disso, nossos resultados indicam que

os CL modulam mediadores pro- e anti- inflamatórios em favor da replicação e sobrevivência do BCG. Assim, sugerindo que a inibição da formação e/ou função dos corpúsculos lipídicos como um alvo promissor para intervenções terapêuticas na infecção micobacteriana.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Biogenesis of lipid bodies during *M. bovis* BCG infection and their role in endocytic pathway modulation in macrophages

Abstract

TESE DE DOUTORADO

Natália Roberta Roque

Lipid bodies (LB) also named lipid droplets, are lipid rich organelles that have been often associated with inflammatory and infectious conditions. The increase in number and size of these organelles is a well-regulated phenomenon that have been involved with bacterial persistence. In this work, we investigated the mechanisms by which mycobacteria induced -lipid bodies may act in favor of infection. By Transmission electron microscopy (TEM), we showed ADRP-marked LB interacting with phagosomes during *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin, (BCG) infection *in vivo*. By fluorescence microscopy we observed that the interaction between LB and phagosomes is not dependent of bacterial viability. We showed an increase in the frequency of LB proximity with phagosomes containing beads coated with Lipoarabinomannan (LAM) or Phosphatidylinositol mannoside (PIM) from *M. tb*, but not with non-coated beads suggesting a recruitment mechanism for LB-phagosome proximity. LAM coated beads interacts with LB 102,60% more than non-coated beads in macrophages loaded with oleic acid. Moreover, we observed that Rab7, an important endocytic GTPase and late endosome marker, as well as its effector RILP but not Rab5 was co-localized with LB stained with Bodipy[®] induced by BCG infection at 24 h. By MET, we observed an immunolocalization of Rab7 co-localized with LB in the site of interaction with an infected phagosome during the experimental BCG infection *in vivo*. Interestingly, we observed a decrease of LAM coated bead and LB apposition after macrophages were treated with CID1067700, a competitive inhibitor of Rab7. We observed that BCG and LAM, but not nonpathogenic mycobacteria *M. smegmatis* or non-coated latex beads, was able to induce LB formation in macrophages *in vitro*. Next, we evaluated the role of LB modulation on mycobacterial infection. Treatment with C75 (fatty acid synthase inhibitor) down-regulated LB formation and PGE₂ synthesis induced by BCG. Also, these treatment were able to enhance TNF- α while inhibit the IL-10 production and down-modulation of mycobacterial survival and growth assessed by CFU count. These results suggest that LB-phagosome interaction are well-regulated phenomena modulated by mycobacteria cell wall component, LAM and dependent on Rab7. The hijack of active Rab7 to LB may enable the interaction with phagosome, and may favour the exchange of lipids acting as nutrients to mycobacterial survival. In addition, our results indicate that LB modulate pro- and anti-inflammatory mediators in favor of BCG survival and replication. Thus suggesting that inhibition of LB formation and/or function as a promising target for therapeutic interventions in mycobacterial infection.

Lista de Abreviações

AA	Ácido araquidônico
ADRP	Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BCG	Bacilo Calmett e Guérin
CC	Receptor de quimiocina CC
CD	Grupo de diferenciação
CFP-10	<i>Culture filtrate protein 10 kDa</i>
COX	Cicloxigenase
CR	Receptor do complemento
DAG	Diacilglicerol
EEA1	Proteína do antígeno-1 do endossoma primário
<i>eis</i>	<i>enhances intracellular bacterial survival</i>
ESAT-6	<i>Early secreted antigenic protein-6</i>
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias para granulócitos/monócitos
GTP	Trifosfato de guanosina
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
IFN- γ	Interferon - gama
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível

IRF	Fator regulatório de interferons
LAM	Lipoarabinomanana
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LM	Lipomanana
LO	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
<i>M. tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1	Macrófagos clássicos
M2	Macrófagos alternativos
ManLam	Lipoarabinomanana com capa de manose
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos/macrófagos
MDR	Multidroga resistente
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Mincle	<i>Macrophage inducible C-type lectin</i>
MIP	Proteína inibitória de monócitos
MOI	Multiplicidade de infecção
MR	Receptor de manose
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADPH	Nicotidamina adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF-κB	Fator nuclear- κB

NK	<i>Natural killer</i>
NLR	<i>NOD-Like receptor</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PAT	Família composta por perilipina, ADRP e TIP47
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PI3P	Fosfatidilinositol 3- fosfato
PIM	Fosfatidilinositol manosídeo
PK	Proteína quinase
PknG	proteína-treonina quinase semelhante a eucarióticos
PL	Fosfolipase
PLIN	Perilipina
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PtpA	Proteína tirosina quinase A
RANTES	Reguladas sob ativação normalmente expressa e secretada por células T
RE	Retículo endoplasmático
RILP	<i>rab-interecting lysosomal protein</i>
RNS	Intermediários reativos de nitrogênio

ROS	Intermediários reativos de oxigênio
STF	Fator de tuberculose solúvel
TACO	<i>Tryptophan-aspartate- containing coat protein</i>
TB	Tuberculose
TDM	Dimicolato trealose
TGF- β	Fator transformador do crescimento
Th	Linfócitos T helper
TIP47	<i>Tail-interacting protein 47kDa</i>
TIR	Receptor citoasmático Toll/IL-1
TIRAP	Proteína adaptadora do receptor Toll/Interleucina-1
TLR	Receptores semelhantes à Toll
TMM	Monomicolato trealose
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
XDR	Extensivamente resistente a drogas

Lista de Esquemas e Figuras

Esquema 1. Painel de distribuição de novos casos de tuberculose no mundo no ano de 2013.	2
Esquema 2. Fisiopatologia da tuberculose.....	5
Esquema 3. Modelo de interação patógeno-hospedeiro na modulação da maturação fagossomal.....	16
Esquema 4. Proteínas encontradas nos corpúsculos lipídicos.....	22
Esquema 5. Modelo proposto para o envolvimento dos corpúsculos lipídicos na sobrevivência bacteriana durante a infecção experimental por <i>M. bovis</i> , BCG.....	83
Figura 1. Interação de corpúsculos lipídicos com o fagossoma durante infecção <i>in vivo</i> por BCG.....	44
Figura 2. Análise por microscopia de super-resolução da associação dos corpúsculos lipídicos com o <i>M. bovis</i> , BCG.....	45
Figura 3. Interação dos fagossomos contendo bactéria viva ou morta com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção <i>in vivo</i>	46
Figura 4. Interação de fagossomas contendo partículas de látex fluorescentes revestidas com componentes da parede micobacteriana com os corpúsculos lipídicos.	49
Figura 5. Avaliação da distância entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos.....	50
Figura 6. Distância entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos.	52
Figura 7. Análise da fagocitose das partículas de látex pelos macrófagos.....	53
Figura 8. Co-localização da proteína Rab7 com corpúsculos lipídicos induzidos por BCG.....	54
Figura 9. Imunomarcagem com partículas de ouro da proteína Rab7 nos corpúsculos lipídicos induzidos pela infecção por BCG <i>in vivo</i>	55
Figura 10. Co-localização da proteína RILP em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG.	57
Figura 11. Análise do papel da proteína Rab7 na associação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos.....	59
Figura 12. Análise do papel da proteína Rab7 na associação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos pré tratados com AO.....	60
Figura 13. LAM de <i>M. bovis</i> BCG co-localiza com corpúsculos lipídicos de macrófagos após 24 h de infecção por BCG <i>in vitro</i>	62
Figura 14. Corpúsculos lipídicos no interior do fagossoma contendo BCG em macrófago pleural.....	63
Figura 15. Indução da formação de corpúsculos lipídicos por LAM de <i>M. tb</i>	65
Figura 16. Inibição da formação de corpúsculos lipídicos e da síntese de PGE ₂ após o pré tratamento com C75 durante a infecção por BCG <i>in vitro</i>	67
Figura 17. Modulação da síntese de e citocinas após o pré tratamento com C75 durante a infecção por BCG <i>in vitro</i>	68

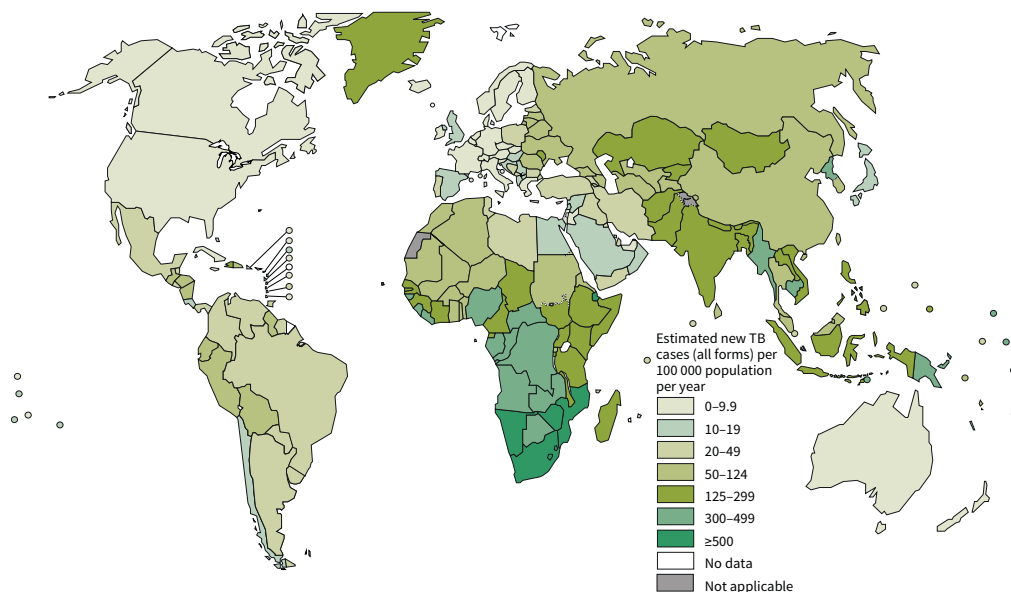
Figura 18. O pré-tratamento com C75 diminui da sobrevivência bacteriana durante a infecção por BCG *in vitro*. 70

1) Introdução

1.1) Tuberculose

1.1.1) Epidemiologia e aspectos gerais

A tuberculose é a segunda maior causa de mortes (1,5 milhões em 2013) por doenças infecciosas em todo mundo podendo ser comparada somente com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (OMS, 2014) (Esquema 1). Nos últimos anos, a tuberculose tem se tornado um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, devido a suscetibilidade aumentada de infecção em pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), sendo responsável por ¼ das mortes de pessoas infectadas com o vírus HIV (Corbett e col., 2003, Corbett e col., 2006).



Esquema 1. Painel de distribuição de novos casos de tuberculose no mundo no ano de 2013. Figura adaptada da Organização Mundial de Saúde: Controle global da tuberculose, vigilância, planejamento e financiamento 2014. (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).

Além do impacto da AIDS, outra importante causa da mortalidade é a existência de cepas resistentes ao tratamento da tuberculose. O tratamento da tuberculose ativa compreende a utilização das drogas rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (Gandhi e col., 2006, Olle-Goig, 2006, Shah e col., 2007, Blaas e col., 2008). Contudo, a OMS (Organização Mundial da Saúde) registrou que 5,3% dos novos casos de tuberculose em 2013 eram de cepas multidroga resistente (MDR), caracterizado por ser resistente a pelo menos duas drogas da primeira linha de tratamento contra a tuberculose, como a isoniazida e rifampicina (OMS). De maneira preocupante, a OMS tem registrado a presença de cepas extensivamente resistente a drogas (XDR) em pelo menos 58 países, que além de serem resistentes as drogas da primeira linha de tratamento, ainda são resistentes a pelo menos 3 das 6 drogas da segunda linha de tratamento (Gandhi e col., 2006, Olle-Goig, 2006, Shah e col., 2007, Blaas e col., 2008). A presença de um número crescente de bactérias resistentes pode ser consequência do uso inadequado do tratamento. Por ser um tratamento longo, podendo durar de 2 a 6 meses, não é incomum o paciente parar a terapia logo após o desaparecimento dos sintomas sem que o tratamento seja finalizado (Gandhi e col., 2006, Olle-Goig, 2006, Raviglione, 2006, Shah e col., 2007, Blaas e col., 2008).

A falta de métodos de prevenção mais eficazes também tem sido levada em consideração como um dos fatores responsáveis pelo crescimento do número de pessoas infectadas pelo bacilo da tuberculose. A vacina Bacillo-Calmette-Guérin (BCG), resultado da atenuação de uma cepa virulenta do *Mycobacterium bovis*, vem sendo largamente utilizada como a principal tentativa de prevenção contra a tuberculose. Contudo, tem sido observado que, embora a vacina ainda seja a melhor maneira de controlar a tuberculose, principalmente em crianças, estudos clínicos sugerem que o BCG é relativamente ineficaz em prevenir a infecção em adultos (Bombardier e Heinemann, 2000).

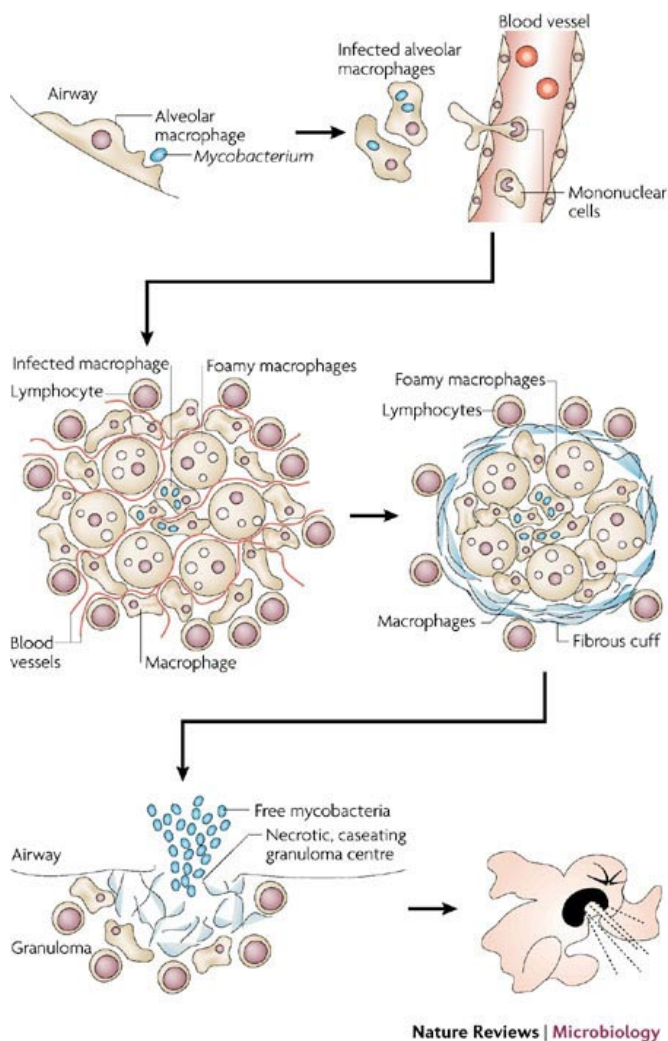
A tuberculose é causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* onde são compreendidas as espécies patogênicas *M. tuberculosis* (*M. tb*), *M. bovis* e *M. africanum* (Frieden e col., 2003). Em geral, o primeiro contato com a micobactéria desencadeia uma resposta inflamatória capaz de combater o agente infeccioso de maneira eficaz, raramente havendo o estabelecimento da tuberculose primária, que ocorre devido a falta de uma resposta imune eficiente. Contudo,

alguns fatores estão envolvidos com o desenvolvimento da doença, como a diabetes, desnutrição, silicose, idade avançada e imunossupressão (Dheda e col., 2015). Dessa forma, o desenvolvimento da doença pode ocorrer devido a uma re-infecção ou quando o indivíduo é portador assintomático, por uma reativação do foco infeccioso primário. Segundo a OMS, entre 5% a 10% das pessoas infectadas pelo bacilo desenvolvem a forma ativa da doença em algum momento da vida.

Um único indivíduo portador da tuberculose ativa não tratado, pode transmitir a doença para 10 a 15 pessoas por ano (OMS, 2014). Dessa forma, novas tentativas de prevenção e medicamentos com novos mecanismos de ação tornaram-se necessários. Enfatizando ainda mais a importância de pesquisas básicas, a fim de investigar as interações entre as micobactérias e as células hospedeiras, uma vez que essa é uma doença de patogenia complexa e que os seus mecanismos moleculares ainda não se encontram bem esclarecidos.

1.1.2) Imunopatogenia: Imunidade inata e adaptativa

Após a chegada do bacilo no trato respiratório, macrófagos alveolares e células dendríticas irão reconhecer e/ou fagocitar o bacilo através de diferentes receptores de membrana, desencadeando assim uma resposta imune inata e posteriormente adaptativa (Esquema 2). Diversos receptores estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares da superfície da parede celular micobacteriana, como os receptores de complemento, CD14, receptores de lectina tipo – C como os receptores de manose (MR), *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN), *macrophage inducible C-type lectin* (Mincle) e Dectina; receptores *scavenger*, e receptores do tipo toll (TLR) (Aderem e Underhill, 1999, Van Crevel e col., 2002, Saiga e col., 2011).



Esquema 2. Fisiopatologia da tuberculose. Infecção e formação do granuloma durante a infecção por *M. tuberculosis*. Participação de macrófagos alveolares, linfócitos e macrófagos espumosos com consequente formação de uma cápsula fibrosa, seguida da formação de um centro necrótico e transmissão. Esquema de Russell e col., 2007.

O receptor de complemento (CR) 3 é considerado o principal receptor responsável pela internalização de micobactérias. Esse receptor que também é conhecido como integrina $\alpha M\beta 2$ ou CD11b/CD18, é descrito possuir um importante papel na fagocitose de micobactérias opsonizadas e livres (Aderem e Underhill, 1999, Velasco-Velazquez e col., 2003).

A fagocitose de micobactérias por macrófagos também pode ser mediada pelos receptores MR através do reconhecimento de resíduos de manose encontrados nos microorganismos (Fenton e Vermeulen, 1996). Schlesinger e col, demonstraram o papel da glicoproteína lipoarabinomanana com capa de manose (ManLam), presente na superfície celular de micobactérias, na interação com o MR presente nos fagócitos (Schlesinger e col., 1994).

Foi demonstrado que o receptor Mincle reconhece o glicolipídio da parede micobacteriana dimicolato trealose (TDM) e induz a síntese de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF) e proteína inibitória de monócitos (MIP)-2 dependente desse receptor (Ishikawa e col., 2009).

O receptor de Dectin-1 também foi descrito como um importante indutor da resposta pro-inflamatória induzido por *M. tb* (Zenaro e col., 2009). Alguns trabalhos indicam que a Dectin-1 pode estar atuando em conjunto com TLR2 no reconhecimento e ativação de macrófagos por micobactérias levando a indução de TNF- α (Yadav e Schorey, 2006). Macrófagos derivados de medula de camundongos deficientes para Dectin-2 mostraram a importância desse receptor no reconhecimento do ManLam e na indução da síntese de TNF, MIP-2 e interleucina (IL)-6 (Yonekawa e col., 2014). Apesar das células dendríticas possuírem alguns receptores similares aos encontrados em macrófagos (CR3 e MR), DC-SIGN, apresenta um papel fundamental no reconhecimento e adesão do LAM de micobactérias (Tailleux e col., 2003).

Tem sido descrito que os receptores *scavenger* também têm um importante papel na internalização das micobactérias. Zimmerli e col., observaram que o bloqueio de MR e CR não levou à uma inibição total da ligação do *M. tuberculosis* com os macrófagos (Zimmerli e col., 1996). Contudo, quando o receptor *scavenger* de classe A foi bloqueado após o bloqueio dos CR e MR, foi observada uma significativa inibição da ligação das micobactérias aos macrófagos. Ainda, Philips e

col observaram que o receptor *scavenger* de classe B, CD36, também é requerido para a fagocitose de micobactérias (Philips e col., 2005).

A literatura mostra que os receptores TLR também estão envolvidos no reconhecimento de micobactérias e são uma das principais armas do hospedeiro contra patógenos invasores. Esses receptores fazem parte de uma família de pelo menos 13 receptores (Nilsen e col., 2008). Os TLRs agem através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), desencadeando a sinalização intracelular via receptor citoplasmático Toll/IL-1 (TIR) que após a associação com proteínas adaptadoras como o fator de diferenciação mielóide 88 (MYD88), *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β* (TRIF), *TIR domain-containing adapter protein, also known as MyD88-adapter-like* (TIRAP) ou *TRIF-related adapter molecule* (TRAM) ativam diferentes fatores de transcrição como, fator nuclear κ B (NF- κ b), fator regulador de interferon (IRF)3, IRF5 e IRF7 induzindo a expressão de uma variedade de citocinas, quimiocinas, moléculas co-estimulatórias e interferon (IFN), importantes para a resposta adaptativa (Medzhitov e Janeway, 1997, Akira e Hoshino, 2003, Kawai e Akira, 2005).

A vasta literatura tem mostrado o reconhecimento de micobactérias, assim como o de componentes da sua parede na sinalização celular e modulação da resposta inflamatória induzida por TLR. Gilleron e col., demonstraram que tanto o LAM, quanto do fosfatidil mioinositol manosídeo (PIM), importantes constituintes da parede celular micobacteriana, estão envolvidos no reconhecimento e ativação celular na resposta inata contra micobactérias de forma dependente do TLR2 (Gilleron e col., 2003). A produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção *in vitro* por BCG em macrófagos é dependente de TLR2, mas não de TLR4 (Heldwein e col., 2003). Corroborando com esses dados, macrófagos deficientes de TLR2 infectados com *M. tuberculosis* não são capazes de expressar o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II diferente do observado em macrófagos deficientes de TLR4 (Reiling e col., 2002). Dados do nosso grupo mostraram ainda que o TLR2, mas não o TLR4 está envolvido na migração celular induzida por BCG (D'avila e col., 2007). A migração de eosinófilos, assim como a produção de eotaxina também foi drasticamente inibida em animais deficientes de TLR2 durante a infecção por BCG (Gandhi e col., 2006, D'avila e col., 2007).

Outra molécula micobacteriana dependente da ativação do TLR2 é a lipoproteína purificada de 19kDa, que quando reconhecida pelo receptor desencadeia a ativação de NF- κ b e a secreção de IL-12 (Brightbill e col., 1999). De maneira interessante, o ManLAM é capaz de ativar o NF- κ b, contudo de uma maneira independente de TLR2 e TLR4, sugerindo a participação de moléculas acessórias e/ou co-receptores no reconhecimento da micobactéria (Morris e col., 2003). Estudos com um outro componente micobacteriano, o fator de tuberculose solúvel (STF), sugere uma interação funcional entre TLR2 e TLR6 para que haja a ativação celular (Bulut e col., 2001). Além disso, Peterson e col e Pugin e col, descreveram o reconhecimento do LAM de *M. tuberculosis* via CD14 desencadeando o processo de fagocitose em macrófagos e síntese de IL-8 (Pugin e col., 1994, Peterson e col., 1995).

Os inflamassomas são estruturas multiproteicas que, após prévia ativação, são organizadas em complexos compreendidos por um *NOD-Like receptor* (NLR), uma proteína adaptadora “*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*” (ASC) e a capase-1 ativa (Vanaja e col., 2015). Sendo responsáveis pelo processamento da pro-IL-1 β e pro-IL-18 nas suas formas ativas (Martinon e col., 2002). De fato, foi observado que macrófagos alveolares pré-tratados com MDP (muramildipeptídeo), ligante de NOD2, foram capazes de induzir um aumento da síntese de IL-1 β após a infecção com *M. tb* ou BCG por 24 h. O autor ainda confirmou o papel do NOD2 na produção de IL-1 β durante a infecção micobacteriana através da inibição dessa proteína por siRNA em macrófagos humanos (Brooks e col., 2011).

Assim que é ativada pelo *M. tuberculosis*, a célula dendrítica induz a síntese de IL-12, seguida pelo aumento da expressão de MHC-II, importante para a apresentação de antígenos para as células T nos órgãos linfóides secundários (Thoma-Uszynski e col., 2000, Thoma-Uszynski e col., 2000, Tsuji e col., 2000, Michelsen e col., 2001). É importante ressaltar que outras células fagocíticas como monócitos, macrófagos e neutrófilos também são responsáveis por secretar IL-12 após a fagocitose do *M. tuberculosis* (Cooper e col., 2002, Trinchieri, 2003). A IL-12 é uma importante citocina indutora de uma resposta adaptativa de perfil T *helper* (Th)1, e principal resposta para o controle da infecção por *M. tuberculosis* (Flynn e Chan, 2001).

Alguns estudos mostram que o tratamento com IL-12 exógeno aumenta a resistência ao bacilo (Cooper e col., 1997) e que animais deficientes tanto em IL-12(p40), quanto em IL-12(p35) são mais suscetíveis à infecção (Berrington e Hawn, 2007). Além disso, tem sido descrito que a IL-12 possui um importante papel estimulando a produção de IFN- γ , sendo fundamental no controle da tuberculose (Trinchieri, 2003).

O aumento da síntese de IFN pelas células T CD4+, T CD8+ e células *natural killer* (NK), bem como do TNF por monócitos e macrófagos quando expostos aos produtos do *M. tb*, possuem uma importante função de conter a infecção. Essas citocinas são responsáveis por ativar os macrófagos e estimular a produção da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e NOS 2 importante para que o bacilo seja morto (Ding e col., 1988, Flesch e col., 1994, Flynn e Chan, 2001, Feng e col., 2006). Além do aumento da expressão de intermediários reativos de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (Flesch e Kaufmann, 1987).

O envolvimento dessas citocinas na proteção à infecção foi confirmado quando foram utilizados animais deficientes em TNF e IFN (Flynn e col., 1995, Flynn e col., 1995). De maneira interessante, Ting e col demonstraram que o *M. tuberculosis* é capaz de inibir a via de sinalização ativada pelo IFN- γ evitando que os macrófagos sejam ativados de maneira adequada, e com isso facilitando a replicação da bactéria (Ting e col., 1999).

Foi observado também em modelos *in vivo* e *in vitro*, a capacidade do *M. tuberculosis* em induzir a síntese de quimiocinas como RANTES, quimioatraentes para células T, eosinófilos e basófilos, as proteínas quimiotáticas de monócito (MCP)-1, MCP-3 e MCP-5 e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP)- α e MIP2 (Rhoades e col., 1995, Orme e Cooper, 1999). Esses dados foram confirmados por estudos *in vitro* utilizando macrófagos humanos infectados com *M. tuberculosis*, onde foram produzidos RANTES, MCP-1, MIP- α e IL-8 (Sadek e col., 1998). LAM, lipomanana (LM), e PIM também têm sido descritos como poderosos indutores de IL-8 (Zhang e col., 1995, Riedel e Kaufmann, 1997, Wickremasinghe e col., 1999).

A infecção por *M. tuberculosis* também induz citocinas conhecidas por suprimir as respostas imunes inata e adaptativa. Essa mudança na resposta inflamatória do hospedeiro no curso da infecção, está relacionada com polarização dos macrófagos induzidos pela infecção (Benoit e col., 2008, Dorhoi e col., 2011, Lugo-Villarino e

col., 2011). Ainda, a polarização dos macrófagos M1 para M2 pode ocorrer devido a transição da fase aguda para a fase crônica da infecção com o objetivo de conter o dano tecidual e a inflamação (Martinez e col., 2009, Mounier e col., 2013). Contudo, alguns trabalhos tem indicado que a bactéria poderia estar usando essa polarização como mecanismo para favorecer a infecção (Benoit e col., 2008, Mege e col., 2011).

Os macrófagos são classificados em clássicos (M1), com características pró-inflamatórias (ex. síntese de NO) e alternativos (M2) que são ativados por sinais característicos de uma resposta Th2 e possuem propriedades anti-inflamatórias, como a síntese de IL-4, IL-13, IL-10 e fator transformador do crescimento- β (TGF- β) (Martinez e col., 2009, Gordon e Martinez, 2010).

A IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos, células dendríticas, e células T regulatórias. A produção dessa citocina durante a infecção por *M. tuberculosis* possui propriedades desativadoras de macrófagos, incluindo a modulação negativa da síntese de IL-12 induzindo uma diminuição da produção de IFN- γ pelas células T (Gong e col., 1996, Flynn e Chan, 2001). Em um estudo *in vitro*, macrófagos de pacientes com *M. tuberculosis* não foram capazes de induzir a proliferação de células T, porém, quando foi usado um inibidor para a IL-10, esse quadro foi revertido (Lin e col., 1996). Rojas e col, observaram que a IL-10 é responsável pela inibição das respostas das células T CD4+, além de modular de maneira negativa a apresentação de antígenos pelas células infectadas por *M. tuberculosis* (Rojas e col., 1999). Estudos em camundongos demonstraram que, apesar da IL-10 não ter um papel importante na suscetibilidade inicial da infecção, ela parece ser importante na reativação da forma latente (Mohan e col., 2001).

A síntese do TGF- β por macrófagos na resposta à tuberculose também induz efeitos anti-inflamatórios. Essa citocina tem sido descrita presente nos granulomas dos pacientes infectados, assim como produzida por monócitos após a estimulação com *M. tuberculosis* e LAM (Toossi e col., 1995, Dahl e col., 1996). Ela age suprimindo as células T e desativando os macrófagos pela inibição do IFN- γ (Toossi e col., 1995, Hirsch e col., 1997, Rojas e col., 1999).

Outro importante fator produzido por células de perfil Th2 é a prostaglandina (PG)E₂. Tem sido descrito que a PGE₂ possui um importante papel na imunossupressão e na persistência da infecção por *M. tb*. Vários trabalhos tem descrito o papel da PGE₂ na desativação dos macrófagos incluindo uma importante

diminuição da nicotidamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, importante, IL-12 e MCP (Pillinger e col., 1995, Van Der Pouw Kraan e col., 1995, Harbrecht e col., 1997). Hsueh observou que quando macrófagos alveolares são estimulados com BCG há um aumento na liberação de PGE₂, quando comparado com o grupo estimulados com partículas de látex (Hsueh, 1979). A inibição da PGE₂ em animais na fase crônica da infecção com *M. tb*, foi capaz de induzir um aumento da síntese de IFN- γ , TNF- α e iNOS além da diminuição da replicação bacteriana (Rangel Moreno e col., 2002).

1.1.3) Mecanismos de subversão da resposta imune do hospedeiro

A tuberculose é uma doença que persiste por longos períodos no hospedeiro possuindo uma alta taxa de infectividade. Essa característica pode ser atribuída a capacidade da bactéria de sobreviver em equilíbrio com sistema imune do hospedeiro. Tem sido descritas diversas estratégias usadas pelas micobacterias para resistir a resposta imune do hospedeiro.

A indução de apoptose em leucócitos tem sido considerado um mecanismo de escape que pode estar envolvido na sobrevivência e replicação micobacteriana durante a infecção. Alguns estudos tem mostrado o papel da apoptose de macrófagos como um mecanismo programado para a eliminação do bacilo infeccioso, uma vez que o meio intracelular é o local de replicação do *M. tuberculosis* (Molloy e col., 1994, Kremer e col., 1997, Mendez-Samperio e col., 2000). Contudo, o papel da apoptose parece ser benéfico para o bacilo, se levarmos em conta o tipo celular que entra em apoptose. Já foi descrito que os neutrófilos não são eficazes no controle da tuberculose em animais susceptíveis (Eruslanov e col., 2005). Aleman e col, observaram que a infecção por *M. tuberculosis* acelera a apoptose de neutrófilos (Aleman e col., 2002). Dessa forma, a apoptose de neutrófilos pode funcionar como “cavalo de tróia”, uma vez que quando fagocitados pelos macrófagos (eferocitose), os neutrófilos podem estar levando consigo as bacilos ainda vivos (Antony e col., 1985, D'avila e col., 2008). A fagocitose de células apoptóticas induz ainda a síntese de citocinas anti-inflamatórias TGF- β , IL-10 e a supressão das pró-inflamatórias TNF- α e IL-8 (Fadok e col., 1998, D'avila e col., 2008, D'avila e col., 2011).

Alguns estudos tem sugerido que a indução de necrose pelo *M. tb* pode ser uma estratégia encontrada para escapar do sistema imune e disseminar a bactéria. Amaral e col, observaram que cepas virulentas de *M. tb* são capazes de induzir necrose em macrófagos após alta taxa de replicação do bacilo levando a sua dispersão para outras células em um mecanismo dependente do receptor P2X7 (Park e col., 2006, Amaral e col., 2014).

Autofagia também tem sido considerada um importante mecanismo do hospedeiro para regular a proliferação micobacteriana. Foi observado que a deleção do gene *eis* (*enhaces intracelular bacterial survival*) do *M. tb* induziu um aumento no

autofagossomos e de ROS em macrófagos contribuindo para uma resposta antibacteriana mais eficaz por parte destas células (Shin e col., 2010). E ainda, que o fator de virulência SapM (fosfatase ácida), secretado tanto por *M. tb* quanto por BCG, está envolvido na regulação negativa da autofagia através da interação da SapM com a proteína Rab7 (Hu e col., 2015). Tomados em conjunto, esses trabalhos demonstram que a autofagia favorece a resposta da célula hospedeira, mas algumas micobactérias apresentam mecanismos para tentar subverter esta resposta na célula hospedeira.

Como descrito anteriormente, os inflamassomas tem sido relacionados com a resposta à infecções micobacterianas. Contudo, o papel da ativação desses complexos multiproteicos durante infecções por *M. tb* e BCG, ainda não está totalmente elucidado. Enquanto tem sido amplamente descrito o papel protetor da IL-1 β contra a infecção por *M. tb* (Yamada e col., 2000, Mayer-Barber e col., 2010), alguns autores mostram que a ativação do NLRP3 através da 6kDa *early secreted antigenic protein* (ESAT-6) da via de secreção ESX-1 de micobacterias foi capaz de induzir a secreção de IL-1 β (Carlsson e col., 2010, Mishra e col., 2010). Contudo, o mesmo trabalho mostrou que a sua indução foi prejudicial para o hospedeiro por causar uma inflamação excessiva (Carlsson e col., 2010). Master e col demonstraram o papel da Zn²⁺ metaloprotease de *M. tb* na inibição da ativação do inflamassoma e síntese de IL-1 β . Quando foram estudados o *M. tb* ou BCG deficientes para o gene que codifica a zinco-metaloprotease (*zmp*)1 foi observado, além da ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β , um aumento na maturação fagossomal em macrófagos (Master e col., 2008).

Além de modular os eventos acima citados, as micobacterias causadoras da tuberculose podem regular a via endocítica da célula hospedeira. O *M. tuberculosis*, possui como principal característica a capacidade de inibir a acidificação fagossomal, sendo esse mecanismo fundamental para impedir a destruição do patógeno e o controle da doença. Após a fagocitose, o fagossomo formado adquire uma série de proteínas (como as Rab5, p150 e fosfatidilinositol 3 quinase- (PI3K)), advindas de vesículas da via endocítica denominadas endossomas primários por um mecanismo denominado “*Kiss and run*” (Desjardins, 1995). Com a progressão da via endocítica, há a troca de proteínas do fagossomo primário por proteínas características do fagossoma secundário (LAMP, Rab7 e RILP). A RILP (*rab-interecting lysosomal*

protein) é a proteína efetora da Rab7, que faz a ligação entre a Rab7 ativada (GTPase) e o complexo motor dineína-dinactina, promovendo o movimento centrípeto entre os fagossomas e lisossomas (Jordens e col., 2001, Harrison e col., 2003). Nesse momento, os microrganismos fagocitados estão sujeitos a um importante mecanismo altamente regulado, a degradação por hidrolases ácidas, (conforme demonstrado no Esquema 3) (Koul e col., 2004, Flannagan e col., 2009, Stenmark, 2009).

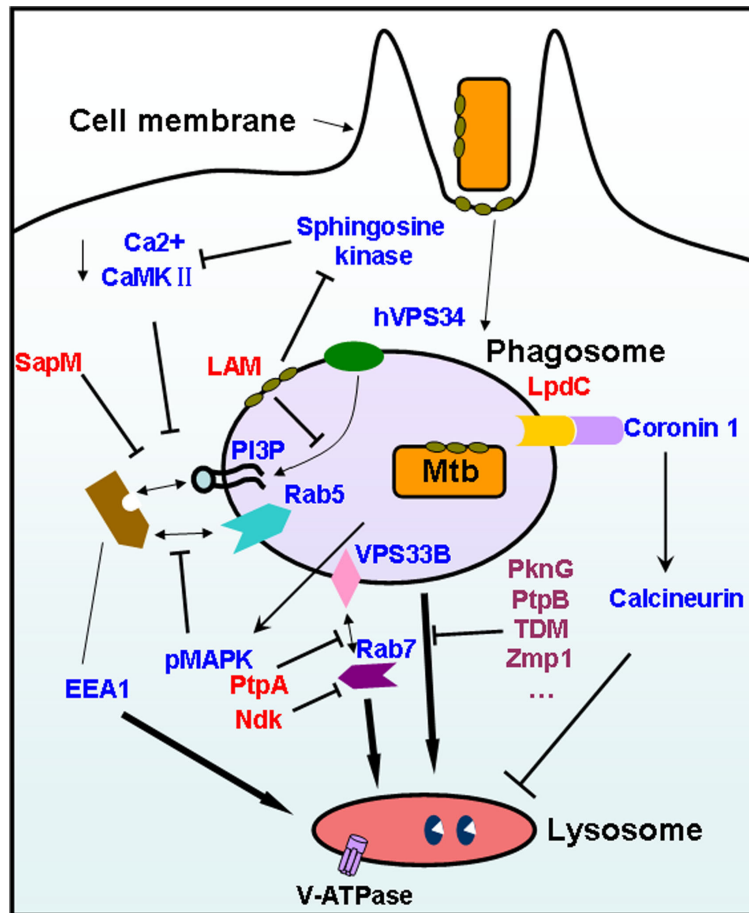
A ausência de determinados componentes da parede micobacteriana tem sido amplamente correlacionada com a diminuição da virulência do patógeno. Através de estudos com *M. tuberculosis* deficiente na síntese de moléculas de superfície específicas, tem sido sugerido que a parede celular do patógeno é um importante fator para a sobrevivência deste dentro da célula hospedeira (Glickman e col., 2000, Makinoshima e Glickman, 2005).

Existem evidências de que o LAM, componente da parede de *M. tuberculosis*, é capaz inibir o influxo de cálcio citosólico (Vergne e col., 2003). Tal processo é importante para a maturação fagossomal, pois o cálcio ativa o complexo Ca⁺⁺/calmodulina quinase II que é responsável pelo recrutamento da proteína do antígeno-1 do endossoma primário (EEA1), através da interação da PI3K com a calmodulina (Fratti e col., 2003). E, essas proteínas efetoras da pequena GTPase Rab5, são em conjunto responsáveis pelo ancoramento de vesículas endossomais. Essas vesículas da via endocítica são responsáveis pela troca de proteínas, como a troca da Rab5 pela Rab7, da membrana fagossomal durante o curso de sua maturação. Esses resultados concordam com dados prévios da literatura, que descreveram a capacidade do *M. bovis* (Via e col., 1997) e *M. tuberculosis* (Fratti e col., 2001) em reter a Rab5 (marcador de endossomo primário), não adquirindo a Rab7, necessária para o ancoramento do fagossoma secundário com o lisossoma. Esses dados contribuem para a hipótese de que o LAM pode estar participando do processo de inibição da formação do fagolisossoma.

Ainda, o lipídio da parede micobacterianas TDM, também está envolvido na modulação da maturação fagossomal. Macrófagos estimulados com partículas de látex revestidas com TDM de BCG apresentam um atraso na maturação fagossomal quando comparados com o controle (Axelrod e col., 2008). Esse efeito foi revertido quando as células foram pré- tratadas com IFN- α . A ativação dos macrófagos foi

mais eficaz em induzir a maturação dos fagossomas contendo as partículas de látex revestidas com TDM do que os macrófagos em repouso estimulados com as partículas de látex revestidas com soro albumina bovina (BSA) (Axelrod e col., 2008).

Alguns autores têm sugerido que as micobactérias possam estar ativamente controlando esses eventos da via endocítica (Esquema 3). Vergne e col, demonstraram que o *M. tuberculosis* é capaz de inibir a formação do fagolisossomo através da secreção de uma fosfatase chamada SapM, que atua hidrolizando o fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) da membrana fagossomal, o que impede o ancoramento do fagossomo secundário com o lisossomo (Vergne e col., 2005), uma vez que é necessário a presença desse lipídio na forma fosforilada para que esse evento ocorra. Macrófagos THP-1 infectados com *M. tb* deficiente para SapM possuem um aumento na taxa de fagossomas acidificados quando comparados com os selvagens (Puri e col., 2013).



Esquema 3. Modelo de interação patógeno-hospedeiro na modulação da maturação fagossomal. Envolvimento de proteínas efetoras do *M. tuberculosis* atuando na inibição da maturação fagossomal (Li Wu e col., 2011).

O *M. tb* possui 2 tipos de sistemas de secreção de proteínas: ESX e SecA importantes para a virulência bacteriana (Feltcher e col., 2010). Apesar deste mecanismo não estar totalmente elucidado, Sullivan e col observaram que *M. tb* deficientes no sistema de secreção secA2 possuem uma taxa de maturação fagossomal maior do que o *M. tb* selvagem (Sullivan e col., 2012). Ainda, o sistema de secreção ESX-1 responsável por secretar proteínas como a ESAT-6 e CFP-10 (*culture filtrate protein 10 kDa*), também está envolvido com a inibição da maturação fagossomal (Tan e col., 2006, Abdallah e col., 2007). No modelo de infecção com *M. marinum*, observa-se a co-localização do bacilo deficiente na secreção dessas proteínas com o lysotracker, marcador de vacúolos acidificados (Tan e col., 2006). Demonstrando que estas proteínas possam ser necessárias para o mecanismo de inibição da acidificação do fagolisossoma das micobacterias mais patogênicas

O *M. tb* também é capaz de inibir a chegada nos fagossomas da ATPase vacuolar (V-ATPase), enzima composta por multi-subunidades que possui o papel de bomba de prótons importante para a diminuição do pH fagossomal de 6,5 para 5,0 (Mukherjee e col., 1997, Wong e col., 2011). Wong e col observaram que a proteína tirosina quinase (PtpA) secretada pelo *M. tb* se liga à subunidade H da V-ATPase impedindo que esse interaja com o fagossoma e inibindo a sua acidificação (Wong e col., 2011). Além disso, a secreção de uma proteína-treonina quinase semelhante a de organismos eucariotas (PknG) pelo *M. tb* e pelo BCG também está envolvida com a inibição da fusão do fagossoma com o lisossoma. Foi observada a co-localização do BCG com deleção no gene *pknG*, com a proteína Lamp mas não do BCG selvagem ou do *M. smegmatis* (micobactéria não patogênica) com mutação para expressar a proteína PknG o que indica o papel dessa proteína na inibição da maturação fagossomal (Walburger e col., 2004).

Estudos *in vitro* também demonstraram a produção de grandes quantidades de amônia nos sobrenadantes de culturas infectadas com *M. tuberculosis*, podendo este ser o fator responsável pela inibição da fusão do fagolisossomo, uma vez que o cloreto de amônia afeta o movimento dos lisossomos, assim como alcaliniza o compartimento lisossomal (Gordon e col., 1980, Hart e col., 1983).

A presença de colesterol no fagossoma micobacteriano também tem sido descrita como importante fator para a prevenção da maturação fagossomal (Gatfield e Pieters, 2000, Jayachandran e col., 2007). Ainda, Gatfield e Pieters observaram que

vacúolos contendo micobactérias possuem uma grande quantidade de colesterol e que a depleção do colesterol em macrófagos antes da infecção torna as células susceptíveis a infecção (Gatfield e Pieters, 2000). O colesterol tem se mostrado essencial para a interação dos fagossomas com a proteína do hospedeiro Coronina-1, também conhecida como P57 ou *tryptophan-aspartate-containing coat protein* (TACO). Essa proteína é expressa exclusivamente em leucócitos e está presente somente em fagossomas de macrófagos infectados com a bactéria viva (De Hostos, 1999, Ferrari e col., 1999, Nguyen e Pieters, 2005). Durante o estímulo de macrófagos com a bactéria morta, a coronina 1 é rapidamente dissociada do fagossomo seguida da fusão com os lisossomas e degradação da micobactéria (Ferrari e col., 1999, Tailleux e col., 2003). Além do mais, tem sido descrito que o colesterol das células hospedeiras pode estar funcionando como importante fonte de carbono para as micobactérias (Pandey e Sasseti, 2008, Mattos e col., 2014).

Anes e col., demonstraram que a utilização de lipídios como ácido araquidônico (AA), ceramidas, esfingosinas, esfingomiélinas ou PI(4,5)P₂ em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* induz a maturação fagossomal em um mecanismo dependente da nucleação da actina resultando em um significativo aumento da morte da micobactéria (Anes e col., 2003). O mesmo estudo demonstrou que a utilização do lipídio diacilglicerol (DAG) inibiu a nucleação da actina com conseqüente inibição da maturação do fagossomo. Esses dados sugerem que o curso da infecção pode ser modulado por ácidos graxos e sugerem ainda a habilidade da micobactéria em recrutar componentes, principalmente lipídios, do hospedeiro para proteger o seu habitat intracelular da ação dos lisossomas.

De fato, tem sido descrito que uma grande parte do genoma do *M. tuberculosis* é direcionado para a produção de moléculas envolvidas com a síntese de lipídios (Cole e col., 1998) e o papel dos lipídios durante a infecção micobacteriana tem sido relacionado com a sobrevivência da micobactéria no interior de células do hospedeiro.

Uma vez que a bactéria está em um ambiente com escassez de nutrientes como os fagossomas, eles se tornam restritos aos ácidos graxos como sua fonte de carbono. McKinney e col, identificaram o gene *icl1*, que codifica a enzima isocitrato liase ativando a via de glioxilato, a qual facilita a retenção de carbono através da síntese *de novo* de carboidrato (Honer Zu Bentrup e Russell, 2001). O *M.*

tuberculosis possui 2 genes que codificam essa enzima. Tem sido descrito que deleção desses 2 genes impede a replicação intracelular, resultando na eliminação do patógeno dos pulmões (Munoz-Elias e Mckinney, 2005). Dessa forma, é importante ressaltar, que o que é alimento para as células do hospedeiro pode representar também uma fonte acessível de nutrientes para o patógeno (Russell, 2003).

1.1.4) Corpúsculos lipídicos

Os corpúsculos lipídicos, também chamados de gotas lipídicas ou adipossomos são organelas que podem ser encontradas em virtualmente todos os tipos celulares incluindo células vegetais, procariotas e de animais (Bozza e col., 2007, Bozza e col., 2009, Pol e col., 2014). Contudo, o aumento dos corpúsculos lipídicos em número e tamanho tem sido descritos envolvidos com diversas patologias tanto infecciosas quanto inflamatórias (D'avila e col., 2008, Bozza e col., 2009, Saka e Valdivia, 2012).

Inicialmente, pensava-se que os corpúsculos lipídicos eram resultado do acúmulo de lipídios intracelulares atuando como fonte de energia em situações de limitação nutricional ou estocando ácidos graxos livres a fim de evitar a formação de lipídios reativos capazes de promover eventualmente a morte celular (Kusminski e col., 2009). Atualmente, sabe-se que a formação dessas organelas é um fenômeno altamente regulado que tem sido relacionada com a patogenia de doenças infecciosas e inflamatórias (Bozza e col., 2009 Saka e Valdivia, 2012).

Alguns modelos têm sido propostos para explicar a biogênese dos corpúsculos lipídicos como os modelos de “brotamento”, “porta ovos” e “enovelamento”. O modelo de “brotamento” tem sido mais difundido. Essa hipótese associa a presença de enzimas responsáveis pelo metabolismo lipídico acumuladas no retículo endoplasmático (RE) com o acúmulo de lipídios neutros entre as duas folhas da membrana do RE. Após alcançarem determinado volume, os corpúsculos brotam em direção ao citosol carregando uma hemi-membrana proveniente da face citosólica da membrana do RE (Brown, 2001, Murphy, 2001, Robenek e col., 2004, Martin e Parton, 2006). Entretanto, a presença de domínios de membrana do RE e ribossomas no interior dos corpúsculos lipídicos reforça a idéia da importância do modelo de enovelamento e sugere o papel dessas organelas na síntese de proteínas (Wan e col., 2007, Bozza e col., 2009).

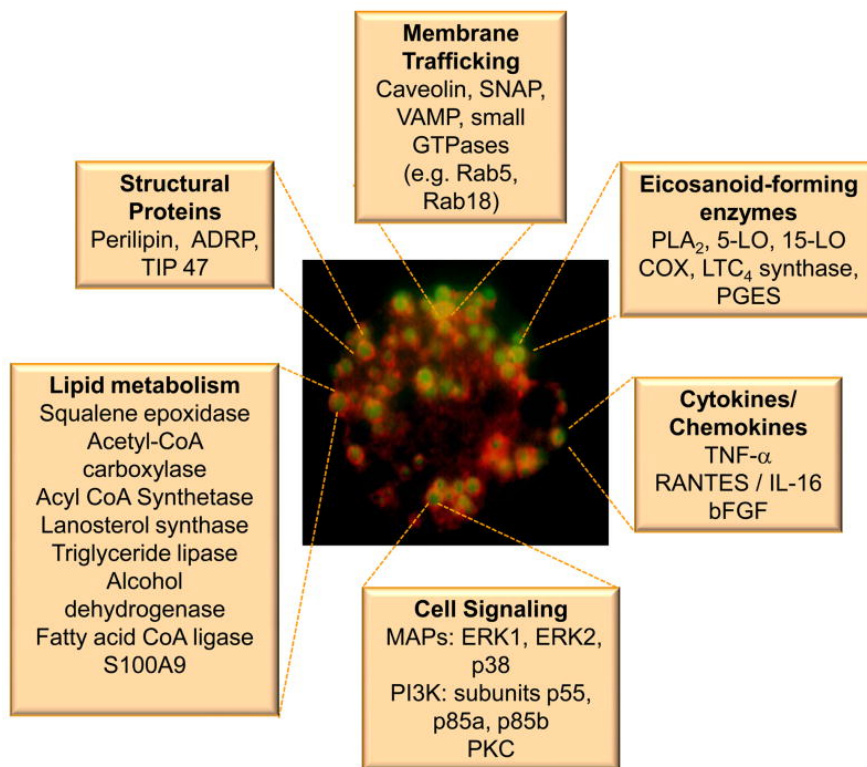
Os corpúsculos lipídicos são constituídos por uma mono membrana de fosfolipídios, ricas em lipídios neutros e possuem uma variada composição proteica. As principais proteínas descritas relacionadas com os corpúsculos lipídicos são as proteínas estruturais da família das perlipinas, também denominadas como proteínas PAT.

Constituídas pela perilipina/PLIN1, proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (ADRP/ adipofilina/ PLIN2) e a *tail-interacting protein 47kDa* (TIP47/PLIN3), estima-se que essas proteínas são responsáveis em revestir 15% da superfície dos corpúsculos lipídicos (Londos e col., 1999).

Estudos de proteômica identificaram mais de 200 proteínas diferentes nos corpúsculos lipídicos de células de mamíferos (Hodges e Wu). Além das proteínas estruturais, proteínas relacionadas com o metabolismo, estoque e homeostasia de lipídios, tem sido encontradas proteínas originalmente conhecidas na sinalização proteína quinase C (PKC); Ras; proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), proteínas do citoesqueleto (actina e filamina A), do RE e diversas proteínas envolvidas no tráfego de vesículas (Snares, proteínas vps e Rabs) (Hodges e Wu, Lass e col., 2006, Bartz e col., 2007, Wan e col., 2007, Bozza e col., 2009).

Ainda, foi observada a co-localização de enzimas responsáveis pela síntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico (AA) dos corpúsculos lipídicos, como a 5-lipoxigenase (5-LO), leucotrieno sintase (LTC₄) e ciclooxigenase (COX) (Dvorak e col., 1993, Bozza e col., 1997, Bozza e col., 1998, Pacheco e col., 2002). Essas evidências indicam que os corpúsculos lipídicos possuem os componentes necessários para que o AA esterificado em fosfolipídios e lipídios neutros possam ser metabolizados em eicosanóides, importantes em diversas patologias (Esquema 4).

De fato, a imunolocalização de eicosanóides como o LTB₄, LTC₄ e PGE₂ foram observados nos corpúsculos lipídicos em diversos tipos celulares dependente do estímulo (Bandeira-Melo e col., 2001, D'avila e col., 2006, Pacheco e col., 2007, Mattos e col., 2011).



Esquema 4. Proteínas encontradas nos corpúsculos lipídicos. Proteínas envolvidas com a biogênese dos corpúsculos lipídicos, sinalização celular, metabolismo lipídico, enzimas formadoras de eicosanoides e de tráfego de membranas já foram descritas presentes nos corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares (Bozza e col., 2009).

Tem sido crescente o consenso do papel dos corpúsculos lipídicos como organelas multifuncionais, de biogênese altamente regulada, envolvidas em processos inflamatórios e infecciosos (Pacheco e col., 2002, Bozza e col., 2009, Saka e Valdivia, 2012).

A participação de receptores de membrana envolvidos no reconhecimento de patógenos intracelulares tem sido descritos modulando a biogênese dos corpúsculos lipídicos. Os receptores mais amplamente estudados nesse fenômeno são os receptores TLRs. Nosso grupo tem documentado que a indução de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante a infecção experimental por *M. leprae* e *M. bovis*, BCG ocorre em um mecanismo dependente do receptor TLR2 (D'avila e col., 2006, Almeida e col., 2009, Mattos e col., 2010). O componente da parede micobacteriana e ligante de TLR2, o LAM também é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados *in vitro* (D'avila e col., 2006). Foi ainda relatado o envolvimento dos co-receptores de TLR2, CD36, CD14 e CD11b na indução de corpúsculos lipídicos durante a infecção experimental por BCG (Almeida e col., 2014). Contudo, quando foram utilizados animais deficientes para o receptor TLR4, não houve diferença na formação de corpúsculos lipídicos, assim como não foram observadas diferenças na migração e ativação de leucócitos quando comparados com os animais selvagens durante a infecção por BCG *in vivo* (Fremond e col., 2003, D'avila e col., 2006, D'avila e col., 2007).

De maneira semelhante, a infecção por *Chlamydia pneumonia* foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente do receptor TLR2, mas não do TLR4 em presença de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Cao e col., 2007). Outros estudos têm documentado o papel do TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo patógeno intracelular *Trypanosoma cruzi* (D'avila e col., 2011, D'avila e col., 2012).

Os receptores TLR2 e TLR6 também foram descritos importantes na biogênese dos corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com *M. leprae* (Mattos e col., 2010). Contudo, nas células de Schwann infectadas por *M. leprae*, a formação de corpúsculos lipídicos ocorre por um mecanismo independente de TLR2, apesar dessas células serem capazes de expressar esse receptor (Oliveira e col., 2003, Mattos e col., 2010).

D'Avila e col observaram o envolvimento do TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos durante infecção por BCG *in vivo* em animais deficientes para esse receptor (D'avila e col., 2007). Nesse mesmo estudo foi observado que a síntese de eotaxina e IL-5 foram inibidas em animais deficientes de TLR2 durante a infecção por BCG. Além de ter demonstrado que a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos durante a infecção por BCG possui um mecanismo dependente da eotaxina e do receptor de quimiocina (CC)R3 (D'avila e col., 2007). Sobrenadantes de cultura de *M. leprae* foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos de maneira semelhante à infecção com a bactéria viva, contudo esse fenômeno não foi observado em células de Schwann . Dessa forma, tem sido demonstrado que a indução dos corpúsculos lipídicos não depende somente da direta interação entre o patógeno e a célula do hospedeiro, mas também há mecanismos de amplificação desse fenômeno como componentes bacterianos, bem como quimiocinas e citocinas geradas pelo hospedeiro (D'avila e col., 2007, Mattos e col., 2010).

