



## AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES CELULARES DESENCADEADAS PELA REMODELAGEM LIPÍDICA DA PAREDE DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Igor Müller; Luana Araújo; Bruna Barros; Sérgio Arruda; Adriano Queiroz

Instituto Gonçalo Moniz- Fiocruz/BA

### INTRODUÇÃO

A característica marcante do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), o agente causador da tuberculose, é sua habilidade em estabelecer uma infecção latente persistente. A progressão para a doença ativa ocorre em cerca de 10% da população infectada, através mecanismos que ainda são pouco compreendidos. Cerca de 40% do peso seco da parede celular do Mtb é composto por lipídios, e estudos têm demonstrado que essas moléculas têm um papel na indução da resposta imune do hospedeiro<sup>1,2</sup>. Condições estressantes impostas pelo ambiente granulomatoso reprime a expressão do operon *mce1*<sup>3</sup>, causando alterações profundas na composição lipídica da parede celular do Mtb. Esse operon codifica transportadores de membrana, possivelmente envolvidos na importação de ácidos micólicos da parede celular do Mtb. A nossa hipótese é que os receptores nucleares ativados por lipídios (RNAL)<sup>4</sup>, nos macrófagos infectados, detecta as alterações na parede celular do Mtb e modula a expressão de genes envolvidos na resposta imune durante o processo infeccioso.

### OBJETIVO

Avaliar as alterações morfológicas e os níveis de expressão gênica dos RNAL e de citocinas inflamatórias em macrófagos murinos estimulados por extratos lipídicos da cepa de Mtb selvagem e mutante no operon *mce1*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Macrófagos RAW 264.7 foram estimuladas *in vitro* por 72h pelos extratos de lipídios apolares das cepas de Mtb selvagem (WT) e com interrupção no operon *mce1* ( $\Delta 1$ ). As análises morfológicas foram realizadas em microscopia eletrônica de transmissão. Após os estímulos com os extratos lipídicos, os macrófagos foram fixados com formaldeído 3,7% e corados com tetróxido de ósmio. A quantificação de genes de RNAL (*PPAR $\gamma$* , *TR4*, *LXR $\alpha$*  e *RAR*); de genes associados com a resposta inflamatória (*IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *IL-12*) e de genes que codificam transportadores de lipídios (*CD-36* e *ApoE*) foi obtida por PCR em tempo real (RT-PCR).

### RESULTADOS

A análise microscopia mostrou que os macrófagos estimulados pelos extratos lipídicos da cepa WT apresentaram aspecto de células ativadas (frangeamento de membrana, formação de vesículas e aumento do retículo endoplasmático) (Fig. 1A). Essas alterações foram menos evidentes nas células estimuladas pelo extrato da cepa  $\Delta 1$  (Fig. 1B), tornando-as mais similares às células não estimuladas (Fig. 1C). O extrato lipídico da cepa WT reprimiu a expressão dos receptores nucleares ativados por lipídios: *RAR* e *TR4*, com relação ao controle não estimulado, enquanto que o extrato lipídico da cepa  $\Delta 1$  restaurou a expressão desses genes (Fig. 2A). Adicionalmente, o extrato lipídico da cepa  $\Delta 1$  modulou a expressão dos genes *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  e *TNF- $\alpha$*  em, respectivamente, 19, 1,9 e 4 vezes, com relação aos níveis de expressão observados em macrófagos estimulados pelo extrato lipídico da cepa WT (Fig. 2B). Não observamos alterações na expressão dos transportadores ApoE e CD36 (Fig. 2C).

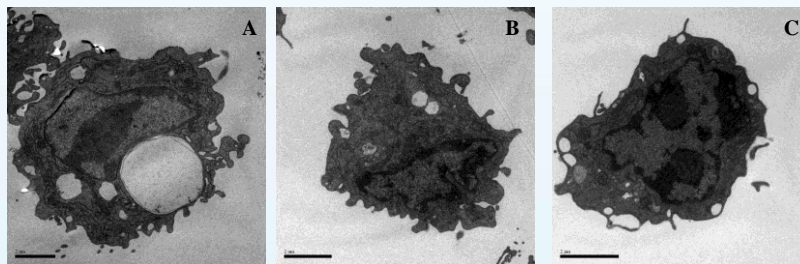


Figura 1. Aspectos morfológicos de macrófagos RAW 264.7, observados em microscopia eletrônica de transmissão. Células estimuladas por extratos lipídicos da cepa de *M. tuberculosis* selvagem (A), mutante no operon *mce1* (B) e não estimuladas (C).

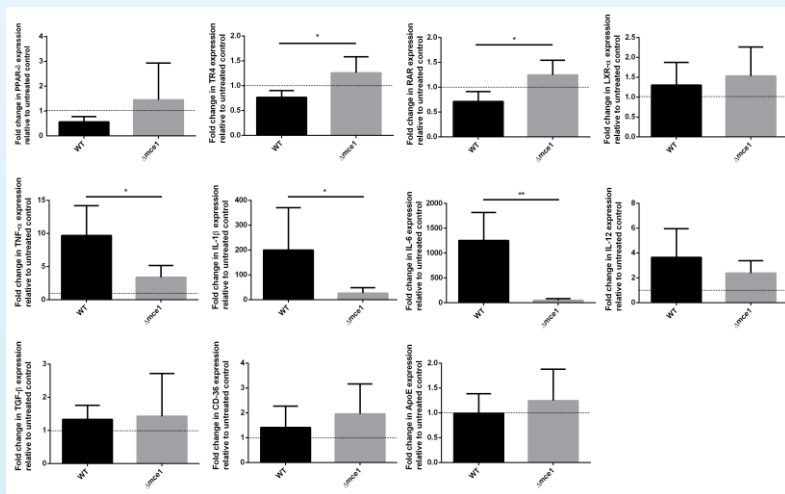


Figure 2. Níveis de expressão de RNAL (*PPAR $\gamma$* , *TR4*, *LXR $\alpha$*  e *RAR*); de genes associados com a resposta imune e ativação celular (*IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *IL-12*) e de genes que codificam transportadores de lipídios (*CD-36* e *ApoE*). Os valores do CT das reações de PCR em tempo real foram normalizados pela média de dois controles internos, *GAPDH* e *βact*. Os cálculos de expressão gênica foram feitos de acordo com o método 2- $\Delta\Delta$ CT.

### CONCLUSÃO

O Mtb é capaz modular a resposta inflamatória dos macrófagos ao alterar o conteúdo lipídico da parede celular. Os dados desse trabalho mostraram que a interrupção do operon *mce1*, a qual ocorre no curso natural da infecção, reestabelece a expressão de RNALs, os quais são reconhecidos por seu papel no controle da inflamação, e reprime a expressão de genes envolvidos na resposta pró-inflamatória. Esse parece ser um mecanismo pelo qual o Mtb modula da resposta imune do hospedeiro como estratégia para estabelecer uma infecção a longo prazo.

### REFERÊNCIAS

- KARAKOUSIS, P. C.; BISHAI, W. R.; DORMAN, S. E. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 105–116, fev. 2004.
- KRISHNAN, N. et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage influences innate immune response and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles. *PLoS One*, v. 6, n. 9, p. e23870, 2011.
- QUEIROZ, A. et al. Comparative metabolic profiling of *mce1* operon mutant vs wild-type *Mycobacterium tuberculosis* strains. *FEMS Pathogens and Disease*, vol. 73, n. 8, 2015
- MAHAJAN, S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors *PPAR $\gamma$*  and *TR4* for survival. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 188, n. 11, p. 5593–5603, 1 jun. 2012.