Fatores de regulação transcricionais especializados na expressão de diversos genes, como o receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ) também têm sido descrito envolvido na biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção micobacterianas (Almeida e col., 2009).

O PPAR γ , membro da família de receptores nucleares ativados por lipídios, possui um importante papel no metabolismo lipídico e inflamação em macrófagos e células dendríticas (Szatmari e Nagy, 2008). Almeida e col observaram o aumento da expressão de PPAR γ em monócitos humanos estimulados com BCG. Ainda, o aumento na expressão de PPAR γ ocorreu em paralelo com o aumento no número de corpúsculos lipídicos e da síntese de PGE $_2$ em macrófagos estimulados por BCG (Almeida e col., 2009). O papel do PPAR γ na biogênese dos corpúsculos lipídicos ainda foi confirmada pelo uso do antagonista do seu receptor, o GW9662, que foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos, assim como a síntese de PGE $_2$ sem afetar a síntese de TNF α , IL-6, IL-12 e MIP-1. Corroborando com dados anteriores do nosso grupo, animais deficientes para TLR2 não foram capazes de expressar PPAR γ , assim como não houve indução de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE $_2$, quando comparados com os animais selvagens (Almeida e col., 2009). De maneira complementar, foi observado que o receptor CD36 também está

envolvido na ativação do PPAR γ e síntese de PGE₂ durante a infecção por BCG (Almeida e col., 2014).

Como descrito anteriormente, os corpúsculos lipídicos são locais de compartimentalização e de metabolização de AA (Bozza e Bandeira-Melo, 2005). O aumento no número de corpúsculos lipídicos induzido pelas infecções bacterianas tem sido relacionado com o aumento da síntese de eicosanoides e com a localização de enzimas formadoras de eicosanoides nessas organelas (Pacheco e col., 2002, Leite e col., 2005, Pacheco e col., 2007, D'avila e col., 2008). Diversos efeitos imunossupressores têm sido descritos para a PGE₂ em altas concentrações, como a inibição de citocinas do perfil Th1, assim como de TNF- α e a síntese de óxido nítrico, que são essenciais para o combate à micobactéria (Renz e col., 1988, Betz e Fox, 1991).

Rangel Moreno e col observaram que a supressão da produção de PGE₂ em animais infectados por *M. tuberculosis* levou a uma significativa diminuição do crescimento do bacilo na fase avançada da doença (Rangel Moreno e col., 2002). Enzimas formadoras de eicosanóides, como a COX-2 foram observadas co-localizando com corpúsculos lipídicos de leucócitos em 24 h de infecção por BCG (D'avila e col., 2006). Utilizando a técnica de detecção de eicosanóides no seu sitio de síntese (Eicosacell), foi confirmada a síntese de PGE₂ em corpúsculos lipídicos de macrófagos durante a infecção por BCG (D'avila e col., 2006). Os autores ainda observaram uma inibição na formação dos corpúsculos lipídicos quando utilizados antiinflamatórios não esteroidais como a aspirina e o NS-398 acompanhada de uma diminuição de PGE₂, IL-10 e um aumento de TNF- α .

Durante a infecção por *T. gondii* foi observado um aumento da expressão da 5-LO e da produção de um potente mediador lipídico anti- inflamatório, a lipoxina (Aliberti e Bafica, 2005). De maneira semelhante, Melo e col., tem documentado um aumento da síntese de PGE₂ acompanhado pelo aumento no número de corpúsculos lipídicos em ratos infectados com *T. cruzi* (Melo e col., 2003). Durante a infecção experimental por *Leishmania amazonensis*, foi observado que a PGE₂ aumenta a sua replicação e quando a COX-2 é inibida, há uma diminuição da viabilidade do parasita (Pinheiro e col., 2009). O aumento da capacidade dos macrófagos em produzir PGE₂ derivada dos corpúsculos lipídicos induzidos durante a infecção micobacteriana pode ser relacionada com a inibição de uma resposta

Th1, podendo assim estar modulando negativamente a ativação do macrófago, favorecendo a sobrevivência e replicação do patógeno no interior do fagócito.

Dessa forma, tem sido demonstrado que os corpúsculos lipídicos parecem participar da regulação do metabolismo lipídico e do controle da síntese de mediadores inflamatórios em resposta às infecções e que esse fenômeno parece estar envolvido com a persistência do patógeno (Almeida e col., 2009, Mattos e col., 2011).

Alguns estudos têm descrito uma íntima relação entre fagossomas contendo micobactérias e os corpúsculos lipídicos (D'avila e col., 2006, Peyron e col., 2008, Tanigawa e col., 2008). Foi observado por microscopia eletrônica de transmissão a proximidade entre corpúsculos lipídicos e fagossomas em animais infectados por BCG (D'avila e col., 2006). Em estágios mais tardios de infecção foi observada a presença do bacilo no interior dos corpúsculos lipídicos em células mononucleares humanas infectadas com *M. tuberculosis* (Peyron e col., 2008). Dados semelhantes foram observados durante a infecção por *M. leprae*, onde foi observado o bacilo totalmente revestido pelos corpúsculos lipídicos das células de Schwann (Mattos e col., 2010, Mattos e col., 2010, Mattos e col., 2014). Estudos com biópsia de pele de pacientes demonstraram a localização das proteínas ADRP e perilipinas nos corpúsculos lipídicos e na membrana de fagossomas de histiócitos contendo *M. leprae* (Tanigawa e col., 2008) (Mattos e col., 2014).

Investigando a infecção por *T. cruzi*, Melo e col., observaram por microscopia eletrônica a interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos. Além disso, foi demonstrada a presença dessas organelas dentro dos fagossomas de macrófagos infectados por *T. cruzi* (Melo e col., 2003). De maneira semelhante, durante a infecção por *Chlamydia trachomatis*, foi observado por microscopia de confocal, além do aumento na formação de corpúsculos, que fagossomas infectados estão próximos dessas organelas (Kumar e col., 2006). Essa proximidade entre os corpúsculos e o fagossomas pode estar relacionada à necessidade de nutrientes pelos patógenos, favorecendo a sua replicação e sobrevivência. Além disso, quando a formação dos corpúsculos lipídicos é inibida com triacsin C (inibidor da acil coA sintetase de cadeia longa) há um aumento da sobrevivência e da replicação da *Chlamydia trachomatis* (Kumar e col., 2006). Alguns patógenos como o *Toxoplasma gondii* dependem do tráfego de colesterol para o vacúolo parasitóforo para a sua

sobrevivência. Tem sido descrito que esse patógeno é capaz de captar e metabolizar lipídios (Charron e Sibley, 2002), uma vez que já foi descrita a presença de enzimas responsáveis pela síntese de ésteres de colesterol no *T. gondii* (Nishikawa e col., 2005). Além disso, corpúsculos lipídicos também foram encontrados dentro do vacúolo parasitóforo contendo o *T. gondii* (Nishikawa e col., 2005). Luo e col., descreveram a presença de complexos de ferro e micobactina (sideróforos lipofílicos de micobacterias) presentes nos corpúsculos lipídicos que estavam em interação com os fagossomas (Luo e col., 2005). Esses complexos estariam atuando como ponte entre as duas organelas facilitando a captação de ferro importante para o metabolismo e replicação do patógeno (Luo e col., 2005, Neyrolles e col., 2015). Dessa forma, os patógenos podem estar sendo beneficiados pela proximidade dos corpúsculos lipídicos, que podem estar atuando como fonte de nutrientes.

Em um estudo elegante, Mattos e col., estudaram a dinâmica de associação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos utilizando a microscopia de confocal e o recurso de tempo real no modelo de infecção do *M. leprae* em células de Schwann (Mattos e col., 2010). Nesse ensaio, os autores observaram a reorganização dos corpúsculos lipídicos se movendo ativamente em direção ao fagossoma contendo o bacilo (Mattos e col., 2010, Mattos e col., 2010). Ainda, foi observado que associação entre os corpúsculos e os fagossomas é um mecanismo dependente de PI3K, responsável pela reorganização do citoesqueleto.

Diferentes estudos tem sugerido um envolvimento para os corpúsculos lipídicos na sobrevivência de parasitas intracelulares, entretanto os mecanismos envolvidos não estão totalmente conhecidos. Almeida e col, observaram uma diminuição da viabilidade bacteriana quando foi utilizado o antagonista para PPAR- γ , o GW9662. Esse fenômeno pode ser relacionado com a inibição da formação de corpúsculos por esse antagonista durante a infecção por BCG (Almeida e col., 2009). Corroborando com esses dados, foi demonstrado que o pré- tratamento com NS-398 e C75 de células de Schwann infectadas por *M. leprae* foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos em paralelo com a diminuição da sobrevivência do bacilo (Mattos e col., 2011).

Diante dessas evidências e do importante papel dos corpúsculos lipídicos em infecções micobacterianas já descritas (D'avila e col., 2008, Mattos e col., 2010,

Almeida e col., 2014), esse trabalho visa estudar os mecanismos moleculares envolvidos na biogênese dos corpúsculos lipídicos durante infecção *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG possibilitando compreender o mecanismo de sobrevivência desse patógeno dentro dos fagossomas e a sua relação com os corpúsculos lipídicos para um futuro desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em doenças inflamatórias e infecciosas.

2) Objetivos

2.1) Objetivo geral

Investigar o papel dos corpúsculos lipídicos na interação com os fagossomas durante a infecção por *M. bovis*, BCG *in vivo* e *in vitro* e o seu papel na modulação da resposta imune do hospedeiro.

2.2) Objetivos específicos

- Analisar a interação dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas durante a infecção por BCG;
- Investigar o papel de componentes da parede micobacteriana na aproximação dos fagossomas e os corpúsculos lipídicos;
- Avaliar o papel dos corpúsculos lipídicos em modular o recrutamento de proteínas envolvidas com o tráfego de membranas como as proteínas da família Rab assim como verificar o seu papel na interação com os fagossomas;
- Investigar a troca de conteúdo entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas durante a infecção por BCG;
- Avaliar o papel dos corpúsculos lipídicos na modulação de mediadores inflamatórios produzidos durante a infecção por BCG;
- Avaliar o papel dos corpúsculos lipídicos na sobrevivência bacteriana durante a infecção por BCG.

3) Metodologia

3.1) Animais

Foram utilizados camundongos adultos de ambos os sexos, susceptíveis à infecção por BCG, da linhagem C57BL/6, com peso entre 20 a 25g, fornecidos pelo biotério central da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos em gaiolas plásticas com livre acesso à água e ração, em uma sala com temperatura de 22 a 24°C, com ciclos de 12 h luz/escuro nos infectórios do Pavilhão Osório de Almeida e Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP), Fiocruz-RJ. Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Fiocruz sob o Protocolo # LW32/12.

3.2) *Mycobacterium bovis*, BCG

Foram utilizadas micobactérias (*Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin BCG) liofilizadas e acondicionadas em ampolas de 40 mg, fornecidas pela Fundação Ataulpho de Paiva, RJ. Os bacilos foram diluídos em uma solução de PBS Tween 80 0,05%, armazenados em alíquotas contendo 7×10^7 UFC/ml, sob refrigeração a 4°C. Antes da utilização, o BCG foi sonificado por 10 s e em seguida homogeneizado 20x com o auxílio de uma agulha de 30G para desfazer os grumos formados pelas bactérias. Nos experimentos *in vivo* os animais foram infectados intratoracicamente (i.t.) com BCG (5×10^6 bacilos/cavidade) ou nos experimentos *in vitro* as células foram estimuladas com multiplicidade de infecção (MOI) 1:1, MOI 3:1 ou MOI 5:1.

3.3) Pleurisia induzida por BCG

Os camundongos foram inoculados através de injeção intratorácica (i. t.) de 0,1 ml da suspensão contendo 5×10^6 bacilos/cavidade de *Mycobacterium bovis*, BCG (marcados com o kit Baclight - Molecular Probes, ou não marcados como descrito na secção 3.11.2). Nos animais controles foram administrados 0,1 ml de 0,05% Tween 80 em PBS estéril i.t.. Após 24 h de infecção, os animais infectados e os controles foram eutanasiados em câmara de gás carbônico. A cavidade torácica foi aberta e lavada com 1 ml de solução de PBS (pH 7,4) para obtenção da suspensão celular. Para a contagem, as células foram diluídas e quantificadas como descrito

posteriormente. Alíquotas contendo 1×10^5 células dos grupos controles e infectados, foram citocentrifugadas a 450 rpm por 5 min para a confecção de citoesfregaços. As lâminas contendo os citoesfregaços foram fixadas em formalina 3.7% por 10 min para posterior coloração com tetróxido de ósmio e quantificação de corpúsculos lipídicos. Também foi utilizada a sonda fluorescente Nile red (9-diethylamino-5H-benzo (alpha) phenoxazine-5-one, Sigma) (1:20.000), , 1-acil-2-(7-octil BODIPY[®]-1-pentanoil)-sn-glicerol (Bodipy[®] 493/503, Molecular Probes) (1:250) ou LipidToxRed, (Molecular Probes) (1:2000) para a marcação de corpúsculos lipídicos. Os citoesfregaços também foram utilizados para imunofluorescência como será descrito posteriormente.

3.4) Contagem de Leucócitos totais

Alíquotas das suspensões de leucócitos provenientes da cavidade torácica, peritoneal ou da medula foram diluídas na proporção de 1:40 em solução de Turk (cristal violeta a 0,005% em solução de ácido acético a 2% em PBS) para hemólise de hemácias e coloração dos leucócitos. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico de luz e expressa em milhões de células/ml.

3.5) Revestimento das partículas de látex fluorescentes com PIM e LAM

Partículas de látex fluorescentes (Fluoresbrite[®] PolyFluor[®] 570 microspheres, Polysciences, Inc) de 1 μ m de diâmetro foram centrifugadas a 10.400 rpm por 10 min e lavadas em tampão carbonato 0,05 M duas vezes. Na suspensão contendo as partículas de látex foram adicionados 50 μ g de PIM ou LAM (gentilmente doados por BEI Resources, VA, EUA). Posteriormente, as suspensões foram sonicadas por 5 min e incubados em banho por 1 h a 37°C. Após esse período, as partículas de látex foram lavadas duas vezes com o tampão carbonato e incubadas com 0,5 ml de 5% de BSA em PBS por 2 h no banho a 37°C. Após esse tempo, as partículas de látex foram ressuspensas na solução de 0,5% de BSA em PBS e estocadas a 4°C.

3.6) Cultura de macrófagos derivados de medula óssea e estímulo *in vitro*

Os camundongos foram eutanasiados em câmara de gás carbônico e tiveram o fêmur de ambas as pernas removidas. No fluxo laminar, a cabeça do fêmur foi removida e lavada com 1ml de PBS estéril com auxílio de uma seringa de 1 ml. A suspensão de células foi quantificada e plaqueadas 4×10^6 células/placa de petri no volume de 10 ml do meio RPMI completo (RPMI-1640 + 1 % L-glutamina, 1% penicilina e estreptomicina, + 20% Fetal Bovino + 30% do sobrenadante da cultura de L929). Após 5 dias de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, foi adicionado mais 10 ml do meio RPMI completo como descrito anteriormente e as células permaneceram em incubação até 7º dia. O sobrenadante da cultura foi recolhido e descartado. Para obtenção das células foi adicionado na placa de petri 5 ml de PBS estéril gelado e as células foram incubadas por 20 min a 4°C. Após esse tempo, as células foram recolhidas da placa de petri, quantificadas, ressuspendidas no meio RPMI-1640 contendo 2% SFB e 1% de penicilina e estreptomicina e cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas no fundo de cada poço. Em cada poço foram adicionados 500 µl da suspensão celular ajustada para 1×10^6 células/ml. Os macrófagos foram incubados na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 18 h. As células foram lavadas com PBS e o meio RPMI-1640 2% SFB e 1% de penicilina e estreptomicina foi reconstituído. Para os experimentos com as partículas de látex, alguns grupos foram pré tratados com ácido oleico (AO) 50 µM por 24 h. Os macrófagos foram estimulados com BCG MOI (3:1) ou com partículas de látex revestidas com LAM ou PIM de *M. tuberculosis*, (concentração de 10:1) por 2 h ou 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 2 h, os bacilos e as partículas de látex não internalizadas foram removidos com lavagens com PBS estéril (2x) e o mesmo volume de meio foi reconstituído e permaneceu por mais 2 h na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Nos experimentos utilizando o antagonista de Rab7 (CID 1067700 – Calbiochen), este foi adicionado em cultura após a lavagem para remoção das partículas de látex que não foram internalizadas pelos macrófagos e permaneceram por 2 h na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ para posterior quantificação da associação entre as partículas de latex e os corpúsculos lipídicos.

Os macrófagos também foram estimulados diretamente com o LAM e PIM de *M. tb*, e LAM de *M. smegmatis* por 4 h. Após esses tempos, as células foram fixadas com formalina 3,7% para posterior coloração com tetróxido de ósmio para quantificação dos corpúsculos lipídicos ou marcação fluorescente com Bodipy® 493/503 (1:10000). Os sobrenadantes das culturas foram armazenados a -20°C para posterior quantificação de citocinas e mediadores lipídicos. A viabilidade celular foi quantificada com azul de tripan ao final de cada experimento e foi observado sempre maior que 90%.

3.7) Estimulação *in vitro* de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 foram retirados por meio de lavagem da cavidade com 5 ml de PBS estéril. As células foram quantificadas e cultivadas (1×10^6 células/ poço) em meio RPMI-1640 contendo 2% SFB e 2% de penicilina e estreptomicina 100 u/ml aderidas em lamínulas de vidro redondas no fundo de cada poço em placas de 24 poços. Após o período de 2 h, as células não aderidas foram removidas através de duas lavagens com PBS estéril. Os macrófagos foram deixados na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 18 h em meio RPMI-1640. As células foram lavadas uma vez com PBS e o meio RPMI-1640 foi reconstituído. As partículas de látex foram adicionadas na cultura de macrófagos peritoneais e incubadas por 2 h (concentração de 5:1). Posteriormente as células foram lavadas duas vezes vigorosamente para a retirada das partículas não internalizadas. O meio RPMI-1640 foi reconstituído e as células mantidas em cultura pelos tempos de 1 e 2 h. Durante a última hora de incubação, o meio foi retirado e colocado a sonda fluorescente P96 (ácido 1- pirinododecanóico–Invitrogen) (2 µM) diluído em PBS para a marcação dos corpúsculos lipídicos. A seguir, as células foram lavadas 3x com PBS, fixadas em formalina 3,7% por 10 min e montadas com o meio vectashield (Vector). Os macrófagos também foram pré-tratados por 30 min com C75 na dose de 1 µg/ml e estimulados com BCG (3:1) por 24 h. Os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados para a dosagem de mediadores lipídicos e das citocinas como descrito abaixo. As células foram fixadas em formalina 3,7% por 10 min e os corpúsculos foram corados pela coloração de ósmio e quantificado por microscopia de luz. A viabilidade celular foi quantificada

com azul de tripan ao final de cada experimento e foi observado sempre maior que 90%.

3.8) Dosagem PGE₂ (Ensaio Imuno enzimatico –EIA)

Os níveis de PGE₂ foram dosados diretamente dos sobrenadantes da cultura celular por ensaio imunoenzimático, conforme as instruções do fabricante (Cayman Chemical CO). Amostras foram previamente diluídas em tampão de EIA (Cayman Chemical CO) ou 50 ml/poço da PGE₂ em concentrações padrão em placas de 96 poços pré revestidas com anticorpo anti-IgG de camundongo. Em seguida, foram adicionados o anticorpo monoclonal de camundongo anti-PGE₂ (50 ml/poço) e PGE₂ com colinesterase (50 ml/poço) e incubados por 16 h em temperatura ambiente. Os poços correspondentes ao controle “branco” receberam somente o tampão de EIA e a PGE₂ conjugada com colinesterase. Após esta etapa, a placa foi lavada (5x) com tampão fosfato de potássio 0,01M contendo Tween 20 (Sigma) a 0,05%. Em seguida, foram adicionados o reagente de Ellman, que contém o substrato para a enzima colinesterase (diluído em água deionizada, segundo instruções do fabricante), para revelar a reação. A placa foi incubada sob agitação ao abrigo da luz até ocorrer a reação e lida em leitora de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com o programa Soft Max Pro 5.2, e os resultados da dosagem foram baseados na respectiva curva-padrão. Os resultados foram expressos em ng/ml.

3.9) Dosagem IL-10 e TNF- α (Multiplex)

Kits para a detecção simultânea de citocinas murinas (IL-10 e TNF- α) foram obtidos e ensaiados conforme as recomendações dos fabricantes (Bio-Rad, Hercules, CA; Uspstate, Lake placid, NY). Resumidamente as amostras foram incubadas com microesferas acopladas aos anticorpos específicos. Após 90 min de incubação, foi adicionado o anticorpo de detecção e incubado por 90 min temperatura ambiente no escuro. A estreptavidina acoplada à ficoeritrina foi adicionada aos poços (25 ml/poço) e incubada 10 min temperatura ambiente. Os marcadores não ligados foram lavados utilizando-se um sistema de filtragem a vácuo. As amostras foram analisadas no sistema Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA)

conforme as instruções do fabricante. As análises dos dados foram efetuadas através do Bio-Plex Manager software.

3.10) Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Cultura de macrófagos murinos derivados de medula óssea foi feita em placa de 24 poços sem lamínulas e pré-tratados com o inibidor da enzima ácido graxo sintase (C75 – Cayman), 30 min antes do estímulo com BCG, MOI (3:1) por 24 h. Após o tempo de 2h os macrófagos foram lavados 2x com PBS estéril para a remoção das bactérias que não foram internalizadas. A seguir, as células foram tratadas com 50 µg/ml de gentamicina por 2 h para matar as bactérias que ainda pudessem existir no ambiente extracelular. Após esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até completar o tempo de 24 h de infecção permanecendo com o C75 por todo período. Para a remoção das bactérias do interior do macrófagos, as células foram permeabilizadas com 500 µl de saponina (0,1% em água Mili-Q) por poço. Foi realizada uma diluição de 10x das bactérias em saponina e semeados 100 µl da suspensão de bactérias em tubos contendo meio Lowenstein Jensen (Lj). Os tubos ficaram em estufa com temperatura constante de 37°C por até 30 dias. O crescimento das bactérias foi acompanhado semanalmente. As colônias de BCG foram quantificadas 25 dias após a semeadura. Os tubos contendo o meio Lj foram produzidos e gentilmente doados pela Dra. Maria Cristina da Silva Lourenço- Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios – IPEC – Fiocruz. O número de UFC/ml foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/ml} = [(\text{n}^\circ \text{ de colônias} \times 1000) / \text{suspensão de bactérias}] \times \text{diluição}$$

3.11) Análises por fluorescência

3.11.1) Imunolocalização de Rab5, Rab7, RILP e LAM em macrófagos pleurais

Citoesfregaços (1 x 10⁵ células/lâmina) provenientes da pleurisia induzida por BCG foram fixados em formalina 3% por 10 min, posteriormente as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com triton 0,2% em PBS por 20 min. Após a permeabilização as células foram incubadas com solução de bloqueio, soro de burro

(Jackson Laboratories) 1% em PBS por 1 h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS, Rab5 e Rab7 (1:100) (IgG policlonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology), RILP (1:1000) (IgG policlonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology), LAM (1:100) (IgG policlonal de coelho) por 1 h, após essa incubação as células foram lavadas 3x com PBS por 10 min. Em seguida as células foram incubadas com os anticorpos secundários: anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com Alexa- 546 (Molecular Probes) ou anticorpo de burro anti-coelho conjugado com Cy2 (Jackson Laboratories) diluídos em PBS 1:1000 e incubados por 1 h. Também foi utilizado a sonda fluorescente Bodipy[®] 493/503 na diluição de uso 1:250, por 5 min para a marcação dos corpúsculos lipídicos. Após essas incubações as células foram lavadas 3x com PBS por 10 min e montadas para observação com o meio de montagem vectashield (Vector, Califórnia, EUA).

A especificidade das marcações foi feita usando isotipos controles de IgG de coelho (Jackson Laboratories) no lugar dos anticorpos primários e/ou com o anticorpo secundário sozinho. As lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência ou confocal.

3.11.2) Marcação de bactérias vivas e mortas

Para a marcação fluorescente das bactérias, foi utilizado o kit Baclight (Molecular Probes), onde 3 µl de cada componente (A e B) foram adicionados em 1 ml da solução de BCG (25×10^6 UFC) e incubados por 15 min à temperatura ambiente. As bactérias viáveis e mortas coram-se com o componente A (verde), mas somente as bactérias mortas coram-se também com o componente B (vermelho) como descrito pelo fabricante e por (Almeida e col., 2009).

3.12) Contagem de Corpúsculos Lipídicos

As lâminas foram fixadas em formaldeído a 3,7% em PBS (pH 7,4), em seguida, lavadas em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4) e fixadas em tetróxido de ósmio a 1,5% por 30 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada, tratadas com tetróxido de ósmio a 1,5% reduzido por tiocarbohidrazida a 1% por 5 min. Em

seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, lavadas em tampão de cacodilato 0,1M e contrastadas em tetróxido de ósmio a 1,5% por 3 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, com objetiva de imersão à óleo 100x. Os corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foram contados e os resultados foram expressos como média \pm EPM.

3.13) Quantificação da proximidade entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos

As lâminas foram montadas com o meio de montagem vectashield (Vector, Califórnia, EUA) e fotografadas no microscópio confocal. Foram fotografadas 10 campos aleatórios de cada lâmina. Para uma análise detalhada das células, foram adquiridas aproximadamente 7 camadas de 4 μ m de espessura por imagem. Posteriormente, essas imagens foram analisadas utilizando o Fiji/ImageJ Software. O programa analisou 1 – 5 pixels de distância entre as partículas de látex fluorescentes e os corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy[®] 493/503. Os resultados foram expressos em porcentagem e normalizados de acordo com o número de partículas de látex total internalizadas por grupo segundo a formula abaixo:

% partículas de latex próximas dos CL na distância X = n^0 de partículas de latex próximas dos CL na distância X x 100/ n^0 total de partículas de látex

O índice fagocítico foi obtido através da seguinte fórmula:

Índice fagocítico = $\{[n^0$ de células que fagocitaram ao menos 1 partícula de látex/ n^0 total de células] x 100} x $\{n^0$ total de partículas de látex/ n^0 de células que fagocitaram ao menos 1 partícula de látex}

3.14) Microscopia eletrônica

As células obtidas do lavado torácico do grupo infectado (5×10^6 bacilos/cav de BCG durante 24 h) e do grupo controle foram fixadas em solução de Karnovsky

modificada, constituída de paraformaldeído e glutaraldeído a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3, por 18 h, a 4° C, conforme (Melo, 1999). Em seguida, as células foram lavadas (três vezes) no mesmo tampão, a 4° C, por cerca de 30 min cada. Posteriormente, a suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm por 5 min para obtenção dos precipitados. Estes foram incluídos em ágar a 2%, conforme padronização para suspensões celulares (Melo e col., 2005). Os precipitados de ágar foram imersos em solução de sacarose a 30% em PBS, por 18 h, a 4°C, incluídos em *OCT compound* (Miles, Elkhart, IN), e estocados em nitrogênio líquido para posterior uso. A imunomarcagem foi realizada antes do processamento de inclusão para microscopia eletrônica convencional (*pre-embedding*), pois otimiza a preservação de antígenos e é mais sensível para detectar pequenas moléculas do que a marcação após a inclusão (*post-embedding*). A imunomarcagem foi realizada com partículas diminutas de ouro (*Immunonanogold*) conjugadas com a fração Fc do anticorpo primário em criosecções de 10 µm montadas em lâminas de vidro (Superfrost/Plus, Fisher Scientific). Todas as etapas foram realizadas a temperatura ambiente, como descrito por (Melo e col., 2005). As lâminas contendo as células foram inicialmente incubadas em PBS (5 min) seguida por incubação com PBS e glicina e, posteriormente, com solução tampão PBS-BSA (1% de BSA em PBS) contendo 0,1% de gelatina por 20 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução tampão PBS-BSA contendo 10% de soro normal de cabra (solução de bloqueio) e anticorpo primário para Rab7 (IgG policlonal de coelho anti- Rab7 murina, 10 µg/ml) ou anticorpo primário para ADRP (IgG policlonal de cobaia anti-ADRP, 2 µg/ml) por 1h. Como isotipo controle foi utilizado soro normal de coelho (1:1000). Em seguida, as lâminas foram novamente incubadas (30 min) com solução de bloqueio e incubadas com anticorpo secundário anticorpo de cabra anti-camundongo ou de burro anti- cobaia, ambos conjugados com partícula ouro de 1,4 nm de diâmetro (Nanogold, Nanoprobes, Stony Brook, NY, EU) diluído 1:100 em PBS-BSA, por 1 h. Em seguida as células foram lavadas com PBS-BSA. As células foram pós fixadas com 1% de glutaraldeído (10 min) e incubadas por 10 min com solução para nucleação das partículas de ouro (silver enhancement) (Nanoprobes). Posteriormente, as células foram imersas em solução de 5% de tiosulfato de sódio (5 min), pós fixadas com 1% de tetróxido de ósmio (10 min), contrastadas com 2% acetado de uranila (5 min). O material foi desidratado em etanol e acetona e, em

seguida, processado rotineiramente para inclusão em resina Epon (Eponate 12 Resin; Ted Pella, CA, EU). Posteriormente, foram obtidos os cortes ultrafinos, que foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão (MET).

3.15) Aquisição das imagens

As imagens foram obtidas usando o microscópio de transmissão Philips 300 a 60 kV. As imagens em super resolução foram obtidas utilizando o microscópio Elyra PS1 em conjunto com o programa ZEN (Zeiss). As imagens por microscopia confocal foram adquiridas no microscópio Olympus (Japan) Fluoview FV1000 em conjunto com o programa FV10-ASW 4.1. As imagens foram também adquiridas no microscópio fluorescência Olympus (Japan) IX81 equipada com a camera digital DP72 em conjunto com o programa ImagePro. As análises por microscopia de campo claro foram feitas utilizando o microscópio ótico BX41TF. As imagens foram editadas usando o programa Adobe Photoshop CS5.

3.16) Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM e analisado Segundo ANOVA Newman-Keuls ou teste t não pareado com significância de $p < 0,05$.

4) Resultados

4.1) A infecção pleural por BCG induz aproximação de fagossomas com os corpúsculos lipídicos de macrófagos após 24 h de infecção

O acúmulo de lipídios intracelulares em organelas denominadas corpúsculos lipídicos tem sido comumente encontrada em macrófagos durante infecções clínicas e experimentais por *M. tuberculosis* e *M. bovis*, BCG e *M. leprae* (Riley e col., 1995, D'avila e col., 2006, Mattos e col., 2010).

Alguns estudos têm descrito uma íntima relação entre fagossomas contendo micobactérias e os corpúsculos lipídicos (D'avila e col., 2006, Peyron e col., 2008, Tanigawa e col., 2008). A fim de investigar a interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos, células da cavidade pleural dos animais infectados por BCG 5×10^6 bacilos/cavidade, i.t (24 h) foram recolhidos e imediatamente fixadas em solução de Karnovski modificada, incluídas em ágar, imunomarcadas com partículas de ouro e processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) como descrito por (D'avila e col., 2008). A presença de corpúsculos lipídicos nas células infectadas foi confirmada pela imunomarcção com ouro utilizando uma proteína marcadora de corpúsculos lipídicos, ADRP, que foi encontrada na periferia delimitando os corpúsculos lipídicos elétrons lúcidos induzidos por BCG (Figura 1, seta tracejada). Além disso, esses corpúsculos lipídicos apresentaram-se próximos de um fagossoma contendo material amorfo 24 h após infecção (Figura 1, seta).

Utilizando a microscopia de super resolução, fomos capazes de observar com detalhes a bactéria fluorescente marcado com a sonda fluorescente Syto9 (verde) próximos a corpúsculos lipídicos marcados com a sonda fluorescente LipidToxRed (vermelho) provenientes de macrófagos de animais infectados por 24 h *in vivo* (Figura 2 A). Atráves dessa análise, foi possível observar ainda imagens nítidas que sugerem os corpúsculos lipídicos circundando a bactéria em uma escala $< 0,5 \mu\text{m}$.

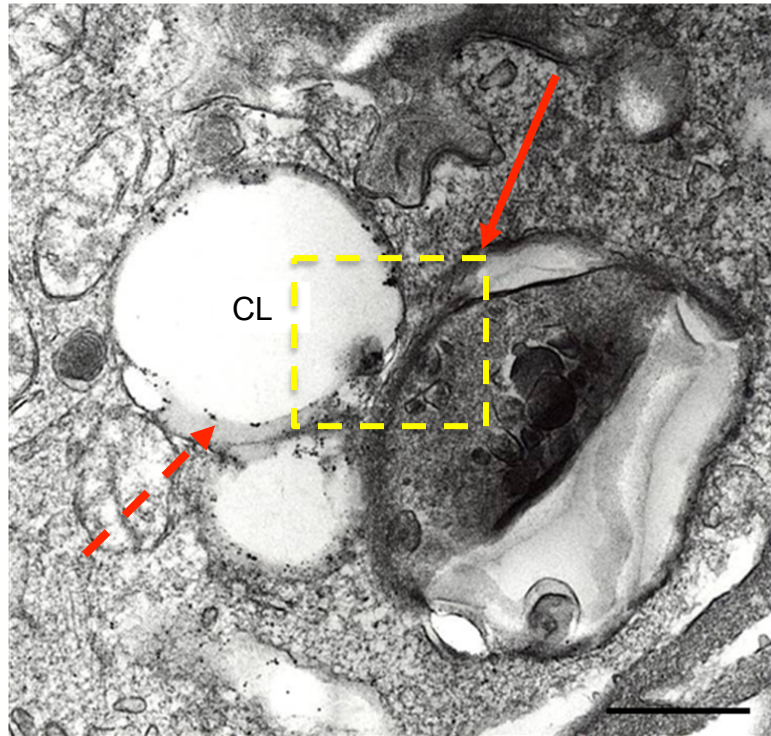


Figura 1. Interação de corpúsculos lipídicos com o fagossoma durante infecção *in vivo* por BCG. Corpúsculos Lipídicos (CL) identificados através da imunomarcagem com ouro para ADRP (seta tracejada) observados por microscopia eletrônica de transmissão como organelas elétron- lúcidas, sem membrana envoltória e com periferia elétron densa. Um fagossoma contendo material amorfo pode ser observado em proximidade (seta) do CL no citoplasma do macrófago (detalhe). Análises por microscopia eletrônica de transmissão de macrófago pleural 24 h após infecção *in vivo* por BCG (5×10^6 bacilos/cavidade). Barra: 1 μ m.

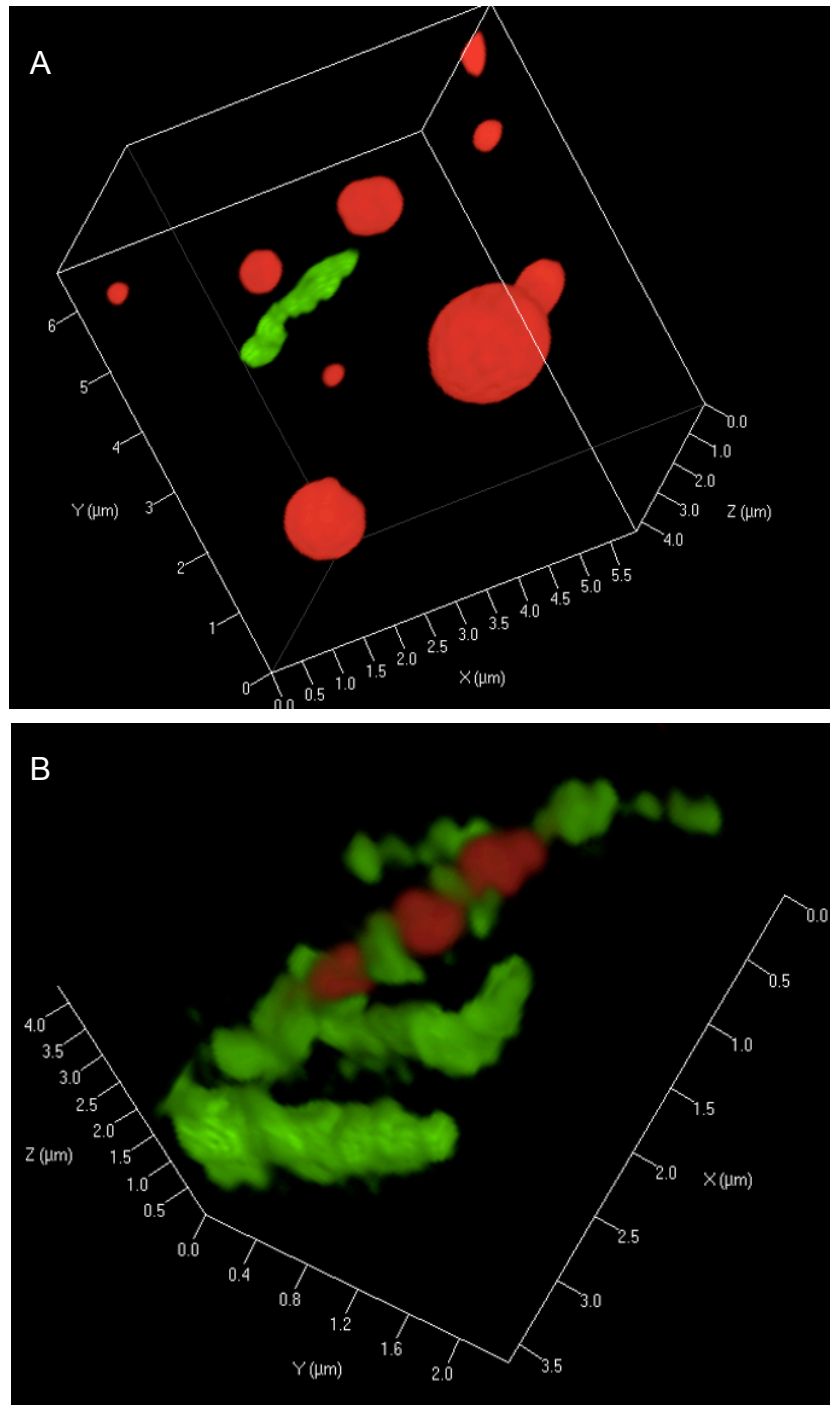


Figura 2. Análise por microscopia de super-resolução da associação dos corpúsculos lipídicos com o *M. bovis*, BCG. Corpúsculos lipídicos marcados com a sonda fluorescente LipidToxRed (vermelho) e BCG marcado com Syto9 (verde) (*Baclight Kit*). (A) Corpúsculos lipídicos próximos da bactéria. (B) Corpúsculos lipídicos entremeando a bactéria. Análises por microscopia de super resolução de bactérias no interior de macrófagos pleurais de camundongos infectados (5×10^6 bacilos/cavidade) i.t por 24 h *in vivo*.

4.2) *A viabilidade bacteriana não é importante para que haja a associação do fagossoma com os corpúsculos lipídicos*

Para avaliar a importância da viabilidade bacteriana nos mecanismos de recrutamento dos corpúsculos lipídicos, camundongos foram infectados através da injeção intratorácica com 5×10^6 bacilos/cavidade com a bactéria marcada, viva (verde) e morta (vermelha). Nossas análises por microscopia de fluorescência demonstraram que os corpúsculos lipídicos aproximam-se tanto de fagossomas contendo a bactéria viva, quanto daqueles que contem a bactéria morta, sugerindo que esta interação independe da viabilidade da bactéria em 24 h da infecção experimental por BCG (Figura 3).

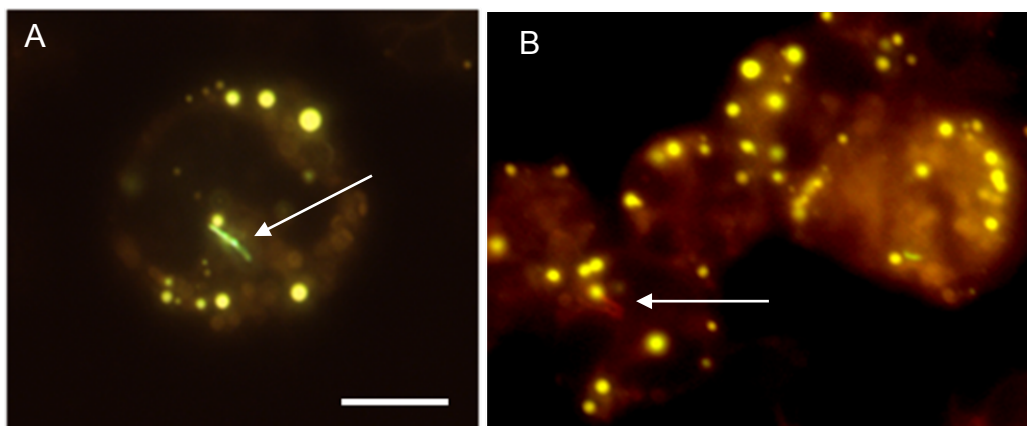


Figura 3. Interação dos fagossomos contendo bactéria viva ou morta com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção *in vivo*. Macrófagos pleurais observados após 24 h de infecção por BCG (5×10^6 bacilos/cavidade) exibindo interação da (A) bactéria viva (seta) e (B) morta (seta), com os corpúsculos lipídicos em amarelo (A e B). Bactérias foram coradas com o kit BacLight e os corpúsculos lipídios marcados com Nile red. Barra: 10 μ m.

4.3) Fagossomas contendo partículas de látex revestidas com lipídios micobacterianos, LAM e PIM, foram observadas próximas dos corpúsculos lipídicos.

Alguns estudos tem sugerido que lipídios micobacterianos podem modular a via endocítica do hospedeiro de maneiras distintas e favorecendo a sobrevivência do bacilo dentro dos fagossomas (Fratti e col., 2001, Vergne e col., 2004). O LAM tem sido descrito como capaz de inibir proteínas efetoras responsáveis pela acidificação fagossomal (Simonsen e col., 1999, Fratti e col., 2001, Gillooly e col., 2001, Fratti e col., 2003, Vergne e col., 2003). De maneira complementar, Verne e col observaram que o PIM induz a fusão dos endossomas primários sugerindo assim um mecanismo para ter acesso aos nutrientes endocitados (Vergne e col., 2004).

Com a finalidade de investigar o envolvimento de componentes da parede micobacteria na interação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos, macrófagos peritoneais foram estimulados por 1 e 2 h com partículas de látex fluorescentes revestidas com LAM ou PIM de *M. tb* ou partículas de látex não revestidas. Por microscopia de fluorescência, pode ser observada a aproximação de fagossomas contendo partículas de látex revestidas com os dois componentes da parede micobacteriana com os corpúsculos lipídicos marcados com a sonda fluorescente P96. Contudo, esse comportamento não foi observado quando foram utilizadas partículas de látex não revestidas (Figura 4).

Com o objetivo de quantificar esses eventos, macrófagos diferenciados de medula ossea foram pré-tratados com ácido oleico (AO) por 24 h e, posteriormente estimulados com as partículas de látex (10:1) revestidas ou não com LAM ou PIM por 2 h. Através da captura das imagens por microscopia confocal e análise das imagens com o programa Fiji/ImageJ, foi possível avaliar a distância das partículas de látex em relação aos corpúsculos lipídicos (Figura 5 e 6). Observamos um aumento de 102,60% no número de fagossomas contendo partículas de látex revestidas com LAM e de 67,88% de fagossomas contendo partículas de látex revestidas com PIM em aproximação ($< 2 \mu\text{m}$), com os corpúsculos lipídicos quando comparadas com as partículas de látex não revestidas (Figura 5 A). Observamos ainda que as partículas de látex revestidas com LAM estão mais próximas dos corpúsculos lipídicos do que as partículas de látex não revestidas em relação à

todas as distâncias analisadas (Figura 6). A fim de investigar se o aumento da aproximação das partículas de látex revestidas com LAM e PIM está relacionada com a taxa de fagocitose das partículas de látex pelos macrófagos, quantificamos o percentual de partículas de látex fagocitadas, a média de partículas de látex/macrófagos e calculamos o índice fagocítico. Observamos uma mesma taxa de fagocitose no grupo das partículas de látex revestidas com LAM quando comparado com o grupo das partículas de látex não revestidas. Contudo, as partículas de látex revestidas com PIM foram 2x mais internalizadas pelos macrófagos de medula do que o grupo controle ou das partículas de látex revestidas com LAM (Figura 7).

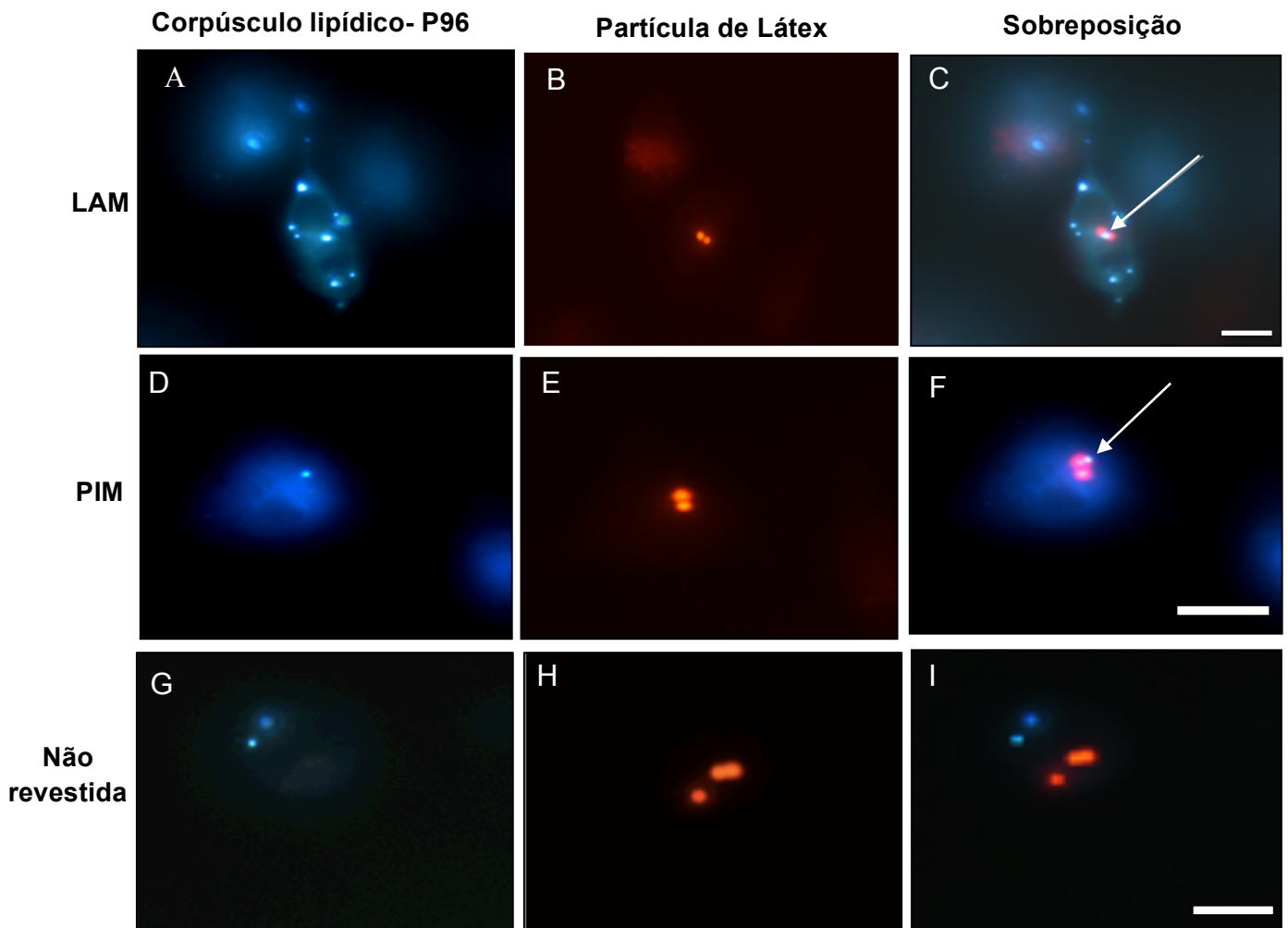


Figura 4. Interação de fagossomas contendo partículas de látex fluorescentes revestidas com componentes da parede micobacteriana com os corpúsculos lipídicos. Macrófagos peritoneais estimulados por 1 h (A-C) e 2 h (D-E) com partículas de látex fluorescentes (vermelho) (5:1) revestidas com LAM (A-C) e PIM (D-E). Em A, D e G os corpúsculos lipídicos foram marcados com a sonda fluorescente P96 (azul). Em C e F sobreposição das imagens mostrando a proximidade dos corpúsculos lipídicos com as partículas de látex revestidas por microscopia de fluorescência. (G - I) Controle, partículas de látex não revestidas. Barra: 10 μ m.

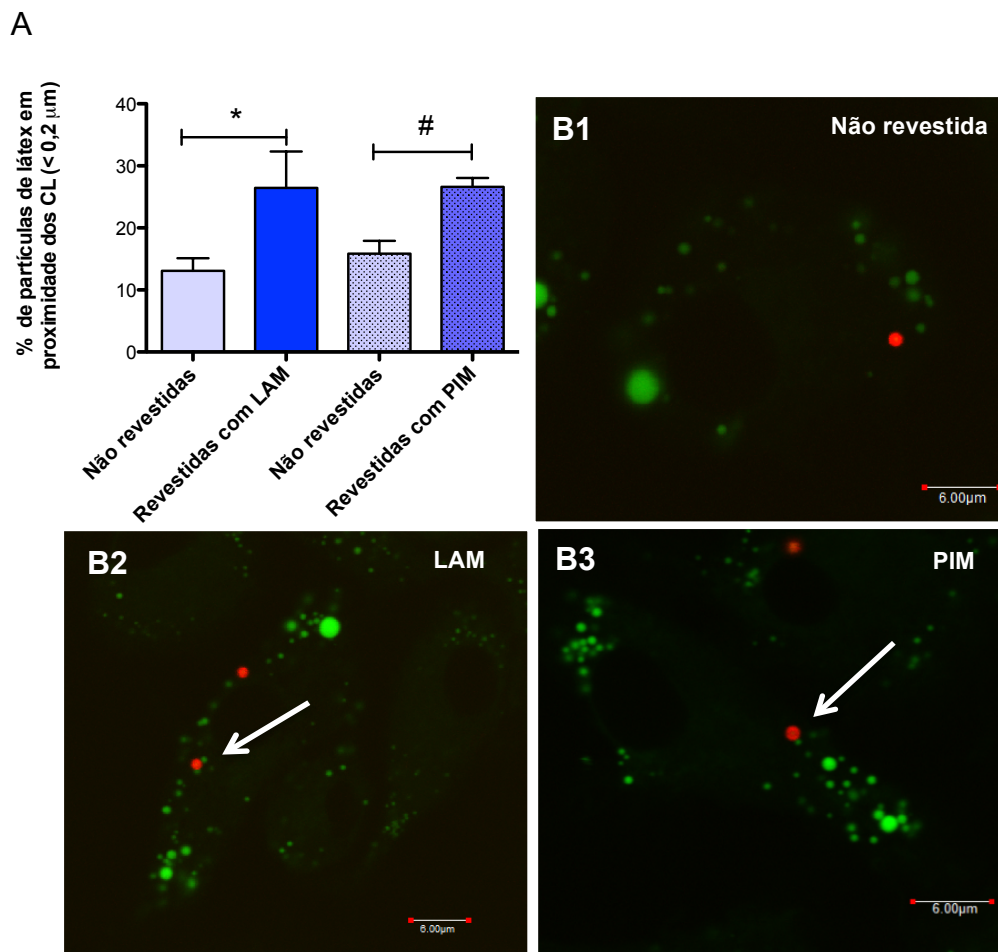


Figura 5. Avaliação da distância entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos. Macrófagos derivados de medula óssea pré- tratados com AO por 24 h, e posteriormente, estimulados com as partículas de látex fluorescentes (vermelho) por 2 h. Corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy[®] (verde). (A) Distância < 0,2 μm entre as partículas de látex revestidas ou não e os corpúsculos lipídicos. (B) Imagens da aproximação para quantificação realizadas por microscopia confocal. (B1) Partículas de látex não revestidas, (B2) partículas de látex revestidas com LAM, (B3) partículas de látex revestidas com PIM. Foram capturados 10 campos/grupo e analisadas aproximadamente 250 células/grupo. Foram feitas análises de pelo menos 7 camadas por imagem. Quantificação da distância realizada por Fiji/ImageJ Software. (A) * diferença estatística entre o grupo não revestido e revestido com LAM. Média ± EPM de 5 experimentos independentes. # diferença estatística entre o grupo não revestido e revestido com PIM. Média ± EPM de 3 experimentos independentes. * e #, $p < 0,05$. Barras: 6 μm.

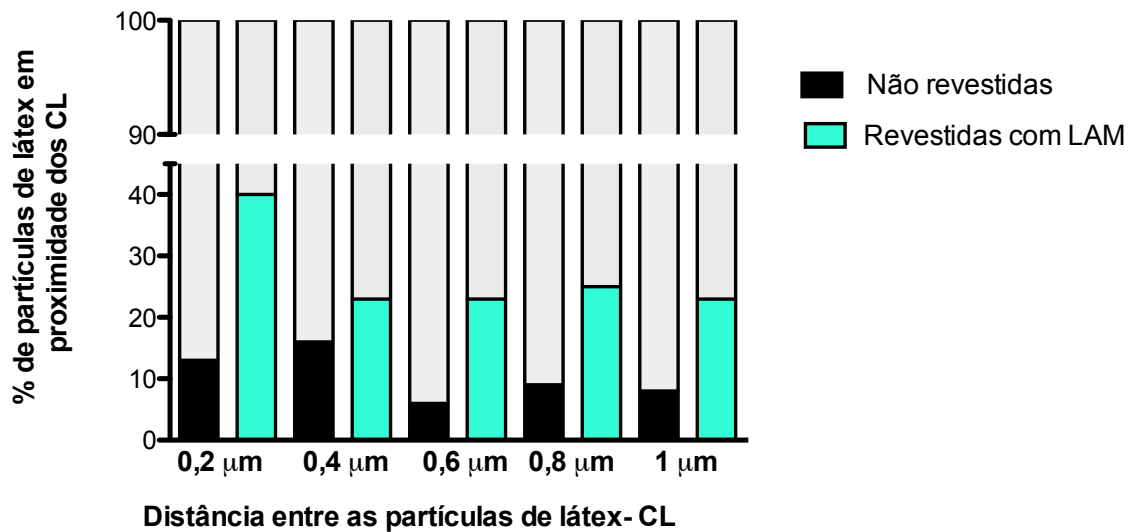


Figura 6. Distância entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos. Macrófagos derivados de medula óssea pré- tratados com AO por 24 h, e posteriormente, então estimulados por 2 h com as partículas de látex fluorescentes revestidas com LAM ou não revestidas. Corpúsculos lipídicos foram marcados com Bodipy[®]. Foram analisadas as distâncias das partículas de látex em relação aos corpúsculos lipídicos no intervalo de 0,2 μm a 1 μm. Foram capturados 10 campos/grupo e analisadas aproximadamente 250 células/grupo por microscopia confocal. Foram feitas análises de pelo menos 7 camadas por imagem. Análise da distância foi realizada por Fiji/ImageJ Software. Gráfico representativo de 5 experimentos independentes.

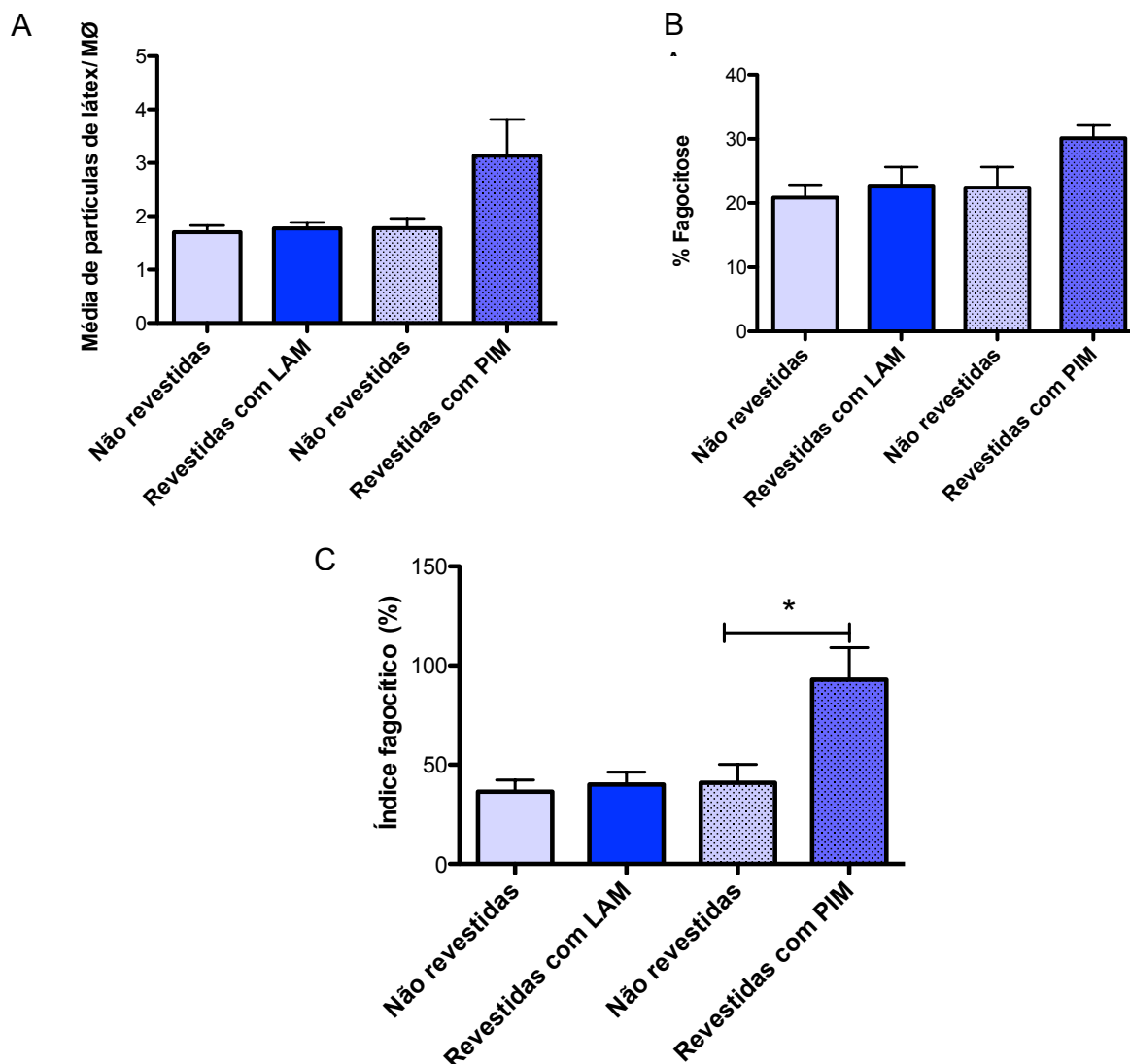


Figura 7. Análise da fagocitose das partículas de látex pelos macrófagos. Macrófagos derivados de medula óssea pré- tratados com AO por 24 h, e posteriormente, estimulados com as partículas de látex fluorescentes (vermelho) por 2 h. Corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy® (verde). (A) Foram quantificadas a média de partículas de látex fagocitadas por macrófago. (B) % de partículas de látex fagocitadas. (C) Índice fagocítico. Foram capturados 10 campos/grupo e analisadas aproximadamente 250 células/grupo. Cada grupo representa a média \pm EPM de 3 – 5 experimentos independentes. * p < 0,05.

4.4) *A proteína Rab7, mas não a Rab5 está co-localizada com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção in vivo*

Algumas funções têm sido atribuídas aos corpúsculos lipídicos, devido a presença de diversas proteínas nestas estruturas, como enzimas necessárias para a síntese de eicosanóides (D'avila e col., 2006), proteínas envolvidas com a sinalização celular (Yu e col., 1998, Yu e col., 2000) e proteínas envolvidas com tráfego de membranas (Bartz e col., 2007, Wan e col., 2007).

A fim de investigar o papel de corpúsculos lipídicos na via endocítica durante a infecção experimental por BCG, analisamos por imunofluorescência a presença das proteínas Rab5 (marcador de endossoma primário) e Rab7 (marcador de endossoma secundário) nos macrófagos obtidos de animais infectados. Observamos que apesar da Rab5 estar localizada próxima dos corpúsculos lipídicos, elas não se encontram co-localizadas dentro destas estruturas (Figura 8 D-F). No entanto, quando avaliamos a localização da Rab7 na célula, de maneira interessante, foi observada a presença da proteína co-localizada com os corpúsculos lipídicos (Figura 8 G-I).

Confirmando estes dados, nossas análises ultraestruturais mostraram que os corpúsculos lipídicos induzidos por BCG apresentavam Rab7 em sua periferia através de imunomarcação com ouro 24 h após infecção (Figura 9 C). Foi observado ainda a interação dos corpúsculos lipídicos com o fagossoma infectado através dos locais de maior acúmulo de Rab7 das duas organelas (Figura 9 B e C).

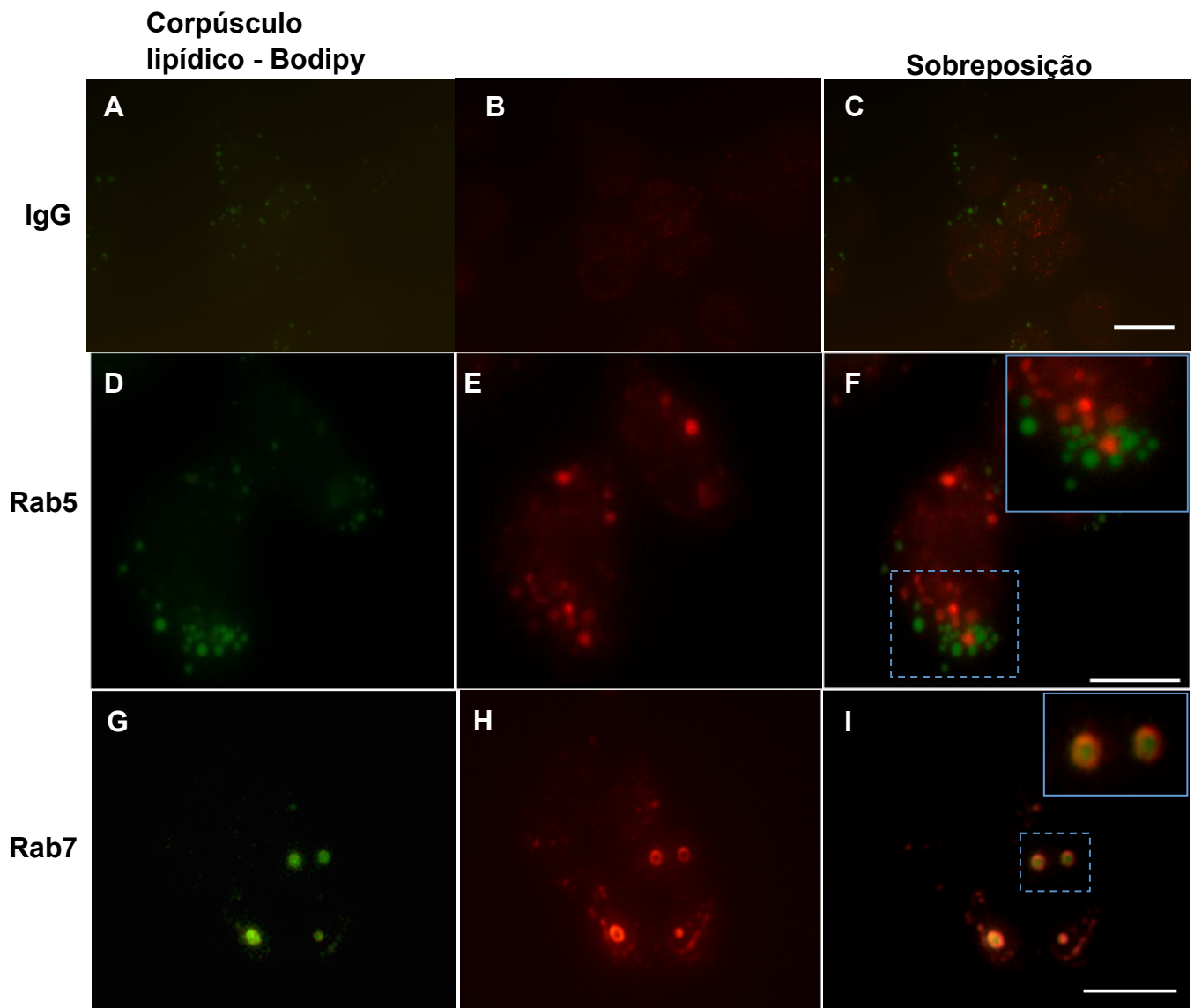


Figura 8. Co-localização da proteína Rab7 com corpúsculos lipídicos induzidos por BCG. (A,B,C) IgG de coelho foi utilizado como controle do anticorpo primário. (B,C,D) Imunolocalização para Rab5 e (E,F,G) para Rab7 em macrófagos pleurais após 24 h de infecção por BCG (5×10^6 bacilos/cavidade) *in vivo*. (A,D,G) Corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy® (verde) e (F) Na imagem de sobreposição podemos observar que a Rab5 (vermelho) não está presente (destaque) nos corpúsculos lipídicos (I) Podemos observar em destaque a co-localização da proteína Rab7 (vermelho) com os corpúsculos lipídicos induzidos durante a na infecção por BCG. Barra: 10 μ m.

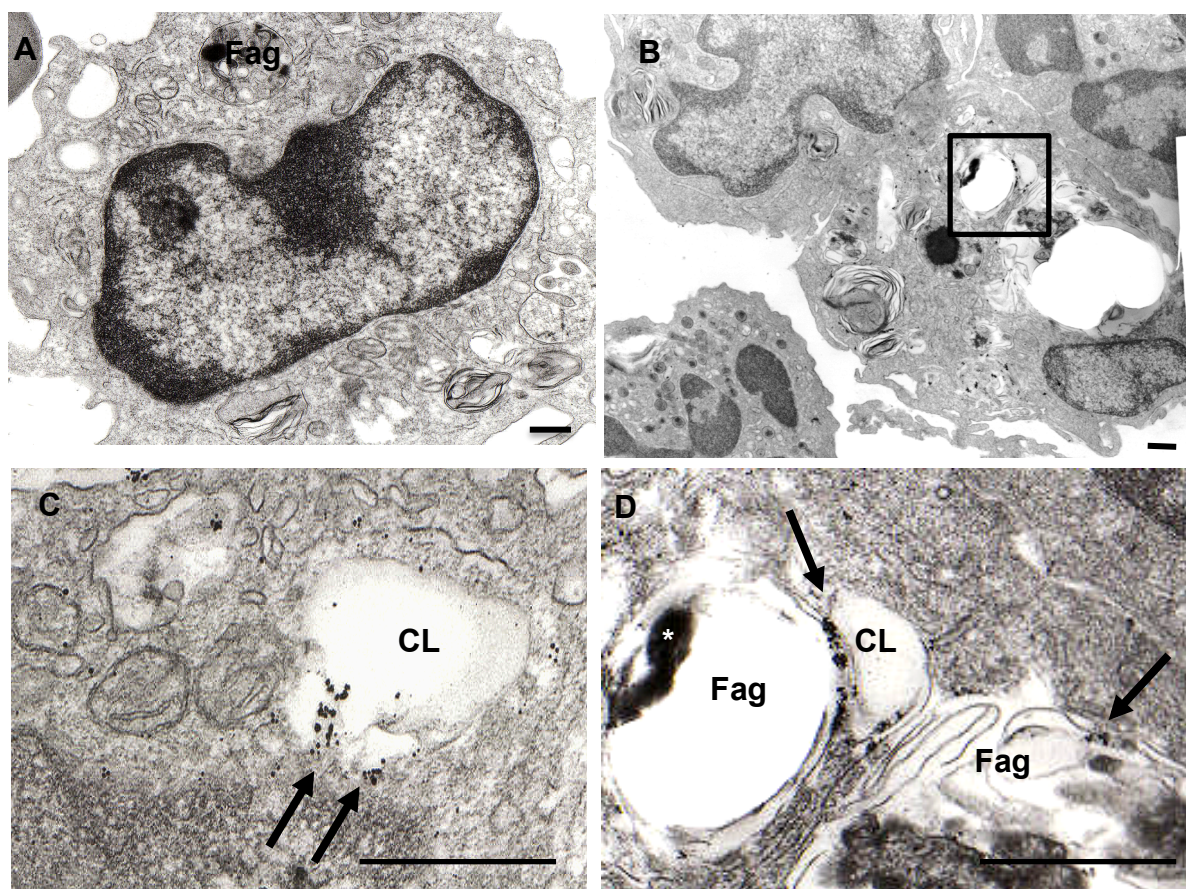


Figura 9. Imunomarcaco com partículas de ouro da proteína Rab7 nos corpúsculos lipídicos induzidos pela infeco por BCG *in vivo*. (A) Soro normal de coelho foi utilizado como controle negativo da imunomarcaco. (B e D) Corpúsculos lipídicos (CL) em associao com fagossomos contendo bactérias (*), ambos apresentam marcao para Rab7 (setas). (C) Corpúsculo lipídico apresenta através da imunomarcaco com ouro para a proteína Rab7 (seta) a presença dessas proteínas na sua periferia. (D) detalhe da imagem B. Análises realizadas por microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos obtidos após 24 h de infeco por BCG *in vivo*. Fag = fagossoma; Barras = 1 μ m.

4.5) A proteína Rab7 presente nos corpúsculos lipídicos está na sua forma ativa

A Rab7 é uma pequena GTPase responsável pelas fases mais tardias via endocítica (Stenmark, 2009). Para que ocorra a maturação fagossomal (formação do fagolisossoma), é necessário a ligação da proteína efetora da Rab7, a RILP (*rab-interacting lysosomal protein*), que interage exclusivamente com a Rab7 na sua forma ativa (GTP) (Cantalupo e col., 2001). Dessa forma, a RILP tem sido descrita como um marcador do estado de ativação da Rab7, além de ser responsável por recrutar o complexo motor dineína-dinactina resultando na fusão dos fagossomos com os lisossomos (Harrison e col., 2003).

Após a confirmação da presença da proteína Rab7 nos corpúsculos lipídicos, investigamos o seu estado de ativação, observando por imunofluorescência a presença da proteína RILP. Análises por microscopia de confocal demonstraram a co-localização da RILP nos corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy[®] (Figura 10) induzidos após 24 h de infecção *in vivo* por BCG em camundongos C57Bl/6.

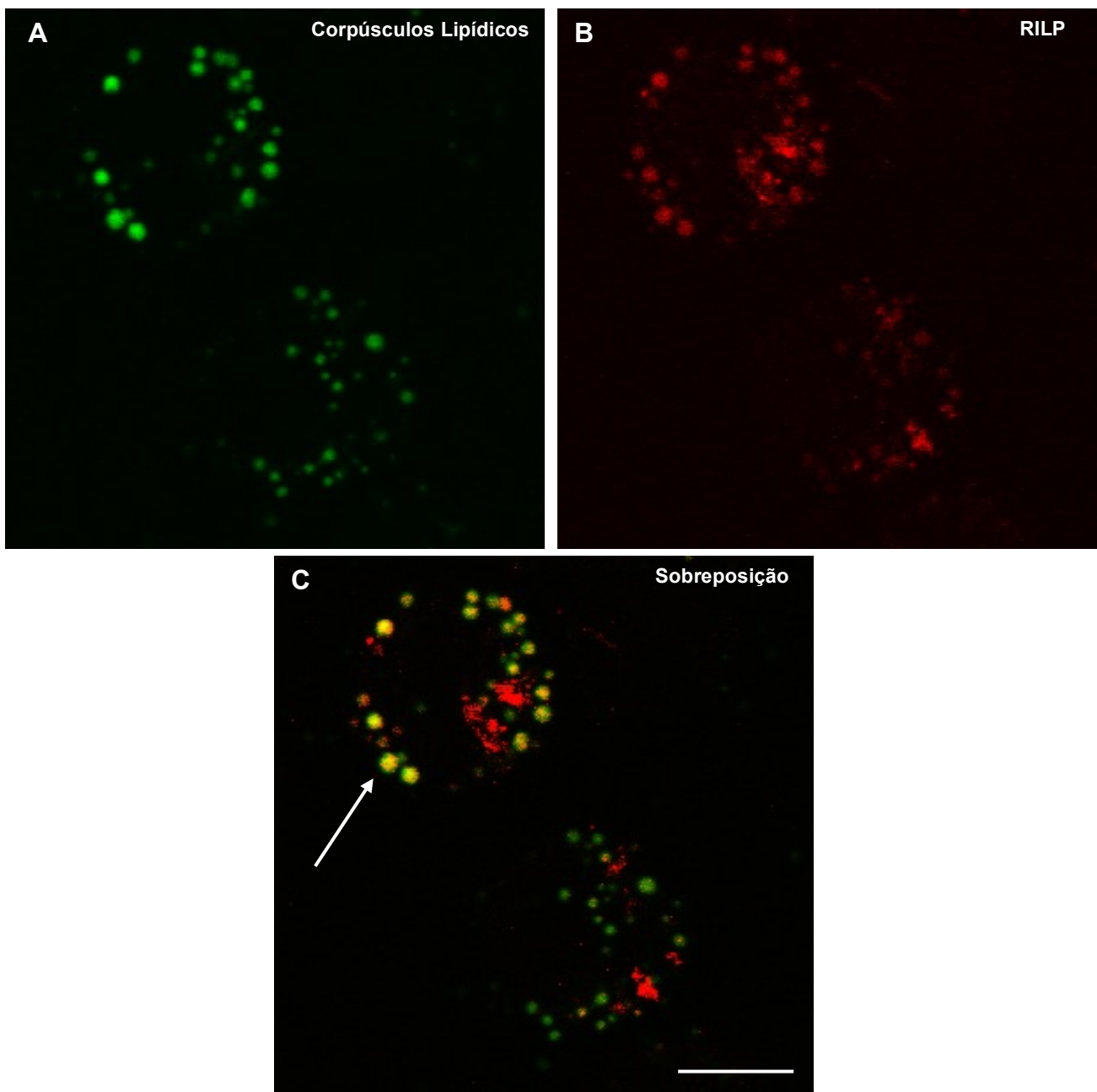


Figura 10. Co-localização da proteína RILP em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG. (A) Marcação para corpúsculo lipídico com Bodipy® (verde) e (B) Imunolocalização para RILP (vermelho) em macrófagos. (C) Na imagem de sobreposição podemos observar que a RILP está co-localizada (em amarelo, seta), com os corpúsculos lipídicos, em 48 h de infecção por BCG *in vivo* (5×10^6 bacilos/cavidade). Análise por microscopia de confocal. Barra = 10 μ m.

4.6) *Inibidor da proteína Rab7, CID 1067700, inibe a aproximação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos*

Como descrito anteriormente, foi observada a presença da proteína Rab7 na periferia nos corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG. O papel de ancoragem de vesículas atribuída a essa proteína nos fez investigar o seu envolvimento no mecanismo de associação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos. Para responder essa pergunta, utilizamos o modelo experimental no qual demonstramos que partículas de látex revestidas com LAM possuem um papel fundamental na aproximação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos. Sendo assim, foram utilizados macrófagos derivados de medula estimulados com as partículas de látex fluorescentes por 2 h e, em seguida, tratados com o inibidor por competição de Rab7, CID1067700, nas doses de 0 e 20 nM por 2 h. Os resultados demonstraram que a aproximação dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas contendo as partículas de látex revestidas com LAM foi totalmente inibida após o tratamento com o inibidor CID 1067700 (Figura 11 A).

Com a finalidade de normalizar a quantidade de corpúsculos lipídicos no sistema excluindo a possibilidade de associações ao acaso com as partículas de devido às diferenças no número de dessas organelas entre os grupos, utilizamos AO (50 μ M) 24 antes do estímulo. Dessa maneira, macrófagos derivados de medula óssea foram pré- tratados ou não com AO por 24 h, e posteriormente, estimulados com as partículas de látex fluorescentes por 2 h e, em seguida, tratados com o inibidor de Rab7, CID1067700, nas doses de 0, 20 e 200 nM. Os resultados demonstraram o tratamento com CID1067700 (nas doses de 20 nM e 200 nM) por 2 h causou uma inibição parcial da aproximação entre os corpúsculos lipídicos e as partículas de látex revestidas com LAM quando os macrófagos foram pré-tratados com AO (Figura 12 A). Contudo, houve um aumento da aproximação dos corpúsculos lipídicos com as partículas de látex não revestidas durante o tratamento com CID1067700 nas doses de 20 e 200 nM, quando comparadas com o controle sem tratamento (Figura 12 A). O tratamento com o inibidor CID 1067700 não foi capaz de interferir na taxa de fagocitose das partículas de látex sem revestir ou revestidas com LAM nos macrófagos de medula com ou sem AO (Figura 11 e 12 B). Ainda, o

tratamento com o CID1067700 não foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos de medula com ou sem AO (Figura 11 e 12 C).

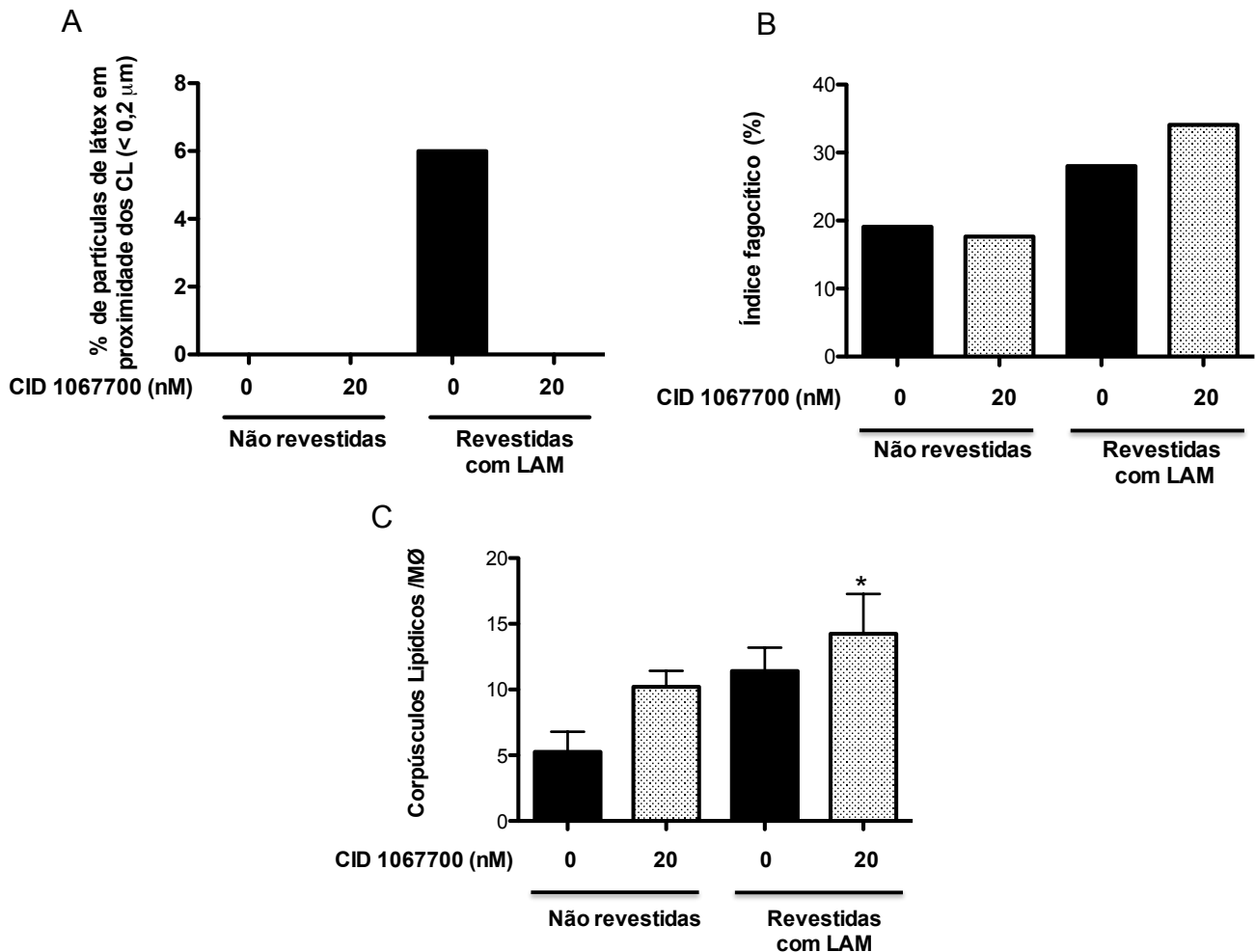


Figura 11. Análise do papel da proteína Rab7 na associação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos. Macrófagos derivados de medula óssea foram estimulados com as partículas de látex fluorescentes revestidas ou não com LAM por 2 h e tratados com o inibidor de Rab7, CID1067700 nas doses de 0 e 20 nM. (A) distância <math>< 0,2 \mu\text{m}</math> entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos. (B) Índice fagocítico. (C) Quantificação dos corpúsculos lipídicos por microscopia de confocal após marcação com Bodipy[®]. Foram capturados 10 campos/grupo e analisadas aproximadamente 250 células/grupo. Foram feitas análises de pelo menos 7 camadas por imagem. Análise da distância e do número de corpúsculos lipídicos foi realizada por FIJI/ImageJ Software. Representativo de 2 experimentos independentes. * diferença estatística entre o grupo controle e partículas de látex revestidas com LAM tratados com 20 nM de CID, * $p < 0,05$.

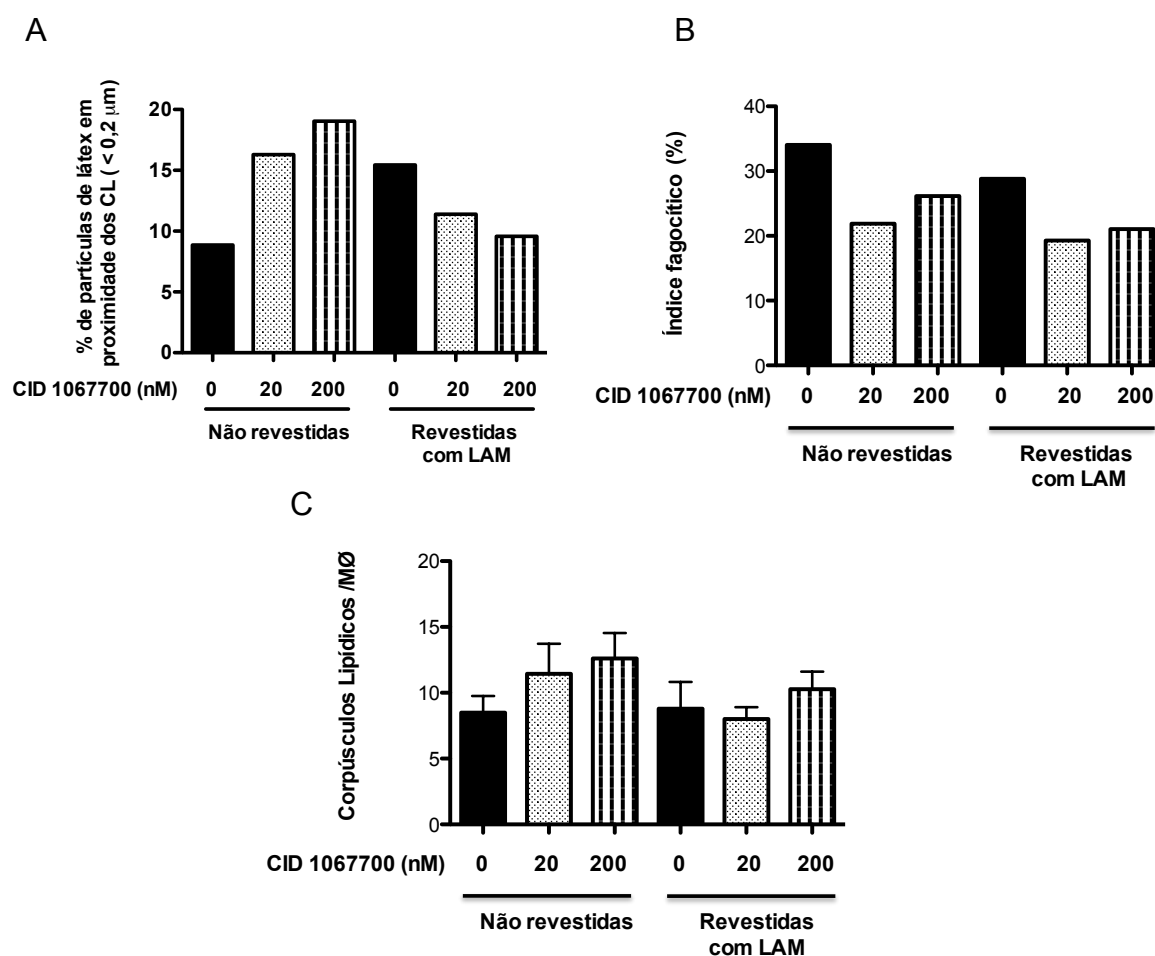


Figura 12. Análise do papel da proteína Rab7 na associação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos pré tratados com AO. Macrófagos derivados de medula óssea foram pré- tratados com AO por 24 h e em seguida estimulados com as partículas de látex fluorescentes revestidas ou não com LAM por 2 h e tratados com o inibidor de Rab7, CID1067700 nas doses de 0, 20 e 200 nM. (A) distância <math>< 0,2 \mu\text{m}</math> entre as partículas de látex e os corpúsculos lipídicos. (B) Índice fagocítico. (C) Quantificação dos corpúsculos lipídicos por microscopia de confocal após marcação com Bodipy[®]. Foram capturados 10 campos/grupo e analisadas aproximadamente 250 células/grupo. Foram feitas análises de pelo menos 7 camadas por imagem. Análise da distância e do número de corpúsculos lipídicos foi realizada por FIJI/ImageJ Software. Representativo de 2 experimentos independentes.

4.7) Durante a infecção por ocorre o tráfego de lipídios bacterianos e do hospedeiro entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas

Considerando a aproximação entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas contendo bactérias como um mecanismo ativo dependente do lipídio bacteriano LAM e o possível papel dos corpúsculos lipídicos na sobrevivência e escape do bacilo frente a resposta imune do hospedeiro, investigamos se haveria tráfego de lipídios micobacterianos/hospedeiro durante a infecção por BCG *in vitro* e *in vivo*.

Sendo assim, avaliamos a presença do lipídios micobacterianos nos corpúsculos lipídicos, através da marcação por imunofluorescência para o LAM em macrófagos de medula infectados por 24 h com BCG e observamos a co-localização desse lipídio com os corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy® (Figura 13 C). De forma interessante, o LAM se apresenta na periferia dos corpúsculos lipídicos (Figura 13 C e E- detalhe).

De forma complementar, análises por MET demonstraram macrófago pleural contendo corpúsculos lipídicos elétron-lúcidos (CL) e grandes fagossomas no citoplasma (Figura 14 A, setas). Em destaque, é possível observar o fagossoma com o contendo acúmulo lipídico (verde) e bactéria no interior deste (asterisco) (Figura 14 Ai). Essa figura demonstra a internalização do corpúsculo lipídico pelo fagossoma contendo a bactéria, e esta imersa em conteúdo lipídico durante infecção *in vivo* por BCG, no tempo de 24 h (Figura 14).

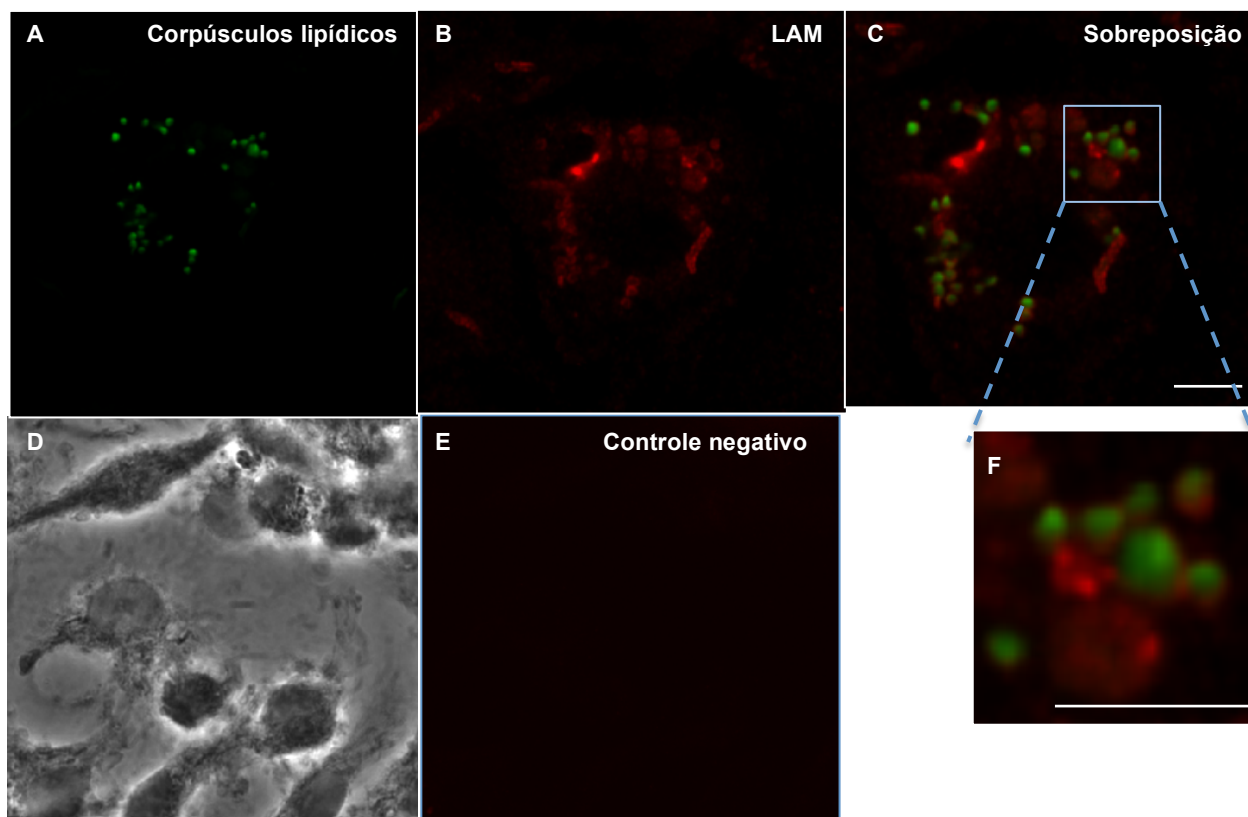


Figura 13. LAM de *M. bovis* BCG co-localiza com corpúsculos lipídicos de macrófagos após 24 h de infecção por BCG *in vitro*. (A) Marcação para corpúsculos lipídicos com Bodipy® e (B) Imunolocalização para LAM em macrófagos derivados de medula óssea. (C) Na imagem de sobreposição podemos observar que o LAM (vermelho) está co-localizado com os corpúsculos lipídicos (verde) (Figura E, detalhe) em 24 h de infecção por BCG *in vitro* (MOI 1:1). (D) Imagem por contraste de fase do controle com o anticorpo secundário sozinho. (E) Controle negativo com o anticorpo secundário. Análise por Microscopia Confocal. Barras = 5 μ m.

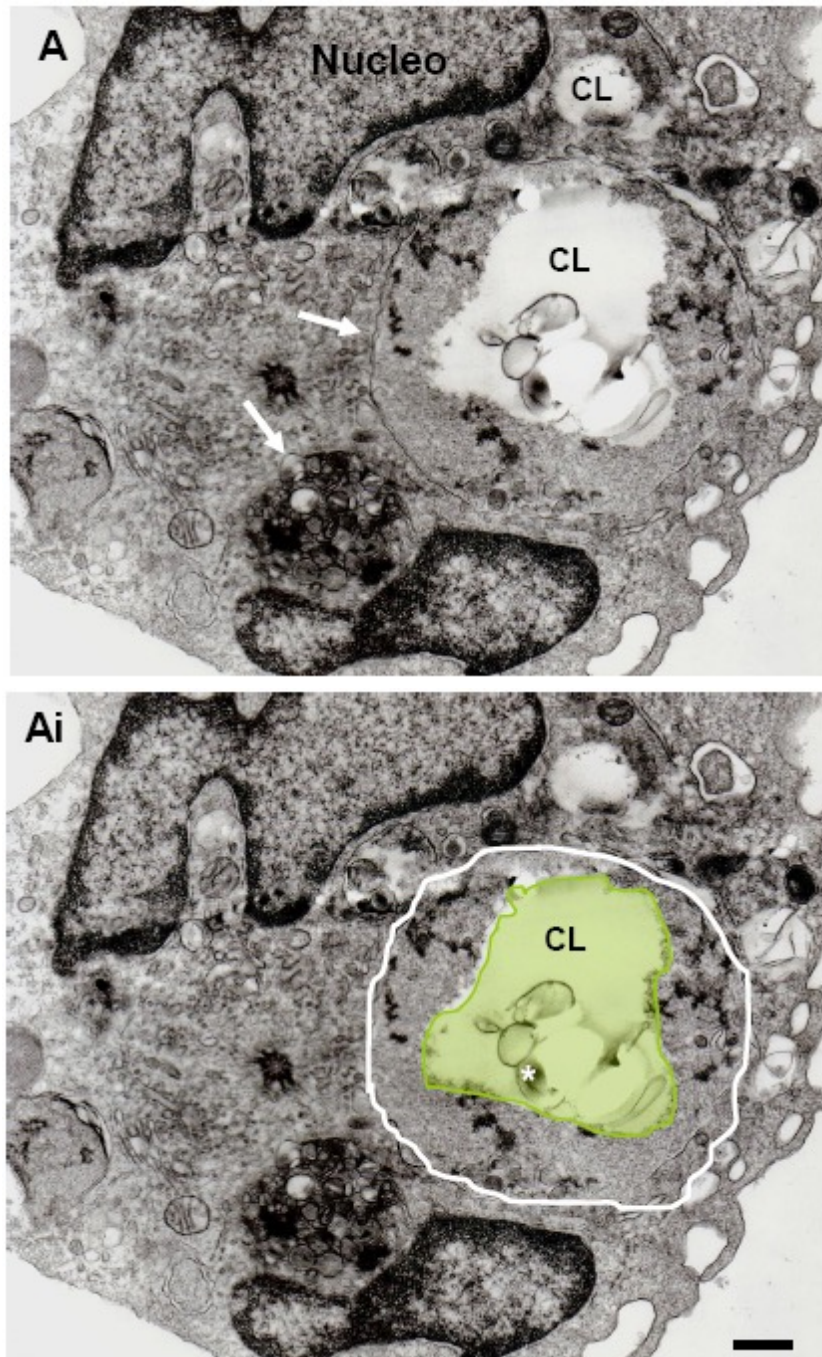


Figura 14. Corpúsculos lipídicos no interior do fagossoma contendo BCG em macrófago pleural. Macrófago pleural com morfologia de célula ativada, exibindo fagossomos (setas) e corpúsculos lipídicos elétron-lucidos (CL) (A). Em destaque, grande fagossomo que se fundiu com um corpúsculo lipídico (CL) (Ai). Material de origem lipídica em verde. Bactéria fagocitada é observada dentro do fagossoma (*). Análise por microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos pleurais infectados por BCG durante a infecção experimental por 24 h *in vivo*. Barra= 1 μ m.

4.8) Indução da formação dos corpúsculos lipídicos é um fenômeno altamente regulado e não depende da fagocitose

Apesar dos constantes avanços na compreensão dos mecanismos pelos quais as micobacterias induzem a formação dos corpúsculos lipídicos, esse fenômeno ainda não se encontra totalmente esclarecido (D'avila e col., 2006, Almeida e col., 2014).

A fim de analisar o papel de componentes da parede micobacteriana na indução dos corpúsculos lipídicos, macrófagos diferenciados de medula foram estimulados por 4 h com LAM ou PIM de *M. tuberculosis* e LAM de *M. segmatis* e coradas com tetróxido de ósmio. Observamos que o LAM de *M. tb* foi capaz de induzir um aumento na formação dos corpúsculos lipídicos quando comparados com o controle não estimulado. Contudo, PIM de *M. tb* e LAM de *M. segmatis*, micobactéria não patogênica, não foram capazes de induzir a formação dessas organelas (Figura 15 A). A seguir, estimulamos os macrófagos de medula com partículas de látex não revestidas e partículas de látex revestidas com LAM de *M. tb* por 4 h. A formação de corpúsculos lipídicos foi quantificada após a marcação dessas organelas com Bodipy[®]. Observamos um aumento no número de corpúsculos lipídicos induzidos pelas partículas de látex revestidas com LAM de *M. tb*. As partículas de látex não revestidas não foram capazes de induzir a formação dessas organelas (Figura 15 B).

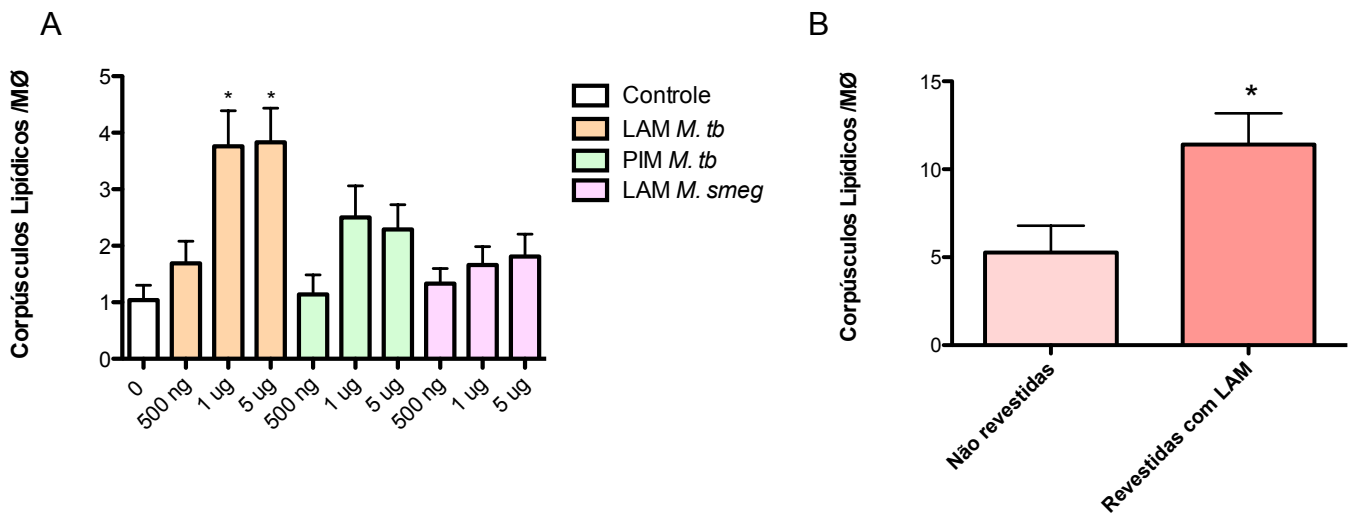


Figura 15. Indução da formação de corpúsculos lipídicos por LAM de *M. tb*. (A) Macrófagos derivados de medula estimulados com LAM, PIM de *M. tb* e LAM de *M. smegmatis* nas concentrações de 500 ng, 1 e 5 µg/ml por 4 h. (B) Macrófagos derivados de medula estimulados com partículas de látex não revestidas e revestidas com LAM de *M. tb* (10:1) por 2 h. (A) As células foram coradas com tetroxido de ósmio e os corpúsculos quantificados por microscopia de luz. (B) Quantificação dos corpúsculos lipídicos por microscopia de fluorescência após marcação com Bodipy®. (A) foram quantificadas 100 células. (B) Foram quantificadas células de 10 campos aleatórios. * p< 0,05.

4.9) O inibidor de ácido graxo sintase (C75), inibe a formação de corpúsculos lipídicos e está envolvido na modulação de mediadores inflamatórios e citocinas

Diversos trabalhos tem relacionado o aumento da formação dos corpúsculos lipídicos por patógenos intracelulares como *T. cruzi*, *Leishmania*, *M. leprae* e *M. bovis*, BCG com a modulação do sistema imune do hospedeiro para um perfil anti-inflamatório favorecendo a permanência do patógeno (Almeida e col., 2009, D'avila e col., 2011, Arcanjo e col., 2015).

Com o objetivo de observar o papel dos corpúsculos lipídicos na modulação da síntese de mediadores inflamatórios e citocinas, macrófagos peritoneais foram pré-tratados com o inibidor da enzima ácido graxo sintase (C75), 30 min antes da infecção por BCG (24 h).

Observamos que a infecção por BCG foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, contudo a sua formação foi parcialmente inibida pelo tratamento com 1 µg/ml de C75 (Figura 16 A).

Diversos trabalhos do nosso grupo demonstraram que os corpúsculos lipídicos são sítios de síntese de PGE₂ (D'avila e col., 2006, D'avila e col., 2011). Sendo assim, investigamos o efeito do C75 na produção de PGE₂ por macrófagos durante infecção por BCG. Observamos que a síntese de PGE₂ foi inibida após o tratamento com o C75 em paralelo à inibição dos corpúsculos lipídicos (Figura 16 B).

Estas inibições ocorrem concomitante à diminuição expressiva da síntese da citocina anti-inflamatória IL-10 e o aumento da citocina pro-inflamatória TNF-α analisadas durante o pré-tratamento dos macrófagos infectados com 1 µg/ml de C75 (Figura 17).

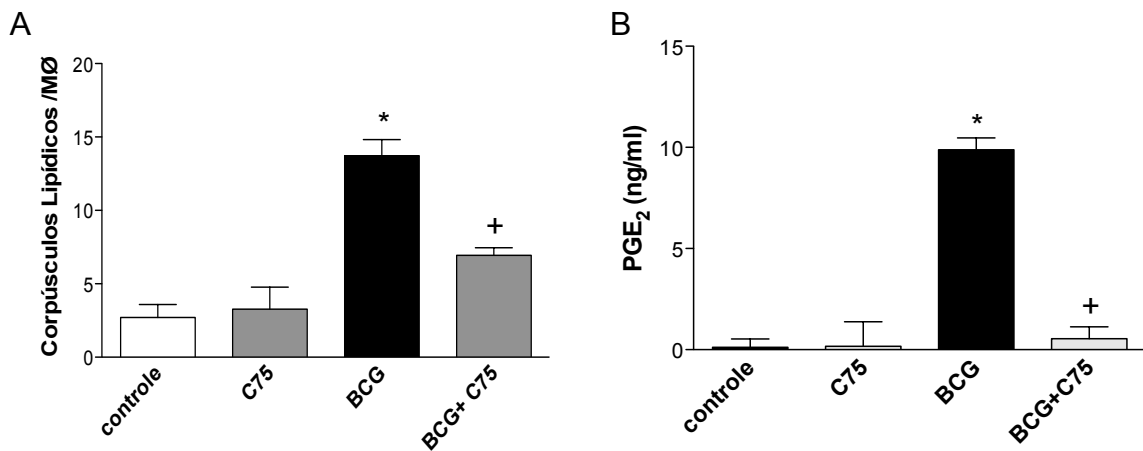


Figura 16. Inibição da formação de corpúsculos lipídicos e da síntese de PGE₂ após o pré tratamento com C75 durante a infecção por BCG *in vitro*. Macrófagos peritoniais foram pré-tratados com C75 na dose de 1 µg/ml 30 min antes da infecção *in vitro* por BCG (MOI 3:1) por 24 h. (A) O número de corpúsculos lipídicos por célula foi analisado após a coloração por tetróxido de ósmio e quantificação por microscopia de luz. Foram quantificadas 50 células consecutivas. (B) Os níveis de PGE₂ foram dosados por EIA dos sobrenadantes da cultura. * diferença estatística entre o grupo BCG e o controle, + diferença estatística entre o grupo BCG e os tratados. Media ± EPM. * e + (p < 0,05).

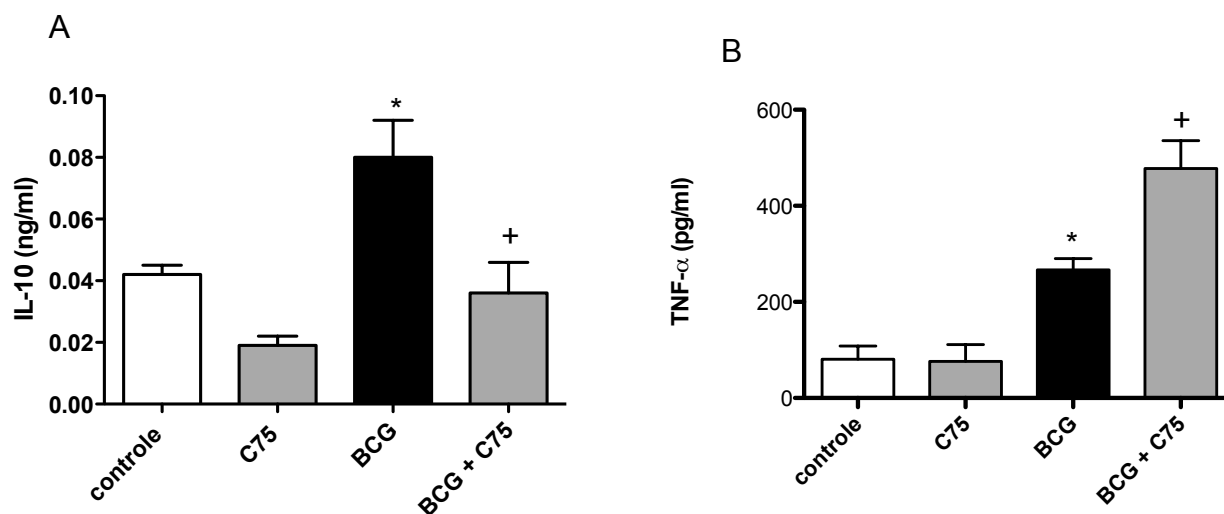


Figura 17. Modulação da síntese de e citocinas após o pré tratamento com C75 durante a infecção por BCG *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram pré-tratados com C75 na dose de 1 µg/ml 30 min antes da infecção *in vitro* por BCG (MOI 3:1) por 24 h. Os níveis de IL-10 e TNF-α foram dosados por ELISA nos sobrenadantes da cultura. Média ± EPM. Diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos estimulados ($p < 0,05$) estão indicados por * e entre os grupos BCG e tratados por +.

4.10) A inibição da formação dos corpúsculos lipídicos pelo C75, está envolvida com a sobrevivência bacteriana

A literatura recente tem sugerido um importante papel para os corpúsculos lipídicos na sobrevivência de patógenos intracelulares (Almeida e col., 2009, Mattos e col., 2011).

Dessa forma, investigamos o impacto da inibição dos corpúsculos lipídicos pelo C75 na sobrevivência bacteriana. Como descrito anteriormente, observamos que a infecção por BCG foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, contudo a sua formação foi parcialmente inibida pelos tratamentos de 0,5; 1 e 2 $\mu\text{g/ml}$ de C75 (Figura 18 A). A seguir, avaliamos a viabilidade bacteriana através da quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) em meio Lj. Nesse experimento, observamos uma diminuição parcial da sobrevivência bacteriana com o pré-tratamento com C75 nos macrófagos infectados com BCG *in vitro* (Figura 18 B), sugerindo o envolvimento dessas organelas na sobrevivência do patógeno.

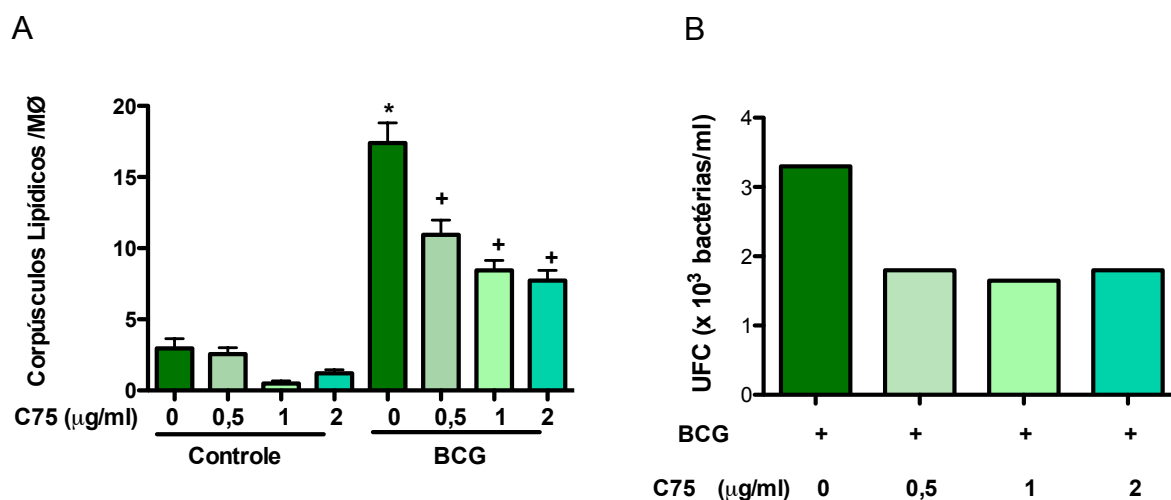


Figura 18. O pré-tratamento com C75 diminui a sobrevivência bacteriana durante a infecção por BCG *in vitro*. Macrófagos derivados de medula óssea foram pré-tratados com C75 nas doses de 0,5; 1 e 2 µg/ml 30 min antes da infecção *in vitro* por BCG (MOI 3:1) por 24 h. (A) As células foram coradas com tetróxido de ósmio e os corpúsculos lipídicos quantificados por microscopia de luz. (B) As células foram permeabilizadas para a remoção das bactérias intracelulares e o sobrenadante semeado em tubos contendo meio Lj. Análise da duplicata de cada amostra lisada. (A) Foram quantificadas 100 células consecutivas. * diferença estatística entre o grupo BCG e o controle, + diferença estatística entre o grupo BCG e o tratado. Média ± EPM. * e + p < 0.05. (B) Representativo de 2 experimentos independentes.

5) Discussão

A tuberculose é doença de patogenicidade complexa onde a interação patógeno-hospedeiro não se encontra totalmente esclarecida. Uma característica interessante da patologia ainda pouco estudada é o acúmulo intracelular de lipídios bem como, a diferenciação dos macrófagos em células espumosas que tem sido observada durante a infecção tanto em condições clínicas quanto experimentais (Ridley e Ridley, 1987, D'Avila e col., 2006, Kim e col., 2010, Neyrolles, 2014).

Nesse trabalho investigamos os mecanismos de associação dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas durante a infecção pelo *M. bovis*, BCG e o papel de componentes da parede micobacteriana e proteínas da via endocítica nesse fenômeno. A nossa hipótese central é que os corpúsculos lipídicos possam estar favorecendo a infecção micobacteriana através da interação com os fagossomas, bem como pela modulação da resposta imune do hospedeiro, favorecendo assim a sua persistência intracelular.

Diversos estudos têm descrito uma íntima relação entre os corpúsculos lipídicos e fagossomas contendo micobactérias. Análises utilizando microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas com a finalidade de melhor observar a interação entre estas duas organelas. Nossos resultados mostraram por meio de imunomarcação para ADRP com partículas de ouro que os corpúsculos lipídicos estão em associação com os fagossomas em 24 h de infecção por BCG *in vivo*. Dados semelhantes foram observados por Melo e col onde foi observada a interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos durante a infecção por outro patógeno intracelular, o *T. cruzi*, em macrófagos (Melo e col., 2003, D'Avila e col., 2006, Melo e Dvorak, 2012).

De maneira complementar, através do auxílio da microscopia de super-resolução, observamos a organização espacial dos corpúsculos lipídicos marcados com a sonda fluorescente LiptoxRed, próximos do BCG. A partir dessas imagens foi possível observar a presença dos corpúsculos lipídicos intercalando com a bactéria presente em macrófagos pleurais durante a infecção por 24 h com BCG *in vivo*. Corroborando com nossos dados, foi observado por Mattos e col., fagossomas contendo *M. leprae* totalmente preenchido e circundado por corpúsculos lipídicos marcados com a sonda fluorescente P96 em macrófagos (Mattos e col., 2011). Esses dados sugerem que a associação entre corpúsculos lipídicos induzidos pela

infecção e fagossomas contendo micobactéria não é um evento ao acaso e, que pode influenciar o curso da infecção.

Durante nossas análises por microscopia de fluorescência observamos que existe uma proximidade dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas quando utilizamos tanto a bactéria viva, quanto a bactéria morta, no tempo de 24 h da infecção experimental por BCG *in vivo*, sugerindo um papel para os componentes da parede micobacteriana na modulação dessa interação. Assim, investigamos o papel de alguns componentes da parede micobacteriana nesse evento. Para isso, utilizamos um modelo experimental em que macrófagos foram estimulados com partículas de látex revestidas com moléculas micobacterianas. Nossos resultados mostraram a interação de partículas de látex revestidas com LAM e PIM de *M. tb* com os corpúsculos lipídicos, além de também ter sido observado o mesmo fenômeno com TDM e monomicolato trealose (TMM) (dados não mostrados). Contudo, esse fenômeno não foi observado quando foram utilizadas partículas de látex não revestidas. Sugerindo que esses lipídios micobacterianos podem estar modulando a interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos.

De fato, com o auxílio do programa de análise de imagem, ImageJ, observamos um aumento de 102,60% no número de partículas de látex revestidas com LAM de *M. tb* de 67,88% de PIM de *M. tb* a menos de 0,2 μm dos corpúsculos lipídicos quando comparadas com as partículas de látex não revestidas. Ainda, foi possível observar uma distribuição homogênea do percentual das partículas de látex não revestidas próximas dos corpúsculos lipídicos nas distâncias de 0,2 μm à 1 μm . Quando avaliamos a distribuição das partículas de látex em relação aos corpúsculos lipídicos, observamos um aumento das partículas de látex revestidas com LAM próximas dos corpúsculos lipídicos na distância de 0,2 μm e uma distribuição menor e homogênea nas distâncias de 0,4 μm à 1 μm .

Apesar da taxa de fagocitose das partículas de látex revestidas com outro componente da parede micobacteriana, o PIM ter sido 126,86% maior que as partículas de látex não revestidas ou revestidas com LAM, o aumento da aproximação das partículas de látex revestidas com PIM com os corpúsculos lipídicos foi 34,72% menor quando comparado com as partículas de látex revestidas com LAM. Esses dados sugerem que as partículas de látex revestidas pelos diferentes lipídios podem ser fagocitadas de maneiras distintas pelos macrófagos, e

que o fenômeno de aproximação dos fagossomas contendo as partículas revestidas com os corpúsculos lipídicos é, em parte, independente do índice de fagocitose destas partículas. Villeneuve e col., observaram através da inibição do receptor de complemento CR3 a diminuição da internalização de partículas de látex revestidas com PIM, contudo não houve diferença na fagocitose das partículas de látex controle, revestidas somente com BSA (Villeneuve e col., 2005). Já foi descrito que tanto o PIM quanto o LAM são reconhecidos e fagocitados pelo receptor de manose e são capazes de induzir diferentes respostas nas células do hospedeiro (Vergne e col., 2004, Torrelles e col., 2006). Esses dados sugerem também que os receptores podem ser expressos de maneiras distintas nos macrófagos de medula estimulados com as partículas de látex não revestidas e revestidas com LAM e PIM.

Complementando nossos dados, observamos que não houve diferença na taxa de fagocitose das partículas de látex revestidas ou não com LAM. Dessa forma, a aproximação entre as partículas de látex revestidas com LAM e os corpúsculos lipídicos parece ser um evento específico, uma vez que não é dependente do número de partículas internalizadas.

A proteína Rab7 possui um papel fundamental coordenando o ancoramento e fusão de uma série de vesículas e organelas (Bucci e col., 2000, Zhang e col., 2009, Sun e col., 2010). Uma característica comum ao *M. tuberculosis* e ao BCG é a capacidade de reter a proteína Rab5 no fagossoma, impedindo a troca pela Rab7 e, conseqüentemente, a maturação fagossomal (Fratti e col., 2001; Via e col., 1997). Esse é um importante mecanismo utilizado para o escape micobacteriano que ainda não está elucidado.

Em nosso trabalho, investigamos a presença dessas proteínas nos corpúsculos lipídicos, durante infecção experimental por BCG. Observamos por imunofluorescência que apesar da proteína Rab5 se apresentar próxima dos corpúsculos lipídicos, ela não foi observada co-localizada nestas organelas. Por outro lado, quando investigamos a proteína Rab7, observamos que a mesma encontrava-se co-localizada com os corpúsculos lipídicos. Resultados semelhantes de colocalização de Rab7 com os corpúsculos lipídicos foram observados no modelo de indução de autofagia em hepatócitos (Schroeder e col., 2015). Contudo, nesse trabalho o autor sugere que a Rab7 atue como uma importante proteína para

a lipólise dos corpúsculos lipídicos em células sob stress nutricional (Schroeder e col., 2015).

Nossas análises por MET confirmaram a presença da Rab7 nos corpúsculos lipídicos e identificaram a interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos exatamente na área de maior acúmulo de Rab7. Esse dado sugere que a Rab7 pode estar sendo seqüestrada para os corpúsculos lipídicos, como um mecanismo para impedir a maturação fagossomal e/ou atuando como reguladora para a interação entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas. Para que a Rab7 presente nos fagossomas complete as etapas subseqüentes da via endocítica culminando com a maturação fagossomal, é necessária a sua ligação com a sua proteína efetora, a RILP (Jordens e col., 2001, Harrison e col., 2003). A RILP é a proteína responsável por recrutar o complexo motor associado aos microtubulos, a dineína-dinactina, e possui como importante função a fusão dos fagossomos com os lisossomos. Além disso, a vasta literatura tem caracterizado a RILP como um marcador de ativação da proteína Rab7 pela sua capacidade de se ligar a ela somente quando está na sua forma ativa (GTP) (Cantalupo e col., 2001, Johansson e col., 2007).

Nossos resultados de imunofluorescência revelaram que, a exemplo da Rab7, a RILP está presente nos corpúsculos lipídicos em 24 (dados não mostrados) e 48 h após a infecção experimental por BCG *in vivo*, sugerindo que a Rab7 se encontra na sua forma ativa. Análises semelhantes foram feitas por Schroeder e col., que demonstraram a presença da Rab7 ativa através da análise da RILP nos corpúsculos lipídicos purificados de células HuH7 (Schroeder e col., 2015).

Esses dados sugerem que os corpúsculos lipídicos induzidos pela infecção por BCG podem sequestrar a Rab7 ativa, afim de evitar a maturação fagossomal, e/ou sendo responsável pelo movimento centrípeto entre as duas organelas através da ligação com a sua proteína efetora, a RILP. Através da análise por MET e fluorescência, Harrison e col descreveram o papel da RILP na extensão e fusão de túbulos formados entre organelas da via endocítica (fagossomas tardios e lisossomas) de células RAW estimuladas com partículas de látex opsonizadas (Harrison e col., 2003). Devemos considerar ainda que essas proteínas podem funcionar como uma ponte entre corpúsculos lipídicos e fagossomas, no nosso modelo experimental.

Continuando a investigar o papel da Rab7 na aproximação de fagossomas contendo bactérias com os corpúsculos lipídicos, utilizamos o inibidor de competição para Rab7, CID1067700 (Agola e col., 2012). Através do modelo pré-estabelecido de aproximação dos corpúsculos lipídicos com partículas de látex e análise das imagens pelo programa ImageJ, observamos que o tratamento com o CID1067700 na dose de 20 nM foi capaz de inibir a aproximação dos fagossomas contendo as partículas de látex revestida com LAM com os corpúsculos lipídicos. Corroborando com nossos dados, um estudo demonstrou que a inibição da Rab7 por siRNA de células Hep3B foi capaz de impedir o recrutamento de MVB (*multi vesicular bodies*) para próximo dos corpúsculos lipídicos no modelo de indução de autofagia induzida por privação nutricional (Schroeder e col., 2015).

Quando analisamos a taxa de fagocitose das partículas de látex e a formação de corpúsculos lipídicos após o tratamento com CID1067700 em macrófagos de medula, observamos que não houve alteração desses parâmetros quando comparados com o controle não tratado. Resultados semelhantes foram observados por Schroeder e col, onde foi observado que a inibição da Rab7 pelo siRNA não foi capaz de alterar o número de corpúsculos lipídicos em hepatócitos (Schroeder e col., 2015). No mesmo estudo, foi observado que a inibição da Rab7 com o CID1067700, bem como por siRNA, foi capaz de aumentar a área dos corpúsculos lipídicos no modelo de stress nutricional em linhagem primaria de hepatócitos murinos e Hep3B, respectivamente.

Associação entre fagossomas e corpúsculos lipídicos também tem sido descrito em infecções com *M. leprae*. Mattos e col., descreveram no modelo de infecção por *M. leprae* em células de Schwann o recrutamento de corpúsculos lipídicos para perto de fagossoma contendo a micobactéria em um mecanismo dependente de microtubulos e de filamentos de actina. A aproximação entre fagossomas contendo *M. leprae* e os corpúsculos lipídicos foi inibida após o tratamento das células com taxol (estabilizante de microtúbulos), citocalasina D (inibidor da polimerização da actina) e LY294002 (inibidor de PI3K) por 4 h após a infecção prévia com o bacilo por 6 h sem inibir a formação dos corpúsculos lipídicos (Mattos e col., 2010).

Com o objetivo minimizar a probabilidade de que as associações entre as partículas de látex revestidas estivessem ocorrendo devido ao número aumentado de corpúsculos lipídicos no grupo com as partículas de látex revestidas com LAM,

adicionamos AO nos macrófagos 24 h antes do ensaio, para aumentar o número de corpúsculos lipídicos no citoplasma.

Nós observamos que houve uma diminuição semelhante na aproximação dos fagossomas contendo partículas de látex revestidas com LAM após o tratamento com 20 e 200 nM CID1067700, concordando com o ensaio sem AO. Entretanto, foi observado um aumento na aproximação das partículas de látex não revestidas após o tratamento com CID1067700 nas doses de 20 e 200 nM. Os mecanismos envolvidos nesta maior aproximação das partículas de látex não revestidas após o tratamento com CID1067700 não estão claros. No entanto, não podemos descartar alterações que envolvem a dinâmica de microtúbulos, nem as possíveis diferenças na composição lipídica e proteica dos corpúsculos lipídicos observados durante estimulação com ácidos graxos ou induzidos por um agente infeccioso. Análises da composição lipídica de biópsias de pacientes com hanseníase *borderline* (ou dimorfa) e hanseníase lepramatosa - forma mais grave da doença e de maior multiplicação do bacilo - mostraram uma importante diferença no seu perfil lipídico. A hanseníase lepramatosa foi caracterizada pela prevalência do colesterol e colesterol éster em contraste com o aumento de triacilglicerol observado na hanseníase *borderline* (Mattos e col., 2014). O mesmo perfil metabólico foi observado em macrófagos infectados com *M. leprae in vitro* quando comparados com o controle não infectado, sugerindo que o patógeno pode estar modulando a biosíntese e a entrada de lipídios na célula (Mattos e col., 2014). Da mesma forma, a análise proteômica dos corpúsculos lipídicos induzidos durante a infecção pelo bacilo intracelular *Chlamydia trachomatis*, demonstrou composição proteica diferente da observada no controle não infectado, incluindo proteínas envolvidas com o metabolismo lipídico e proteínas próprias do patógeno (Saka e col., 2015).

A literatura recente demonstrou um papel interessante para a SapM, fosfatase ácida secretada por *M. tb* e BCG. Foi observado no modelo de autofagia por privação nutricional que a SapM se liga a Rab7 impedindo a ligação dos lisossomas e conseqüente inibindo a acidificação dos autofagossomas (Hu e col., 2015). Dessa forma, nossos dados sugerem que a modulação da aproximação entre as partículas de látex revestidas com LAM e os corpúsculos lipídicos pode ser ainda mais complexa. De maneira interessante, a inibição da associação entre os corpúsculos lipídicos e a micobactéria através do tratamento com taxol, citocalasina D e

LY294002 diminuiu a viabilidade bacteriana, sugerindo um papel dessa interação em favor da infecção (Mattos e col., 2010).

Nossos dados mostram pela primeira vez um importante papel para o LAM micobacteriano e a proteína Rab7 na aproximação entre os fagossomas e corpúsculos lipídicos, contudo, a função e o mecanismo dessa associação ainda precisam ser mais investigados.

Através de análises ultraestruturais investigamos as etapas subsequentes da interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos. Durante 24 h de infecção por BCG *in vivo* observamos estruturas sugestivas de corpúsculos lipídicos no interior dos fagossomas contendo bactérias. Sugerindo a fusão entre as duas organelas com a perda de continuidade da membrana dos corpúsculos lipídicos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Russell e col., que observaram, não só a interação entre essas organelas, mas a presença de um fagossoma contendo o *M. tuberculosis* no interior de um corpúsculo lipídico, em estágios já avançados da infecção (Russell e col., 2009). Além disso, nossos resultados mostram ainda a bactéria embebida no conteúdo lipídico presente no fagossoma. Corroborando com nossos dados, imagens por microscopia confocal mostraram os fagossomas contendo *M. leprae* envolvidos pelos corpúsculos lipídicos nas células de Schwann (Mattos e col., 2010). Esses dados mostram que há troca de lipídios do hospedeiro advindos da interação com os corpúsculos lipídicos. Alguns autores sugerem que os lipídios do hospedeiro possam estar sendo metabolizados e utilizados pela micobactéria atuando como fonte de carbono ou ainda atuando como armaduras protegendo a bactéria do sistema imune hospedeiro (D'avila e col., 2006, Pandey e Sasseti, 2008, Daniel e col., 2011, Mattos e col., 2011, Almeida e col., 2014).

De maneira interessante, nossos dados de imunofluorescência mostraram a presença de LAM de BCG co-localizado com os corpúsculos lipídicos após 24 h de infecção *in vitro*. O LAM micobacteriano tem sido descrito como um componente da parede micobacteriana de papel fundamental para a sobrevivência do bacilo dentro das células. A mutação estrutural no LAM de *M. tb*, torna a cepa mais sensível ao tratamento com β -lactâmicos e menos virulentas durante a infecção *in vivo* (Fukuda e col., 2013). Kang e col., demonstraram que a ligação do ManLam de *M. tb* com o MR inibe a maturação fagossomal em macrófagos humanos favorecendo a

sobrevivência do bacilo (Kang e col., 2005). Ainda, foi observada que a incorporação do LAM via *lipid rafts* resulta na diminuição da maturação fagossomal (Hayakawa e col., 2007, Welin e col., 2008).

Nesse trabalho, observamos pela primeira vez dados sugestivos de recrutamento ativo das partículas de látex revestidas com LAM e os corpúsculos lipídicos (induzidos pelo LAM ou previamente induzidos com AO) e que esse mecanismo é dependente da proteína Rab7. De maneira interessante, através de análises por imunofluorescência observamos a presença do lipídio LAM do BCG no interior dos corpúsculos lipídicos durante a infecção *in vitro*. Esse dado inédito na literatura corrobora com os dados de Beatty e col que demonstraram o tráfego de lipídios da parede celular de BCG de fagossomas infectados para outras organelas durante a infecção em macrófagos *in vitro* (Beatty e Russell, 2000, Beatty e col., 2001)

Contudo, ainda não está claro se a presença desse lipídio micobacteriano nos corpúsculos lipídicos é proveniente da interação entre as duas organelas ou pela saída do LAM dos fagossomas (Beatty e Russell, 2000). A proteína ESAT-6/ESAT-6:CFP-10 traduzida pela região RD1 encontrado no *M. tb* mas ausente no BCG, é capaz de permeabilizar a membrana fagossomal e liberar fatores de virulência (Gao e col., 2004, Guinn e col., 2004, Houben e col., 2012). Beatty e col., demonstraram a presença de proteínas micobacterianas em organelas subcelulares e em células não infectadas durante a infecção tanto por BCG quanto por *M. tb* em cultura de macrófagos *in vitro* (Beatty e col., 2000, Beatty e Russell, 2000). Dessa forma, torna-se necessário investigar os mecanismos pelos quais o LAM é incorporado aos corpúsculos lipídicos. Esse conjunto de dados sugerem um novo e importante papel para o LAM micobacteriano mediando a interação entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas.

Como descrito anteriormente, os corpúsculos lipídicos são estruturas dinâmicas, altamente reguladas que aumentam em número e tamanho durante a infecção por BCG em leucócitos. Vários trabalhos tem demonstrado que a biogênese dessas organelas está envolvida com a prevalência da infecção (D'avila e col., 2006, D'avila e col., 2007, Almeida e col., 2009).

A ausência de determinados componentes da parede micobacteriana tem sido amplamente correlacionada com a diminuição da virulência do patógeno (Fukuda e

col., 2013). Nosso trabalho demonstrou que o LAM de *M. tb*, mas não o PIM de *M. tb* ou o LAM de *M. smegmatis* foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos de medula *in vitro*. Corroborando com esses dados, as partículas de látex revestidas com LAM de *M. tb* foram capazes de induzir a formação dessas organelas quando comparado com o controle de partículas de látex não revestidas. Resultados semelhantes foram observados por D'Ávila e col., onde o LAM de BCG foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos *in vitro* (D'avila e col., 2006). De maneira interessante, a indução de corpúsculos lipídicos não é observada nas células de Schwann estimuladas pelo LAM de *M. tb* (Mattos e col., 2011). Esses estudos demonstraram ainda que a micobactéria não patogênica, o *M. smegmatis*, assim como, partículas de látex não revestidas não são capazes de induzir a formação dessas organelas em macrófagos ou em células de Schwann (D'avila e col., 2006, Mattos e col., 2010, Almeida e col., 2014). Nossos resultados indicam que indução de corpúsculos lipídicos é um evento específico e não dependente da fagocitose.

Nosso próximo passo foi investigar o papel funcional dos corpúsculos lipídicos com relação a replicação e sobrevivência bacteriana. A vasta literatura tem relacionado o aumento no número dos corpúsculos lipídicos com a síntese de mediadores lipídicos em diferentes modelos de infecção (D'avila e col., 2006, Gomes e col., 2006, Pacheco e col., 2007, Mattos e col., 2010, Almeida e col., 2014). Observamos no modelo de infecção *in vitro* por BCG um aumento na formação de corpúsculos lipídicos em paralelo com o aumento da síntese de PGE₂.

De maneira interessante, o pré-tratamento das células com o C75 (inibidor da enzima ácido graxo sintase) causou uma inibição na formação dos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG maneira dependente da dose, acompanhado da inibição da síntese de PGE₂, IL-10 e pelo aumento de TNF- α durante infecção *in vitro*. Anteriormente, nosso grupo demonstrou que anti-inflamatórios não esteroidais, como aspirina e NS-398, foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos, a síntese de PGE₂ e modular o perfil de citocinas, de maneira semelhante ao observado no nosso trabalho com C75, durante a infecção por BCG *in vitro* (D'avila e col., 2006). No modelo de infecção por *M. leprae* foi observada a diminuição da formação dos corpúsculos lipídicos em paralelo a diminuição da síntese de PGE₂, IL-10 e aumento de IL-12, tanto em células de Schwann, quanto

em macrófagos murinos (Mattos e col., 2011). Ainda, a supressão de prostaglandinas em camundongos infectados com *M. tb* diminui a replicação bacteriana e aumenta a expressão de IFN- γ , TNF- α e INOS (Rangel Moreno e col., 2002).

A compreensão do papel dos corpúsculos lipídicos durante a infecção está se tornando cada vez mais imprescindível. Foi observado que sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com *M. leprae* foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em um mecanismo dependente de citoesqueleto através da utilização do citocalasina B (Mattos e col., 2010). Contudo, quando a fagocitose do *M. leprae* é inibida, não foi observada a indução dos corpúsculos lipídicos através do sobrenadante dos macrófagos infectados. Esses dados sugerem que a resposta parácrina associada ao aumento dos corpúsculos lipídicos está associada à fagocitose do *M. leprae* pelos macrófagos (Mattos e col., 2010).

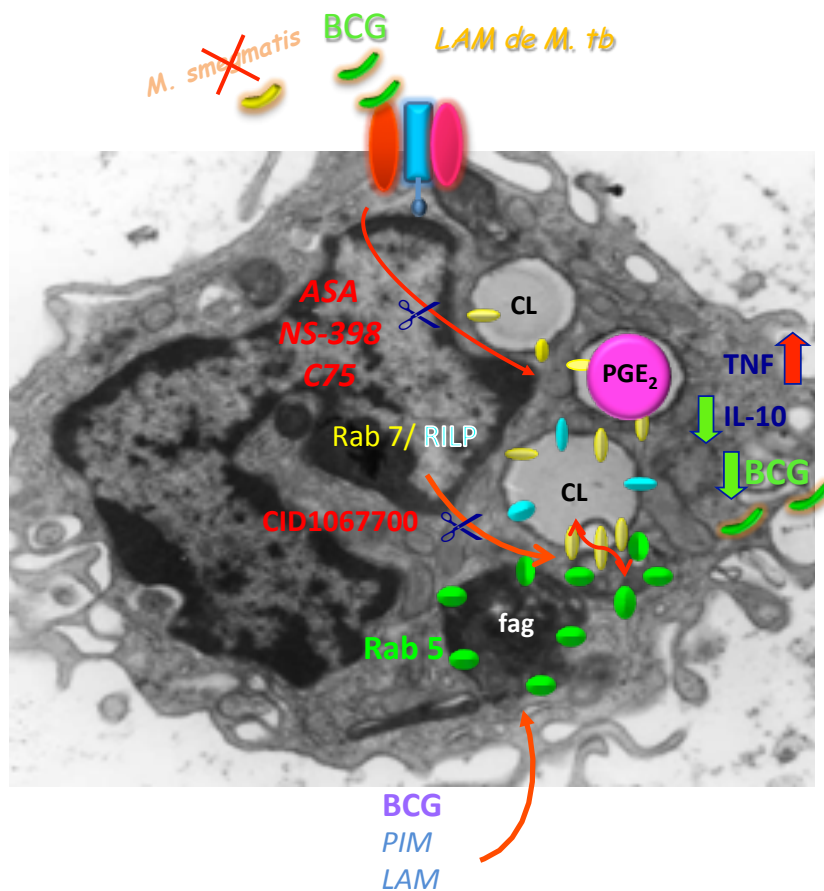
Em conjunto, esses resultados indicam que a indução da formação dos corpúsculos lipídicos pode estar relacionada com a modulação da produção de PGE₂, TNF- α e IL-10 durante infecções micobacterianas propondo um papel imunomodulador para os corpúsculos lipídicos, podendo dessa forma, favorecer a sobrevivência micobacteriana.

Confirmando a nossa hipótese, observamos que o pré-tratamento com diferentes doses de C75 foi capaz de inibir a sobrevivência do BCG em macrófagos de medula após 24 h de infecção através da análise por UFCs. Nossos dados reforçam dados já publicados pelo nosso grupo que mostraram um aumento na porcentagem da mortalidade do *M. leprae* através da análise por citometria de fluxo das bactérias vivas e mortas marcadas após o pré-tratamento das células de Schwann com NS-398 e C75 (Mattos e col., 2011).

Nesse estudo avançamos mais uma etapa na compreensão dos mecanismos pelos quais o *M. bovis*, BCG se associa com corpúsculos lipídicos modulando proteínas da via endocítica e mediadores inflamatórios em favor do patógeno. Nossos resultados indicam que a infecção induz o aumento de corpúsculos lipídicos e a presença da proteína Rab7 ativa, mas não da proteína Rab5, nos corpúsculos lipídicos. Ainda, o LAM micobacteriano parece participar ativamente da associação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos que ocorre de forma dependente da proteína Rab7. Esses dados sugerem o papel dos corpúsculos lipídicos nessa

interação como fontes de nutrientes para a bactéria ou ainda sequestrando a proteína Rab7 dos fagossomas, impedindo a maturação fagossomal e a sobrevivência do patógeno. Além disso, observamos que a inibição dos corpúsculos lipídicos está envolvida com a inibição de mediadores anti-inflamatórios e aumento dos pró-inflamatórios e dessa forma atuando na sobrevivência bacteriana.

Propomos no esquema abaixo, um modelo onde os nossos dados em conjunto com dados prévios do laboratório indicam um importante papel do BCG e do LAM de *M. tb* na formação dos corpúsculos e síntese de PGE₂. Ainda, a inibição dos corpúsculos lipídicos, com conseqüente inibição de PGE₂ por aspirina, NS-398 e C75, mostraram-se capazes de modular a produção de citocinas como o TNF- α e IL-10, sugerindo um papel anti-inflamatório para os corpúsculos lipídicos. De fato, observamos uma diminuição na sobrevivência bacteriana quando utilizamos o inibidor de ácido graxo sintase, C75. Um outro mecanismo proposto aqui é que o componente da parede micobacteriana LAM, mas não o PIM pode estar modulando de maneira ativa a aproximação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos em benefício da infecção. Ainda, o corpúsculo lipídico parece estar sequestrando a Rab7 ativa dos fagossomas. Através do inibidor competitivo para Rab7 CID1067700, observamos um importante papel dessa proteína intermediando a aproximação entre as duas organelas. Dessa forma, a presença da proteína Rab7 nos corpúsculos lipídicos pode estar atuando de duas formas, inibindo a maturação fagossomal e/ou possibilitando a que haja a troca de conteúdo lipídico entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas.



Esquema 5 – Modelo proposto para o envolvimento dos corpúsculos lipídicos na sobrevivência bacteriana durante a infecção experimental por *M. bovis*, BCG. A biogênese dos corpúsculos lipídicos é dependente do reconhecimento de receptores de sinalização e/ou fagocitose da micobactéria patogênica ou do componente da parede micobacteriana LAM. O aumento dessas organelas ocorre em paralelo ao aumento da PGE₂, IL-10 e diminuição do TNF- α e essa resposta é revertida através do pré tratamento com C75. A infecção por BCG induz a aproximação dos fagossomos com os corpúsculos lipídicos e a co-localização da proteína Rab7 ativa, mas não da Rab5 nessas organelas. Essa aproximação é dependente do LAM e da proteína Rab7 como observado após a inibição da Rab7 com o CID1067700.

6) Conclusões

– Durante a infecção por *M. bovis* BCG *in vivo* e *in vitro*, ocorre a interação entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas em um mecanismo independente da viabilidade bacteriana.

– A aproximação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos é mediado por components da parede micobacterianas, principalmente do LAM.

– Durante a infecção por BCG ocorre a associação da Rab7 e RILP mas não da Rab5 associada com a superfície dos corpúsculos lipídicos, sugerindo que a Rab7 está na sua forma ativa.

– Nossas observações do acúmulo da Rab7 no local de interação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos, em conjunto com dados que demonstram que o inibidor da Rab7, CID1067700 inibe a aproximação dos fagossomas com essas organelas sugerem que a Rab7 exerce um papel essencial na aproximação dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas.

– Os resultados demonstraram a presença de lipídio do hospedeiro no interior de fagossomas infectados e do lipídio micobacteriano LAM nos corpúsculos lipídicos.

– Esse trabalho demonstrou que a inibição da formação dos corpúsculos lipídicos está envolvida com a diminuição de mediadores anti-inflamatórios e da sobrevivência bacteriana.

⇒ Os resultados demonstraram novos mecanismos envolvidos na associação dos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG e os fagossomas, bem como o envolvimento dos corpúsculos lipídicos induzidos pela infecção na síntese de mediadores inflamatórios. Em conjunto, nossos dados sugerem que a modulação dessas organelas pelo patógeno podem representar um importante mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro.

7) Referências Bibliográficas

- Abdallah, A. M., Gey Van Pittius, N. C., et al. (2007). "Type VII secretion--mycobacteria show the way." *Nat Rev Microbiol* **5**(11): 883-891.
- Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Agola, J. O., Hong, L., et al. (2012). "A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition." *ACS Chem Biol* **7**(6): 1095-1108.
- Akira, S. and Hoshino, K. (2003). "Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling." *J Infect Dis* **187 Suppl 2**: S356-363.
- Aleman, M., Garcia, A., et al. (2002). "Mycobacterium tuberculosis-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**(5): 583-592.
- Aliberti, J. and Bafica, A. (2005). "Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.
- Almeida, P. E., Roque, N. R., et al. (2014). "Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection." *Biochim Biophys Acta* **1841**(1): 97-107.
- Almeida, P. E., Silva, A. R., et al. (2009). "Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis." *J Immunol* **183**(2): 1337-1345.
- Amaral, E. P., Ribeiro, S. C., et al. (2014). "Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis." *PLoS Pathog* **10**(7): e1004188.
- Anes, E., Kuhnel, M. P., et al. (2003). "Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria." *Nat Cell Biol* **5**(9): 793-802.
- Antony, V. B., Sahn, S. A., et al. (1985). "Bacillus Calmette-Guerin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro." *J Clin Invest* **76**(4): 1514-1521.
- Arcanjo, A. F., Larocque-De-Freitas, I. F., et al. (2015). "The PGE2/IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to Leishmania major Infection." *PLoS One* **10**(5): e0124888.
- Axelrod, S., Oschkinat, H., et al. (2008). "Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide." *Cell Microbiol* **10**(7): 1530-1545.
- Bandeira-Melo, C., Phoofolo, M., et al. (2001). "Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils." *J Biol Chem* **276**(25): 22779-22787.
- Bartz, R., Zehmer, J. K., et al. (2007). "Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation." *J Proteome Res* **6**(8): 3256-3265.
- Beatty, W. L., Rhoades, E. R., et al. (2000). "Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages." *Traffic* **1**(3): 235-247.
- Beatty, W. L. and Russell, D. G. (2000). "Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages." *Infect Immun* **68**(12): 6997-7002.

Beatty, W. L., Ullrich, H. J., et al. (2001). "Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event." Eur J Cell Biol **80**(1): 31-40.

Benoit, M., Desnues, B., et al. (2008). "Macrophage polarization in bacterial infections." J Immunol **181**(6): 3733-3739.

Berrington, W. R. and Hawn, T. R. (2007). "Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?" Immunol Rev **219**: 167-186.

Betz, M. and Fox, B. S. (1991). "Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." J Immunol **146**(1): 108-113.

Blaas, S. H., Mütterlein, R., et al. (2008). "Extensively drug resistant tuberculosis in a high income country: a report of four unrelated cases." BMC Infect Dis **8**: 60.

Bombardier, C. H. and Heinemann, A. W. (2000). "The construct validity of the readiness to change questionnaire for persons with TBI." J Head Trauma Rehabil **15**(1): 696-709.

Bozza, P. T. and Bandeira-Melo, C. (2005). "Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(Suppl 1): 113-120.

Bozza, P. T., Magalhaes, K. G., et al. (2009). "Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 540-551.

Bozza, P. T., Melo, R. C., et al. (2007). "Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense." Pharmacol Ther **113**(1): 30-49.

Bozza, P. T., Yu, W., et al. (1998). "Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects." J Leukoc Biol **64**(4): 563-569.

Bozza, P. T., Yu, W., et al. (1997). "Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism." Mem Inst Oswaldo Cruz **92 Suppl 2**: 135-140.

Brightbill, H. D., Libraty, D. H., et al. (1999). "Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors." Science **285**(5428): 732-736.

Brooks, M. N., Rajaram, M. V., et al. (2011). "NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of Mycobacterium tuberculosis and M. bovis BCG in human macrophages." Cell Microbiol **13**(3): 402-418.

Brown, D. A. (2001). "Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat." Curr Biol **11**(11): R446-449.

Bucci, C., Thomsen, P., et al. (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." Mol Biol Cell **11**(2): 467-480.

Bulut, Y., Faure, E., et al. (2001). "Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling." J Immunol **167**(2): 987-994.

Camirero, J. A. (2006). "Treatment of multidrug-resistant tuberculosis: evidence and controversies." Int J Tuberc Lung Dis **10**(8): 829-837.

Cantalupo, G., Alifano, P., et al. (2001). "Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes." EMBO J **20**(4): 683-693.

Cao, F., Castrillo, A., et al. (2007). "Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2." Infect Immun **75**(2): 753-759.

Carlsson, F., Kim, J., et al. (2010). "Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection." *PLoS Pathog* **6**(5): e1000895.

Chan, E. D., Laurel, V., et al. (2004). "Treatment and outcome analysis of 205 patients with multidrug-resistant tuberculosis." *Am J Respir Crit Care Med* **169**(10): 1103-1109.

Charron, A. J. and Sibley, L. D. (2002). "Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*." *J Cell Sci* **115**(Pt 15): 3049-3059.

Cole, S. T., Brosch, R., et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." *Nature* **393**(6685): 537-544.

Cooper, A. M., Kipnis, A., et al. (2002). "Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present." *J Immunol* **168**(3): 1322-1327.

Cooper, A. M., Magram, J., et al. (1997). "Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *J Exp Med* **186**(1): 39-45.

Corbett, E. L., Marston, B., et al. (2006). "Tuberculosis in sub-Saharan Africa: opportunities, challenges, and change in the era of antiretroviral treatment." *Lancet* **367**(9514): 926-937.

Corbett, E. L., Watt, C. J., et al. (2003). "The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic." *Arch Intern Med* **163**(9): 1009-1021.

D'Avila, H., Almeida, P. E., et al. (2007). "Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy." *Infect Immun* **75**(3): 1507-1511.

D'Avila, H., Freire-De-Lima, C. G., et al. (2011). "Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth." *J Infect Dis* **204**(6): 951-961.

D'Avila, H., Maya-Monteiro, C. M., et al. (2008). "Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections." *International Immunopharmacology* (in press).

D'Avila, H., Melo, R. C., et al. (2006). "*Mycobacterium bovis* BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo." *Journal of Immunology* **176**: 3087-3097.

D'Avila, H., Roque, N. R., et al. (2008). "Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages." *Cell Microbiol* **10**(12): 2589-2604.

D'Avila, H., Toledo, D. A., et al. (2012). "Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses." *Mediators Inflamm* **2012**: 478601.

Dahl, K. E., Shiratsuchi, H., et al. (1996). "Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* **64**(2): 399-405.

Daniel, J., Maamar, H., et al. (2011). "*Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages." *PLoS Pathog* **7**(6): e1002093.

De Hostos, E. L. (1999). "The coronin family of actin-associated proteins." *Trends Cell Biol* **9**(9): 345-350.

- Dheda, K., Barry, C. E., 3rd, et al. (2015). "Tuberculosis." Lancet.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., et al. (1988). "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production." J Immunol **141**(7): 2407-2412.
- Dorhoi, A., Reece, S. T., et al. (2011). "For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection." Immunol Rev **240**(1): 235-251.
- Dvorak, A. M., Weller, P. F., et al. (1993). "Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies." Int Arch Allergy Immunol **101**(2): 136-142.
- Eker, B., Ortmann, J., et al. (2008). "Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis, Germany." Emerg Infect Dis **14**(11): 1700-1706.
- Eruslanov, E. B., Lyadova, I. V., et al. (2005). "Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice." Infect Immun **73**(3): 1744-1753.
- Fadok, V. A., McDonald, P. P., et al. (1998). "Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells." Biochem Soc Trans **26**(4): 653-656.
- Feltcher, M. E., Sullivan, J. T., et al. (2010). "Protein export systems of Mycobacterium tuberculosis: novel targets for drug development?" Future Microbiol **5**(10): 1581-1597.
- Feng, C. G., Kaviratne, M., et al. (2006). "NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **177**(10): 7086-7093.
- Fenton, M. J. and Vermeulen, M. W. (1996). "Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes." Infect Immun **64**(3): 683-690.
- Ferrari, G., Langen, H., et al. (1999). "A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria." Cell **97**(4): 435-447.
- Flannagan, R. S., Cosio, G., et al. (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies." Nat Rev Microbiol **7**(5): 355-366.
- Flesch, I. and Kaufmann, S. H. (1987). "Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **138**(12): 4408-4413.
- Flesch, I. E., Hess, J. H., et al. (1994). "Growth inhibition of Mycobacterium bovis by IFN-gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alpha and by IL-10." Int Immunol **6**(5): 693-700.
- Flynn, J. L. and Chan, J. (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., et al. (1995). "Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice." Immunity **2**(6): 561-572.
- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., et al. (1995). "IL-12 increases resistance of BALB/c mice to Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **155**(5): 2515-2524.
- Fratti, R. A., Backer, J. M., et al. (2001). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest." J Cell Biol **154**(3): 631-644.

Fratti, R. A., Chua, J., et al. (2003). "Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5437-5442.

Fremont, C. M., Nicolle, D. M., et al. (2003). "Control of Mycobacterium bovis BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice." Microbes Infect **5**(12): 1070-1081.

Frieden, T. R., Sterling, T. R., et al. (2003). "Tuberculosis." Lancet **362**(9387): 887-899.

Fukuda, T., Matsumura, T., et al. (2013). "Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis." MBio **4**(1): e00472-00412.

Gandhi, N. R., Moll, A., et al. (2006). "Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa." Lancet **368**(9547): 1575-1580.

Gao, L. Y., Guo, S., et al. (2004). "A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion." Mol Microbiol **53**(6): 1677-1693.

Gatfield, J. and Pieters, J. (2000). "Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages." Science **288**(5471): 1647-1650.

Gilleron, M., Quesniaux, V. F., et al. (2003). "Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response." J Biol Chem **278**(32): 29880-29889.

Gillooly, D. J., Simonsen, A., et al. (2001). "Phosphoinositides and phagocytosis." J Cell Biol **155**(1): 15-17.

Glickman, M. S., Cox, J. S., et al. (2000). "A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of Mycobacterium tuberculosis." Mol Cell **5**(4): 717-727.

Gomes, R. N., Bozza, F. A., et al. (2006). "Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis." Shock **26**(1): 41-49.

Gong, J. H., Zhang, M., et al. (1996). "Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression." Infect Immun **64**(3): 913-918.

Gordon, A. H., Hart, P. D., et al. (1980). "Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages." Nature **286**(5768): 79-80.

Gordon, S. and Martinez, F. O. (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." Immunity **32**(5): 593-604.

Guinn, K. M., Hickey, M. J., et al. (2004). "Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of Mycobacterium tuberculosis." Mol Microbiol **51**(2): 359-370.

Harbrecht, B. G., Kim, Y. M., et al. (1997). "Timing of prostaglandin exposure is critical for the inhibition of LPS- or IFN-gamma-induced macrophage NO synthesis by PGE2." J Leukoc Biol **61**(6): 712-720.

Harrison, R. E., Bucci, C., et al. (2003). "Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP." Mol Cell Biol **23**(18): 6494-6506.

Hart, P. D., Young, M. R., et al. (1983). "Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal

movements. A combined microscopic and computer study." J Exp Med **158**(2): 477-492.

Hayakawa, E., Tokumasu, F., et al. (2007). "A Mycobacterium tuberculosis-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains." Biophys J **93**(11): 4018-4030.

Heldwein, K. A., Liang, M. D., et al. (2003). "TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG." J Leukoc Biol **74**(2): 277-286.

Hirsch, C. S., Ellner, J. J., et al. (1997). "In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor beta." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3926-3931.

Hodges, B. D. and Wu, C. C. "Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets." J Lipid Res **51**(2): 262-273.

Honer Zu Bentrup, K. and Russell, D. G. (2001). "Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment." Trends Microbiol **9**(12): 597-605.

Houben, D., Demangel, C., et al. (2012). "ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria." Cell Microbiol **14**(8): 1287-1298.

Hsueh, W. (1979). "Prostaglandin biosynthesis in pulmonary macrophages." Am J Pathol **97**(1): 137-148.

Hu, D., Wu, J., et al. (2015). "Autophagy regulation revealed by SapM-induced block of autophagosome-lysosome fusion via binding RAB7." Biochem Biophys Res Commun **461**(2): 401-407.

Ishikawa, E., Ishikawa, T., et al. (2009). "Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle." J Exp Med **206**(13): 2879-2888.

Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., et al. (2007). "Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin." Cell **130**(1): 37-50.

Johansson, M., Rocha, N., et al. (2007). "Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betall spectrin." J Cell Biol **176**(4): 459-471.

Jordens, I., Fernandez-Borja, M., et al. (2001). "The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors." Curr Biol **11**(21): 1680-1685.

Kang, P. B., Azad, A. K., et al. (2005). "The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis." J Exp Med **202**(7): 987-999.

Kawai, T. and Akira, S. (2005). "Toll-like receptor downstream signaling." Arthritis Res Ther **7**(1): 12-19.

Kim, M. J., Wainwright, H. C., et al. (2010). "Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism." EMBO Mol Med **2**(7): 258-274.

Koul, A., Herget, T., et al. (2004). "Interplay between mycobacteria and host signalling pathways." Nat Rev Microbiol **2**(3): 189-202.

Kremer, L., Estaquier, J., et al. (1997). "Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes." Eur J Immunol **27**(9): 2450-2456.

Kumar, Y., Cocchiaro, J., et al. (2006). "The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets." *Curr Biol* **16**(16): 1646-1651.

Kusminski, C. M., Shetty, S., et al. (2009). "Diabetes and apoptosis: lipotoxicity." *Apoptosis* **14**(12): 1484-1495.

Lass, A., Zimmermann, R., et al. (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chananin-Dorfman Syndrome." *Cell Metab* **3**(5): 309-319.

Leite, M. S., Pacheco, P., et al. (2005). "Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet." *Shock* **23**(2).

Lin, Y., Zhang, M., et al. (1996). "Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis." *Infect Immun* **64**(4): 1351-1356.

Londos, C., Brasaemle, D. L., et al. (1999). "Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells." *Semin Cell Dev Biol* **10**(1): 51-58.

Lugo-Villarino, G., Verollet, C., et al. (2011). "Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV." *Front Immunol* **2**: 43.

Luo, M., Fadeev, E. A., et al. (2005). "Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages." *Nat Chem Biol* **1**(3): 149-153.

Makinoshima, H. and Glickman, M. S. (2005). "Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis." *Nature* **436**(7049): 406-409.

Martin, S. and Parton, R. G. (2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5): 373-378.

Martinez, F. O., Helming, L., et al. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." *Annu Rev Immunol* **27**: 451-483.

Martinson, F., Burns, K., et al. (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Mol Cell* **10**(2): 417-426.

Master, S. S., Rampini, S. K., et al. (2008). "Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation." *Cell Host Microbe* **3**(4): 224-232.

Mattos, K. A., D'Avila, H., et al. (2010). "Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis." *J Leukoc Biol* **87**(3): 371-384.

Mattos, K. A., Lara, F. A., et al. (2010). "Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes." *Cell Microbiol* **13**(2): 259-273.

Mattos, K. A., Lara, F. A., et al. (2011). "Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes." *Cell Microbiol* **13**(2): 259-273.

Mattos, K. A., Oliveira, V. C., et al. (2014). "Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment." *Cell Microbiol* **16**(6): 797-815.

Mattos, K. A., Oliveira, V. G., et al. (2011). "TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence." *J Immunol* **187**(5): 2548-2558.

Mayer-Barber, K. D., Barber, D. L., et al. (2010). "Caspase-1 independent IL-1beta production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo." *J Immunol* **184**(7): 3326-3330.

Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 4-9.

Mege, J. L., Mehraj, V., et al. (2011). "Macrophage polarization and bacterial infections." *Curr Opin Infect Dis* **24**(3): 230-234.

Melo, R. C. (1999). "Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental Trypanosoma cruzi infection: ultrastructural study in rats." *Tissue Cell* **31**(3): 281-290.

Melo, R. C., D'Avila, H., et al. (2003). "Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection." *Tissue Cell* **35**(1): 59-67.

Melo, R. C. and Dvorak, A. M. (2012). "Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy?" *PLoS Pathog* **8**(7): e1002729.

Melo, R. C., Perez, S. A., et al. (2005). "Intracellular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils." *Traffic* **6**(10): 866-879.

Mendez-Samperio, P., Hernandez-Garay, M., et al. (2000). "Induction of apoptosis in bacillus Calmette-Guerin-activated T cells by transforming growth factor-beta." *Cell Immunol* **202**(2): 103-112.

Michelsen, K. S., Aicher, A., et al. (2001). "The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2." *J Biol Chem* **276**(28): 25680-25686.

Mishra, B. B., Moura-Alves, P., et al. (2010). "Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome." *Cell Microbiol* **12**(8): 1046-1063.

Mohan, V. P., Scanga, C. A., et al. (2001). "Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology." *Infect Immun* **69**(3): 1847-1855.

Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., et al. (1994). "Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin." *J Exp Med* **180**(4): 1499-1509.

Morris, K. R., Lutz, R. D., et al. (2003). "Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide." *Infect Immun* **71**(3): 1442-1452.

Mounier, R., Theret, M., et al. (2013). "AMPKalpha1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration." *Cell Metab* **18**(2): 251-264.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N., et al. (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* **77**(3): 759-803.

Munoz-Elias, E. J. and McKinney, J. D. (2005). "Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence." *Nat Med* **11**(6): 638-644.

Murphy, D. J. (2001). "The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms." *Prog Lipid Res* **40**(5): 325-438.

- Neyrolles, O. (2014). "Mycobacteria and the greasy macrophage: getting fat and frustrated." *Infect Immun* **82**(2): 472-475.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., et al. (2015). "Mycobacteria, metals, and the macrophage." *Immunol Rev* **264**(1): 249-263.
- Nguyen, L. and Pieters, J. (2005). "The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages." *Trends Cell Biol* **15**(5): 269-276.
- Nishikawa, Y., Quittnat, F., et al. (2005). "Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*." *Cell Microbiol* **7**(6): 849-867.
- Oliveira, R. B., Ochoa, M. T., et al. (2003). "Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy." *Infect Immun* **71**(3): 1427-1433.
- Olle-Goig, J. E. (2006). "Editorial: the treatment of multi-drug resistant tuberculosis--a return to the pre-antibiotic era?" *Trop Med Int Health* **11**(11): 1625-1628.
- Orme, I. M. and Cooper, A. M. (1999). "Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis." *Immunol Today* **20**(7): 307-312.
- Pacheco, P., Bozza, F. A., et al. (2002). "Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism." *J Immunol* **169**(11): 6498-6506.
- Pacheco, P., Vieira-De-Abreu, A., et al. (2007). "Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response." *J Immunol* **179**(12): 8500-8508.
- Pandey, A. K. and Sasseti, C. M. (2008). "Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(11): 4376-4380.
- Park, J. S., Tamayo, M. H., et al. (2006). "Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages." *J Leukoc Biol* **79**(1): 80-86.
- Peterson, P. K., Gekker, G., et al. (1995). "CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia." *Infect Immun* **63**(4): 1598-1602.
- Peyron, P., Vaubourgeix, J., et al. (2008). "Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000204.
- Philips, J. A., Rubin, E. J., et al. (2005). "Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection." *Science* **309**(5738): 1251-1253.
- Pillinger, M. H., Philips, M. R., et al. (1995). "Crosstalk in signal transduction via EP receptors: prostaglandin E1 inhibits chemoattractant-induced mitogen-activated protein kinase activity in human neutrophils." *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **23**: 311-316.
- Pinheiro, R. O., Nunes, M. P., et al. (2009). "Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages." *Microbes Infect* **11**(2): 181-190.
- Pol, A., Gross, S. P., et al. (2014). "Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites." *J Cell Biol* **204**(5): 635-646.
- Pugin, J., Heumann, I. D., et al. (1994). "CD14 is a pattern recognition receptor." *Immunity* **1**(6): 509-516.

Puri, R. V., Reddy, P. V., et al. (2013). "Secreted acid phosphatase (SapM) of *Mycobacterium tuberculosis* is indispensable for arresting phagosomal maturation and growth of the pathogen in guinea pig tissues." *PLoS One* **8**(7): e70514.

Rangel Moreno, J., Estrada Garcia, I., et al. (2002). "The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis." *Immunology* **106**(2): 257-266.

Raviglione, M. (2006). "XDR-TB: entering the post-antibiotic era?" *Int J Tuberc Lung Dis* **10**(11): 1185-1187.

Reiling, N., Holscher, C., et al. (2002). "Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*." *J Immunol* **169**(7): 3480-3484.

Renz, H., Gong, J. H., et al. (1988). "Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides." *J Immunol* **141**(7): 2388-2393.

Rhoades, E. R., Cooper, A. M., et al. (1995). "Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* **63**(10): 3871-3877.

Ridley, D. S. and Ridley, M. J. (1987). "Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification." *Pathology* **19**(2): 186-192.

Riedel, D. D. and Kaufmann, S. H. (1997). "Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan." *Infect Immun* **65**(11): 4620-4623.

Riley, R. L., Mills, C. C., et al. (1995). "Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. 1959." *Am J Epidemiol* **142**(1): 3-14.

Robenek, M. J., Severs, N. J., et al. (2004). "Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis." *Faseb J* **18**(7): 866-868.

Rojas, M., Olivier, M., et al. (1999). "TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages." *J Immunol* **162**(10): 6122-6131.

Russell, D. G. (2003). "Phagosomes, fatty acids and tuberculosis." *Nat Cell Biol* **5**(9): 776-778.

Sadek, M. I., Sada, E., et al. (1998). "Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**(3): 513-521.

Saiga, H., Shimada, Y., et al. (2011). "Innate immune effectors in mycobacterial infection." *Clin Dev Immunol* **2011**: 347594.

Saka, H. A., Thompson, J. W., et al. (2015). "Chlamydia trachomatis Infection Leads to Defined Alterations to the Lipid Droplet Proteome in Epithelial Cells." *PLoS One* **10**(4): e0124630.

Saka, H. A. and Valdivia, R. (2012). "Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions." *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 411-437.

Schlesinger, L. S., Hull, S. R., et al. (1994). "Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages." *J Immunol* **152**(8): 4070-4079.

Schroeder, B., Schulze, R. J., et al. (2015). "The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy." *Hepatology* **61**(6): 1896-1907.

Shah, N. S., Wright, A., et al. (2007). "Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis." *Emerg Infect Dis* **13**(3): 380-387.

- Shin, D. M., Jeon, B. Y., et al. (2010). "Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling." PLoS Pathog **6**(12): e1001230.
- Simonsen, A., Gaullier, J. M., et al. (1999). "The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6." J Biol Chem **274**(41): 28857-28860.
- Stenmark, H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 513-525.
- Sullivan, J. T., Young, E. F., et al. (2012). "The Mycobacterium tuberculosis SecA2 system subverts phagosome maturation to promote growth in macrophages." Infect Immun **80**(3): 996-1006.
- Sun, Q., Westphal, W., et al. (2010). "Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(45): 19338-19343.
- Szatmari, I. and Nagy, L. (2008). "Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function." EMBO J **27**(18): 2353-2362.
- Tailleux, L., Neyrolles, O., et al. (2003). "Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells." J Immunol **170**(4): 1939-1948.
- Tailleux, L., Schwartz, O., et al. (2003). "DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells." J Exp Med **197**(1): 121-127.
- Tan, T., Lee, W. L., et al. (2006). "The ESAT-6/CFP-10 secretion system of Mycobacterium marinum modulates phagosome maturation." Cell Microbiol **8**(9): 1417-1429.
- Tanigawa, K., Suzuki, K., et al. (2008). "Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with Mycobacterium leprae." FEMS Microbiol Lett **289**(1): 72-79.
- Thoma-Uszynski, S., Kiertcher, S. M., et al. (2000). "Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10." J Immunol **165**(7): 3804-3810.
- Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., et al. (2000). "CTL-mediated killing of intracellular Mycobacterium tuberculosis is independent of target cell nuclear apoptosis." J Immunol **165**(10): 5773-5779.
- Ting, L. M., Kim, A. C., et al. (1999). "Mycobacterium tuberculosis inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1." J Immunol **163**(7): 3898-3906.
- Toossi, Z., Gogate, P., et al. (1995). "Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions." J Immunol **154**(1): 465-473.
- Torrelles, J. B., Azad, A. K., et al. (2006). "Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from Mycobacterium tuberculosis by C-type lectin pattern recognition receptors." J Immunol **177**(3): 1805-1816.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-146.
- Tsuji, S., Matsumoto, M., et al. (2000). "Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors." Infect Immun **68**(12): 6883-6890.
- Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., et al. (2002). "Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis." Clin Microbiol Rev **15**(2): 294-309.

Van Der Pouw Kraan, T. C., Van Lier, R. A., et al. (1995). "PGE2 and the immune response. A central role for prostaglandin E2 in downregulating the inflammatory immune response." Mol Med Today **1**(2): 61.

Vanaja, S. K., Rathinam, V. A., et al. (2015). "Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights." Trends Cell Biol **25**(5): 308-315.

Velasco-Velazquez, M. A., Barrera, D., et al. (2003). "Macrophage--Mycobacterium tuberculosis interactions: role of complement receptor 3." Microb Pathog **35**(3): 125-131.

Vergne, I., Chua, J., et al. (2003). "Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking." Traffic **4**(9): 600-606.

Vergne, I., Chua, J., et al. (2005). "Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4033-4038.

Vergne, I., Fratti, R. A., et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion." Mol Biol Cell **15**(2): 751-760.

Via, L. E., Deretic, D., et al. (1997). "Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7." J Biol Chem **272**(20): 13326-13331.

Villeneuve, C., Gilleron, M., et al. (2005). "Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process." J Lipid Res **46**(3): 475-483.

Walburger, A., Koul, A., et al. (2004). "Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages." Science **304**(5678): 1800-1804.

Wan, H. C., Melo, R. C., et al. (2007). "Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies." FASEB J **21**(1): 167-178.

Welin, A., Winberg, M. E., et al. (2008). "Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block." Infect Immun **76**(7): 2882-2887.

Wickremasinghe, M. I., Thomas, L. H., et al. (1999). "Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to Mycobacterium tuberculosis: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network." J Immunol **163**(7): 3936-3947.

Wong, D., Bach, H., et al. (2011). "Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H+-ATPase to inhibit phagosome acidification." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(48): 19371-19376.

Yadav, M. and Schorey, J. S. (2006). "The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria." Blood **108**(9): 3168-3175.

Yamada, H., Mizumo, S., et al. (2000). "Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice." Lab Invest **80**(5): 759-767.

Yonekawa, A., Saijo, S., et al. (2014). "Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria." Immunity **41**(3): 402-413.

Yu, W., Bozza, P. T., et al. (1998). "Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A₂ at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies." Am J Pathol **152**(3): 759-769.

Yu, W., Cassara, J., et al. (2000). "Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells." Blood **95**(3): 1078-1085.

Zenaro, E., Donini, M., et al. (2009). "Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN." J Leukoc Biol **86**(6): 1393-1401.

Zhang, M., Chen, L., et al. (2009). "Rab7: roles in membrane trafficking and disease." Biosci Rep **29**(3): 193-209.

Zhang, Y., Broser, M., et al. (1995). "Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to Mycobacterium tuberculosis and its components." J Clin Invest **95**(2): 586-592.

Zimmerli, S., Edwards, S., et al. (1996). "Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **15**(6): 760-770.

World Health Organization (2013) Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. Geneva, Switzerland: WHO. Disponível: (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Acesso no dia: 05/10/2015.